

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202191288** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2021.10.21

(51) Int. Cl. *A61K 47/64* (2017.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.09.11

**(54) СНОЛИХ-ПРОИЗВОДНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ  
ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ПОЛЕЗНОЙ НАГРУЗКИ**

(31) 62/756,889; PCT/US2019/021474;  
62/816,022; 62/888,133; 62/888,400;  
62/888,144

(32) 2018.11.07; 2019.03.08; 2019.03.08;  
2019.08.16; 2019.08.16; 2019.08.16

(33) US

(86) PCT/US2019/050708

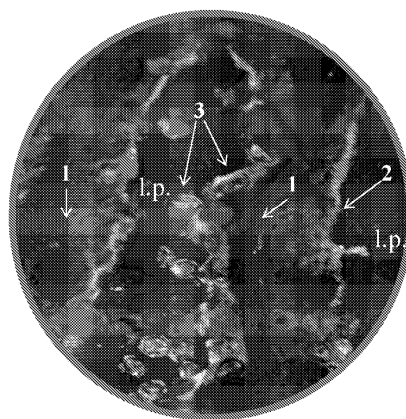
(87) WO 2020/096695 2020.05.14

(71) Заявитель:  
ЭПІЛАЙД МОЛЕКЮЛАР  
ТРАНСПОРТ ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Хантер Томас Карл, Фын Вэйцзюнь,  
Махмуд Тахир (US), Тавернер  
Алистер, Лорен Флориан (GB), Лю  
Кэи, Мрсни Рэндалл Дж., Олсон  
Чарльз, Постлетуэйт Салли (US)

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

(57) В настоящем описании представлены конструкции доставки, содержащие носитель, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой, где связывание носителя с полезной нагрузкой может позволить транспортировку полезной нагрузки (например, терапевтической полезной нагрузки) в и/или через интактные поляризованные эпителиальные клетки (например, эпителиальные клетки кишечника млекопитающего). Конструкция доставки может быть частью фармацевтической композиции, которая может быть перорально введена субъекту для получения улучшенной, эффективной терапии для лечения, например, воспалительных заболеваний или аутоиммунных заболеваний.



**A1**

**202191288**

**202191288**

**A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-569026EA/061

### **CHOLIX-ПРОИЗВОДНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ПОЛЕЗНОЙ НАГРУЗКИ**

#### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА**

По настоящей заявке испрашивается приоритет заявки РСТ № РСТ/US2019/021474, поданной 8 марта 2019, и предварительных заявок на патент США №№ 62/888,144, поданной 16 августа 2019; 62/888,400, поданной 16 августа 2019; 62/888,133, поданной 16 августа 2019; 62/816,022, поданной 8 марта 2019; и 62/756,889, поданной 7 ноября 2018, где заявки включены в настоящий документ в качестве ссылки полностью для всех целей.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Эпителий кишечника препятствует попыткам перорального введения больших терапевтических молекул, таких как белки, потому что белки не могут диффундировать через неповрежденный эпителиальный барьер или пересекать барьер через плотные контакты. После поглощения эпителиальной клеткой терапевтический белок либо попадает в деструктивный путь транспорта через лизосомы, либо высвобождается обратно в просвет кишечника. Эта неспособность легко переноситься через эпителий кишечника продолжает оставаться ограничивающим фактором при разработке коммерчески жизнеспособных пероральных композиций, особенно терапевтических средств на основе полипептидов. Обычным решением является использование парентерального введения, такого как внутривенное или подкожное введение, но эти пути введения часто могут вызывать значительные побочные эффекты, снижать терапевтическую эффективность и уменьшать удобство для пациента, что может отрицательно повлиять на соблюдение режима лечения. Существует потребность в улучшенных композициях и способах транспортировки терапевтических средств в или через эпителий, например эпителий кишечника.

#### **ВКЛЮЧЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ССЫЛКИ**

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены сюда в качестве ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки.

#### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В одном аспекте, в настоящем описании представлен комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий носитель, способный эндоцитозироваться в поляризованную эпителиальную клетку и аккумулироваться в области клетки, где полезная нагрузка является гетерологичной к носителю. В некоторых вариантах осуществления, областью является апикальный участок, надъядерный участок или базальный участок. В некоторых вариантах осуществления, носитель удерживается в области в течение, по меньшей мере, 5 мин, 10 мин или 15 минут в области. В некоторых вариантах осуществления, носитель получают из Cholix полипептида. В некоторых вариантах осуществления, носителем

является полипептид, имеющий последовательность Cholix с С-концом на любом из положений 150-195. В некоторых вариантах осуществления, носителем является полипептид, имеющий последовательность Cholix с N-концом на любом из положений 1-41. В некоторых вариантах осуществления, носителем является полипептид, имеющий последовательность Cholix с N-концевым усечением на любом из положений 35-40. В некоторых вариантах осуществления, носителем является полипептид, имеющий последовательность Cholix с С-концом на любом из положений 150-205. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотных остатков от N-концевого положения 40 до любого из С-концевых положений 150-205 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, носитель имеет С-конец в положениях 150 или 187 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 137. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 137-139. В некоторых вариантах осуществления, нумерация положений основана на выравнивании Cholix полипептида с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 130, где положения пронумерованы от N-конца к С-концу, начиная с положения 1 на N-конце. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен оставаться ассоциированным с апикальным входным рецептором дольше после эндоцитоза носителя в поляризованную эпителиальную клетку, чем носитель, способный трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых вариантах осуществления, апикальным входным рецептором является TMEM132 рецептор. В некоторых вариантах осуществления, поляризованная эпителиальная клетка содержит желудочно-кишечную поляризованную эпителиальную клетку.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий (i) носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющий С-конец на любом из положений 195-347 и способный трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку, связанный с (ii) гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, нумерация положений основана на выравнивании Cholix полипептида с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 130, где положения пронумерованы от N-конца к С-концу, начиная с положения 1 на N-конце. В некоторых вариантах осуществления, С-конец находится на любом из положений 195-266. В некоторых вариантах осуществления, С-конец находится на одном из положений 195-266 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-конец находится на любом из положений 206, 245, 251 или 266 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, С-конец находится на любом из положений 206, 245, 251 или 266 SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-конец находится в положении 206 любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в

SEQ ID NOs: 131 или 184. В некоторых вариантах осуществления, С-конец находится в положении 245 любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 132 или 183. В некоторых вариантах осуществления, С-конец находится в положении 251 SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 133 или 182. В некоторых вариантах осуществления, С-конец находится в положении 266 SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 134 или 181. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78 с усечением в любом из положений 195-347, и имеет не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных вариаций на любом из положений 1-40, 133-151, 152-187 или 188-206 SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий (i) носитель, полученный из Cholix полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или его фрагмента, способный эндоцитозировать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать поляризованную эпителиальную клетку, связанный с (ii) гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит глутаминовую кислоту в положении 3 и аланин в положении 4. В некоторых вариантах осуществления, носитель является не токсичным. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен трансцитозировать гетерологичную полезную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит фрагмент, способный трансцитозировать поляризованную эпителиальную клетку, где носитель имеет С-конец на любом из положений 195 последовательности С-концевого остатка, указанной в любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-конец находится на одном из положений 195-386 последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-конец находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-конец находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 135.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий (i) носитель, полученный из Cholix полипептида, который не содержит SEQ ID NO: 179, и не состоит из SEQ ID NO: 126, в комплексе с (ii) гетерологичной полезной нагрузкой, где носитель способен (a) трансцитозировать гетерологичную полезную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку; или (b) транспортировать гетерологичную полезную нагрузку в поляризованную эпителиальную

клетку. В некоторых вариантах осуществления, носитель имеет, по меньшей мере, 75% идентичность последовательности к последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130 или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления, носитель имеет, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к Cholix варианту, указанному в SEQ ID NO: 130 или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления, Cholix полипептид имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 130 или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит глутаминовую кислоту в положении 3 и аланин в положении 4. В некоторых вариантах осуществления, носитель является не токсичным. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен трансцитозировать гетерологичную полезную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых вариантах осуществления, носитель имеет С-концевое усечение на любом из положений 195-633 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится на одном из положений 195-386 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, носитель имеет С-концевое усечение на любом из положений 195-386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2. В некоторых вариантах осуществления, комплекс носитель-полезная нагрузка содержит N-концевой метионин. В некоторых вариантах осуществления, носитель синтетически конъюгирован с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, носителем генетически слит с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная полезная нагрузка является терапевтической полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой является цитокин, антитело, гормон или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой является цитокин. В некоторых вариантах осуществления, цитокином является интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления, интерлейкином является IL-10. В некоторых вариантах осуществления, IL-10 содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 145. В некоторых вариантах осуществления, интерлейкином является IL-22. В некоторых вариантах осуществления, IL-22 содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 142. В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой является антитело. В некоторых вариантах осуществления, антителом является анти-TNF антитело. В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой является гормон. В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой

является гормон роста человека. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная полезная нагрузка ковалентно связана с носителем. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная полезная нагрузка связана с С-концом носителя. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная полезная нагрузка связана с N-концом носителя. В некоторых вариантах осуществления, носитель связан с гетерологичной полезной нагрузкой через спейсер. В некоторых вариантах осуществления, спейсером является не расщепляемый спейсер. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит от 1 до 100 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит вплоть до 15 повторов GS, GGS, GGGS, GGGGS, GGGGGS или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 175. В некоторых вариантах осуществления, спейсер состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 176. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная полезная нагрузка не ковалентно связана с носителем. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная полезная нагрузка образует комплекс с носителем через наночастицу.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен способ транцитоза гетерологичной полезной нагрузки через поляризованную эпителиальную клетку, включающий: (а) контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка; и (b) транцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку, где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или его фрагмента, способный транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка включает взаимодействие носителя с апикальным входным рецептором TMEM132. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие носителя с мембранным белком TMEM132 вызывает рецептор-опосредованный эндоцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка. В некоторых вариантах осуществления, носитель, который взаимодействует с TMEM132, содержит аминокислотные остатки 135-151 SEQ ID NO: 130 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней. В некоторых вариантах осуществления, транцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку включает взаимодействие носителя с любым одним или несколькими из GRP75, ERGIC-53 и перлекана. В некоторых вариантах осуществления, транцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку дополнительно включает колокализацию комплекса носитель-полезная нагрузка с любым одним или несколькими из COPI, EEA1 и Rab7 на апикальной стороне, и с Rab11a на базальной стороне

эпителиальной клетки. В некоторых вариантах осуществления, носитель, который взаимодействует с GRP7 или ERGIC-53, содержит аминокислотные остатки 1-40 и 152-187 из SEQ ID NO: 130 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней. В некоторых вариантах осуществления, носитель, который взаимодействует с перлеканом, содержит аминокислотные остатки 188-205 из SEQ ID NO: 130 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней. В некоторых вариантах осуществления, способ может дополнительно включать, после (b), доставку комплекса носитель-полезная нагрузка в *lamina propria*. В некоторых вариантах осуществления, поляризованной эпителиальной клеткой является поляризованная эпителиальная клетка кишечника.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен способ пероральной доставки гетерологичной полезной нагрузки субъекту, включающий: пероральную доставку комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым доставляя гетерологичную полезную нагрузку субъекту, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или ее фрагмент, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен комплекс носитель-полезная нагрузка для пероральной доставки гетерологичной полезной нагрузки субъекту способом, включающим: пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или ее фрагмент, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В одном аспекте, в настоящем описании представлено применение комплекса носитель-полезная нагрузка для пероральной доставки гетерологичной полезной нагрузки субъекту способом, включающим: пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту; где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или ее фрагмент, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен способ лечения заболевания у

субъекта, включающий: пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или ее фрагмент, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен комплекс носитель-полезная нагрузка для применения для лечения заболевания у субъекта способом, включающим: пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или ее фрагмент, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В одном аспекте, в настоящем описании представлено применение комплекса носитель-полезная нагрузка в производстве лекарственного средства для лечения заболевания у субъекта способом, включающим: пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или ее фрагмент, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает связывание гетерологичной полезной нагрузки с рецептором в lamina propria. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает доставку гетерологичной полезной нагрузки в системный кровоток. В некоторых вариантах осуществления, носителем является Полученный из Cholix полипептид. В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит аминокислотные остатки 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 или 1-386 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит аминокислотные остатки 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 или 1-386 последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 1-2. В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит любую из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 131-135 или 180-184. В некоторых вариантах осуществления, поляризованным эпителием является поляризованный эпителий кишечника. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием является язвенный колит, паучит, проктит, болезнь Крона, рассеянный

склероз (MS), системная красная волчанка (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит или псориаз. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием является язвенный колит. В некоторых вариантах осуществления, язвенный колит имеет степень от слабого до умеренного или от умеренного до тяжелого. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием является болезнь Крона. В некоторых вариантах осуществления, болезнью Крона является фистулизирующая болезнь Крона. В некоторых вариантах осуществления, полезной нагрузкой является интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления, интерлейкин содержит аминокислотную последовательность по SEQ ID NOs: 142 или 145.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен способ транспортировки гетерологичной полезной нагрузки в поляризованную эпителиальную клетку, включающий: (а) контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка; и (б) транспортировку комплекса носитель-полезная нагрузка в поляризованную эпителиальную клетку, где комплекс носитель-полезная нагрузка включает носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или его фрагмент, способный транспортировать комплекс носитель-полезная нагрузка в эпителиальную клетку, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка включает взаимодействие носителя с апикальным входным рецептором TMEM132. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие носителя с апикальным входным рецептором TMEM132 дает рецептор-опосредованный эндоцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает транспортировку гетерологичной полезной нагрузки в апикальный участок или базальный участок. В некоторых вариантах осуществления, носитель комплекса носитель-полезная нагрузка остается ассоциированным с TMEM132 после эндоцитоза. В некоторых вариантах осуществления, носитель, который взаимодействует с TMEM132, содержит аминокислотные остатки 135-151 из SEQ ID NO: 130 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней. В некоторых вариантах осуществления, носителем является Полученный из Cholix полипептид. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотных остатков 1-151, 1-187, 41-187 или 40-205 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотных остатков 1-151, 1-187, 41-187 или 40-205 последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 1-2. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 136-139. В некоторых вариантах осуществления, носитель не ковалентно связан с гетерологичной полезной нагрузкой через наночастицу. В некоторых вариантах осуществления, отношение гетерологичной полезной нагрузки к носителю на наночастице составляет, по меньшей мере, 15000:1. В некоторых вариантах

осуществления, гетерологичной полезной нагрузкой является агент, снижающий глюкозу. В некоторых вариантах осуществления, агент, снижающий глюкозу, не ковалентно ассоциирован с наночастицей. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичной полезной нагрузкой является миРНК. В некоторых вариантах осуществления, миРНК не ковалентно ассоциирована с наночастицей. В некоторых вариантах осуществления, носитель ковалентно связан с наночастицей или высушен распылением на наночастице.

В одном аспекте, в настоящем описании представлен способ, включающий транспортировку гетерологичной полезной нагрузки в поляризованную эпителиальную клетку, включающий: (а) контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка; и (b) транспортировку комплекса носитель-полезная нагрузка в поляризованную эпителиальную клетку, где комплексом носитель-полезная нагрузка является комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий любой из эндоцитозированных носителей в настоящем документе.

В одном аспекте, описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий носитель, способный аккумулироваться в апикальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 5 минут после эндоцитоза носителя, связанного с гетерологичной полезной нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в апикальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 10 минут после эндоцитоза носителя. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в апикальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, 15 минут после эндоцитоза носителя.

В некоторых вариантах осуществления, поляризованная эпителиальная клетка содержит желудочно-кишечную поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых вариантах осуществления, поляризованная эпителиальная клетка содержит желудочно-кишечную поляризованную эпителиальную клетку крысы.

В другом аспекте, описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка, включает носитель, способный аккумулироваться в апикальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, в течение 5 минут после интралюминального нанесения носителя в желудочно-кишечном тракте млекопитающего, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в апикальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 10 минут после интралюминального нанесения носителя в желудочно-кишечном тракте млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в апикальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, в течение 15 минут после интралюминального нанесения носителя в желудочно-кишечном тракте млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления, интралюминальное нанесение включает интралюминальную инъекцию в тощую кишку крысы.

В другом аспекте, описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий носитель, способный аккумулироваться в надъядерном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 5 минут после эндоцитоза носителя, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в надъядерном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 10 минут после эндоцитоза носителя. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в надъядерном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 15 минут после эндоцитоза носителя.

В некоторых вариантах осуществления, поляризованная эпителиальная клетка содержит желудочно-кишечную поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых вариантах осуществления, поляризованная эпителиальная клетка содержит желудочно-кишечную поляризованную эпителиальную клетку крысы.

В другом аспекте, описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий носитель, способный аккумулироваться в надъядерном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 5 минут после интралюминального нанесения носителя в желудочно-кишечный тракт млекопитающего, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в надъядерном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 10 минут после интралюминального нанесения носителя в желудочно-кишечный тракт млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в надъядерном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 15 минут после интралюминального нанесения носителя в желудочно-кишечном тракте млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления, интралюминальное нанесение включает интралюминальное нанесение в тощую кишку крысы.

В другом аспекте, описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий носитель, способный аккумулироваться в базальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 5 минут после эндоцитоза носителя, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в базальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 10 минут после эндоцитоза носителя. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в базальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 15 минут после эндоцитоза носителя.

В некоторых вариантах осуществления, поляризованная эпителиальная клетка содержит желудочно-кишечную поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых вариантах осуществления, поляризованная эпителиальная клетка содержит желудочно-кишечную поляризованную эпителиальную клетку крысы.

В другом аспекте, описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий носитель, способный аккумулироваться в базальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 5 минут после интралюминального нанесения носителя в желудочно-кишечный тракт млекопитающего, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в базальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 10 минут после интралюминального нанесения носителя в желудочно-кишечный тракт млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен аккумулироваться в базальном участке поляризованной эпителиальной клетки, по меньшей мере, через 15 минут после интралюминального нанесения носителя в желудочно-кишечном тракте млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления, интралюминальное нанесение включает интралюминальную инъекцию в тощую кишку крысы.

В другом аспекте, описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего С-конец на любом из положений 195-347, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, нумерация положений основана на выравнивании Cholix полипептида с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 130, где положения пронумерованы от N-конца к С-концу, начиная с положения 1 на N-конце.

В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится на одном из положений 195-266 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится на одном из положений 195-266 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится на любом из положений 206, 245, 251 или 266 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится на любом из положений 206, 245, 251 или 266 SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится в положении 206 любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 131 или 184. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится в положении 245 любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 132 или 183. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится в положении 251 SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 133 или 182. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится в положении 266 SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в

SEQ ID NOs: 134 или 181. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78 с усечением в любом из положений 195-347, и имеет не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных вариаций на любом из положений 1-40, 133-151, 152-187 или 188-206 SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

В другом аспекте, описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющий N-конец в положениях 1-41 и C-конец в положениях 150-195, или состоящий из аминокислотных остатков от любого из N-концевых положений 35-40 до любого из C-концевых положений 150-205 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, нумерация положений основана на выравнивании Cholix полипептида с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 130, где положения пронумерованы от N-конца к C-концу, начиная с положения 1 на N-конце.

В некоторых вариантах осуществления, носитель способен оставаться ассоциированным с апикальным входным рецептором после эндоцитоза носителя в поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых вариантах осуществления, апикальным входным рецептором является TMEM132 рецептор (например, TMEM132A).

В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотных остатков от N-концевого положения 40 до любого из C-концевых положений 150-205 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, носитель имеет C-концевое усечение в положениях 150 или 186 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130.

В некоторых вариантах осуществления, носитель способен транспортировать полезную нагрузку в базальный участок или надъядерный участок в поляризованной эпителиальной клетке. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен транспортировать полезную нагрузку в апикальный участок в поляризованной эпителиальной клетке.

В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 137-139.

В другом аспекте, описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий полученный из Cholix полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или ее фрагмент, способный эндоцитозировать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать поляризованную эпителиальную клетку, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит глутаминовую кислоту в положении 3 и аланин в положении 4.

В некоторых вариантах осуществления, носитель является не токсичным.

В некоторых вариантах осуществления, носитель способен трансцитозировать

гетерологичную полезную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку.

В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит фрагмент, способный транцитозировать поляризованную эпителиальную клетку, где носитель имеет С-концевое усечение на любом из положений 195 до С-концевого остатка последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится на одном из положений 195-386 последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 135.

В другом аспекте, описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий носитель, полученный из Cholix полипептид, который не содержит SEQ ID NO: 179 и не состоит из SEQ ID NO: 126, образующий комплекс с гетерологичной полезной нагрузкой, где носитель способен транцитозировать гетерологичную полезную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку; или транспортировать гетерологичную полезную нагрузку в поляризованную эпителиальную клетку.

В некоторых вариантах осуществления, носитель имеет, по меньшей мере, 75% идентичность последовательности к последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130 или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления, носитель имеет, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к Cholix варианту, указанному в SEQ ID NO: 130 или его фрагменту. В некоторых вариантах осуществления, Cholix полипептид является последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 130, или ее фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит глутаминовую кислоту в положении 3 и аланин в положении 4.

В некоторых вариантах осуществления, носитель является не токсичным.

В некоторых вариантах осуществления, носитель способен транцитозировать гетерологичную полезную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку.

В некоторых вариантах осуществления, носитель имеет С-концевое усечение на любом из положений 195-633 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится на одном из положений 195-386 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, носитель имеет С-концевое усечение на любом из положений 195-386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78. В некоторых вариантах осуществления, С-концевое усечение находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2. В некоторых вариантах

осуществления, комплекс носитель-полезная нагрузка содержит N-концевой метионин.

В некоторых вариантах осуществления, носитель синтетически конъюгирован с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, носитель генетически слит с гетерологичной полезной нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления, гетерологичной полезной нагрузкой является терапевтическая полезная нагрузка. В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой является цитокин, антитело, гормон или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой является цитокин. В некоторых вариантах осуществления, цитокином является интерлейкин.

В некоторых вариантах осуществления, интерлейкином является IL-10. В некоторых вариантах осуществления, IL-10 содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 145. В некоторых вариантах осуществления, интерлейкин является IL-22. В некоторых вариантах осуществления, IL-22 содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 142.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой является антитело. В некоторых вариантах осуществления, антителом является анти-TNF антитело. В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой является гормон. В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой является гормон роста человека.

в некоторых вариантах осуществления, гетерологичная полезная нагрузка ковалентно связана с носителем. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная полезная нагрузка связана с С-концом носителя. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная полезная нагрузка связана с N-концом носителя. В некоторых вариантах осуществления, носитель связан с гетерологичной полезной нагрузкой через спейсер.

В некоторых вариантах осуществления, спейсером является не расщепляемый спейсер. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит от 1 до 100 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит вплоть до 15 повторов GS, GGS, GGGS, GGGGS, GGGGGS или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 175. В некоторых вариантах осуществления, спейсер состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 176.

В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная полезная нагрузка не ковалентно связана с носителем. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная полезная нагрузка образует комплекс с носителем через наночастицу.

В одном аспекте, настоящее описание включает полинуклеотид, кодирующий

любой из комплексов носитель-полезная нагрузка (например, конструкции доставки), описанных в настоящем документе, например, такие, которые содержат, состоят по существу из или состоят из любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 147-150, 152-159 или 188.

В одном аспекте, настоящее описание включает вектор, содержащий любой из таких полинуклеотидов, которые кодируют комплекс носитель-полезная нагрузка (например, конструкцию доставки) по настоящему описанию.

В одном аспекте, настоящее описание включает способ транцитоза гетерологичной полезной нагрузки через поляризованную эпителиальную клетку, включающий: (a) контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка; и (b) транцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку, где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или ее фрагмент, способный транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка содержит взаимодействие носителя с апикальным входным рецептором TMEM132. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие носителя с белком мембраны TMEM132 вызывает рецептор-опосредованный эндоцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка. В некоторых вариантах осуществления, носитель, который взаимодействует с TMEM132, содержит аминокислотные остатки 135-151 из SEQ ID NO: 130 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней. В некоторых вариантах осуществления, транцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку включает взаимодействие носителя с любым одним или несколькими из GRP75 (например, GRP75B), ERGIC-53 и перлекана. В некоторых вариантах осуществления, транцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку дополнительно включает колокализацию комплекса носитель-полезная нагрузка с любым одним или несколькими из COPI, EEA1 и Rab7 на апикальной стороне, и с Rab11a на базальной стороне эпителиальной клетки. В некоторых вариантах осуществления, носитель, который взаимодействует с GRP7 или ERGIC-53, содержит аминокислотные остатки 1-40 и 152-187 из SEQ ID NO: 130, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней. В некоторых вариантах осуществления, носитель, который взаимодействует с перлеканом, содержит аминокислотные остатки 188-205 из SEQ ID NO: 130, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает, после (b), доставку комплекса носитель-полезная нагрузка в lamina propria. В некоторых вариантах осуществления,

поляризованной эпителиальной клеткой является поляризованная эпителиальная клетка кишечника.

В одном аспекте, настоящее изобретение включает способ пероральной доставки гетерологичной полезной нагрузки субъекту, включающий: пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым доставляя гетерологичную полезную нагрузку субъекту, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или ее фрагмент, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В одном аспекте, настоящее описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка для пероральной доставки гетерологичной полезной нагрузки субъекту способом, включающим: пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или ее фрагмент, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В одном аспекте, настоящее описание включает применение комплекса носитель-полезная нагрузка для пероральной доставки гетерологичной полезной нагрузки субъекту способом, включающим: пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту; где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или его фрагмент, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В одном аспекте, настоящее описание включает способ лечения заболевания у субъекта, включающий: пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или ее фрагмент, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, связанный с гетерологичной

полезной нагрузкой.

В одном аспекте, настоящее описание включает комплекс носитель-полезная нагрузка для применения в лечении заболевания у субъекта способом, включающим: пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или его фрагмент, способный транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

В одном аспекте, настоящее описание включает применение комплекса носитель-полезная нагрузка в производстве лекарственного средства для лечения заболевания у субъекта способом, включающим: пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или ее фрагмент, способный транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает связывание гетерологичной полезной нагрузки с рецептором в lamina propria. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает доставку гетерологичной полезной нагрузки в системный кровоток. В некоторых вариантах осуществления, носителем является полученный из Cholix полипептид. В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит аминокислотные остатки 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 или 1-386 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит аминокислотные остатки 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 или 1-386 последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 1-2. В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит любую из аминокислотных последовательностей, указанных SEQ ID NOs: 131-135 или 180-184. В некоторых вариантах осуществления, поляризованным эпителием является поляризованный эпителий кишечника. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием является язвенный колит, паучит, проктит, болезнь Крона, рассеянный склероз (MS), системная красная волчанка (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит или псориаз. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием является язвенный колит. В некоторых вариантах осуществления, язвенный колит имеет степень от слабого до умеренного или от умеренного до тяжелого. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием является болезнь Крона. В некоторых вариантах осуществления, болезнью Крона является фистулизирующая болезнь Крона. В некоторых

вариантах осуществления, полезной нагрузкой является интерлейкин. В некоторых вариантах осуществления, интерлейкин содержит аминокислотную последовательность по SEQ ID NOs: 142 или 145.

В одном аспекте, настоящее описание включает способ транспортировать гетерологичную полезную нагрузку в поляризованную эпителиальную клетку, включающий: (a) контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка; и (b) транспортировку комплекса носитель-полезная нагрузка в поляризованную эпителиальную клетку, где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или ее фрагмент, способный транспортировать комплекс носитель-полезная нагрузка в эпителиальную клетку, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления, контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка содержит взаимодействие носителя с апикальным входным рецептором TMEM132. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие носителя с апикальным входным рецептором TMEM132 вызывает рецептор-опосредованный эндоцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно содержит транспорт гетерологичной полезной нагрузки в апикальный участок или базальный участок. В некоторых вариантах осуществления, носитель комплекса носитель-полезная нагрузка остается ассоциированным с TMEM132 после эндоцитоза. В некоторых вариантах осуществления, носитель, который взаимодействует с TMEM132, содержит аминокислотные остатки 135-151 из SEQ ID NO: 130 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней. В некоторых вариантах осуществления, носителем является полученный из Cholix полипептид. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотных остатков 1-151, 1-187, 41-187 или 40-205 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из аминокислотных остатков 1-151, 1-187, 41-187 или 40-205 последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 1-2. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 136-139. В некоторых вариантах осуществления, носитель не ковалентно связан с гетерологичной полезной нагрузкой через наночастицу. В некоторых вариантах осуществления, отношение гетерологичной полезной нагрузки к носителю на наночастице составляет, по меньшей мере, 15000:1. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичной полезной нагрузкой является снижающий глюкозу агент. В некоторых вариантах осуществления, агент, снижающий глюкозу, не ковалентно ассоциированный с наночастицей. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичной полезной нагрузкой является миРНК. В некоторых вариантах осуществления, миРНК не ковалентно ассоциирована с наночастицей. В некоторых вариантах осуществления, носитель ковалентно связан с наночастицей или высушен

распылением на наночастице.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

Различные характеристики настоящего описания подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Файл патента или заявки содержит, по меньшей мере, один чертеж, выполненный в цвете. Копии этого патента или публикации заявки на патент с цветным чертежом(ами) будут предоставлены ведомством по запросу и уплате необходимой пошлины. Лучшее понимание характеристик и преимуществ настоящего описания будет получено путем ссылки на последующее подробное описание, которое излагает иллюстративные аспекты, в которых используются принципы описания, и сопроводительные чертежи (также «Рисунок» и «Фиг.» в настоящем документе), из которых:

На **ФИГ. 1** схематически показана установка, содержащая апикальную камеру выше монослоя эпителиальных клеток, и базальную камеру ниже такого монослоя эпителиальных клеток. Для проницаемости от апикальной до базолатеральной (например, трансцитоза), тестируемые изделия (например, носители, конструкции доставки, полезные нагрузки, и т.д.) наносят на апикальную сторону (А), и определяют количество проникнувшего (например, трансцитозированного) материала (например, с применением вестерн-блоттинга, хроматографии и т.д.) на базолатеральную сторону (В).

На **ФИГ. 2** показано, что конструкция доставки с SEQ ID NO: 147, содержащая носитель (SEQ ID NO: 134) и IL-22 полезную нагрузку (SEQ ID NO: 142), транспортирует IL-22 полезную нагрузку через интактный, поляризованный монослой эпителиальных клеток кишечника Сасо-2 времязависимым образом (количество белка на базолатеральном сайте измеряют через 15, 30 и 45 минут после нанесения конструкции доставки на апикальную мембрану монослоя, как описано выше на **ФИГ. 1**). Данные также показывают, что если конструкция доставки (SEQ ID NO: 147), содержащая носитель с SEQ ID NO: 134 и IL-22 полезную нагрузку с SEQ ID NO: 142, нанесена на эпителиальные клетки Сасо-2, примерно в 2-3 раза больше IL-22 пересекают монослой эпителиальных клеток Сасо-2 по сравнению с тем вариантом, когда IL-22 (SEQ ID NO: 143), не связанный с носителем, наносят на эпителиальные клетки Сасо-2.

На **ФИГ. 3** показано, что конструкция доставки с SEQ ID NO: 147, содержащая носитель (SEQ ID NO: 134) и IL-22 полезную нагрузку (SEQ ID NO: 142), дает транспортировку IL-22 полезной нагрузки через интактный и поляризованный монослой эпителиальных клеток кишечника SMI-100 времязависимым образом (количество белка на базолатеральном сайте измеряют через 15, 30 и 45 минут после нанесения конструкции доставки на апикальную мембрану монослоя). Данные также показывают, что если конструкция доставки, содержащая носитель с SEQ ID NO: 134, связанный с IL-22 полезной нагрузкой с SEQ ID NO: 142, нанесена на эпителиальные клетки SMI-100, примерно в 2-3 раза больше IL-22 пересекают монослой эпителиальных клеток SMI-100 по сравнению с тем вариантом, когда IL-22 (SEQ ID NO: 143), не связанный с носителем, наносят на эпителиальные клетки SMI-100.

На **ФИГ. 4** продемонстрировано, что конструкция доставки с SEQ ID NO: 147 дает транспортировку IL-22 (SEQ ID NO: 142) в значительных количествах через интактный и поляризованный эпителий кишечника *in vivo*. Апикальный сайт эпителия кишечника обозначен белой стрелкой #1. Lamina propria сокращен как «l.p.» Внешняя базальная мембрана поляризованного эпителия обозначена белыми стрелками #2. Локализация IL-22 показана белыми стрелками и зеленой флуоресценцией (например, белыми стрелками #3), синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI.

На **ФИГ. 5** показано, что первая конструкция доставки (SEQ ID NO: 147) и вторая конструкция доставки (SEQ ID NO: 148) транспортируют IL-22 полезную нагрузку через монослой Caco-2 («после транспортировки» относится к белку, расположенному в базолатеральном участке после транспортировки через монослой Caco-2). Данные вестерн-блоттинга также показывают, что конструкции доставки были интактными после транспортировки, например, как показано отсутствием низкомолекулярных продуктов разложения. Транспортировка IL-22 полезной нагрузки конструкциями доставки SEQ ID NO: 147 и SEQ ID NO: 148 показана относительно транспортировки IL-22 контрольного белка (SEQ ID NO: 143) в отсутствии носителя. Контрольный белок IL-22 состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 143.

На **ФИГ. 6** показано количество конструкции доставки (SEQ ID NO: 147) и IL-22 (SEQ ID NO: 143), определенное в базолатеральной области монослоев эпителиальных клеток Caco-2 после транцитоза. Количества белка нормализуют. Данные показывают, что транспортировка конструкции доставки (SEQ ID NO: 147), включающей полученный из Cholix носитель (SEQ ID NO: 134) через поляризованные эпителиальные клетки зависит от регулируемого глюкозой белка 75 (GRP75, например, GRP75B). Клетки Caco-2 с нокдауном GRP75 (обозначенные как Caco-2<sup>GRP75<sup>-</sup></sup>) показывают значительно пониженную транспортировку конструкции доставки (SEQ ID NO: 147) по сравнению с клетками, экспрессирующими GRP75 (обозначены как Caco-2). Зависимость транспортировки от GRP75 показана пониженным количеством конструкции доставки, которое определяется в базолатеральных участках в клетках с нокдауном GRP75 по сравнению с клетками, экспрессирующими GRP75. На транспортировку только IL-22 (SEQ ID NO: 143) нокдаун GRP75 не влияет.

На **ФИГ. 7** показано, что транспортировка конструкции доставки (SEQ ID NO: 147) через поляризованные эпителиальные клетки была зависима от специфического к базальной мембране корового белка гепарансульфатпротеогликана (HSPG). Клетки Caco-2 с нокдауном этого белка (обозначенные как Caco-2<sup>HSPG<sup>-</sup></sup>) показали значительно пониженную транспортировку конструкции доставки (SEQ ID NO: 147) по сравнению с клетками, экспрессирующими HSPG (обозначенными как Caco-2). Зависимость транспортировки от HSPG показана пониженным количеством конструкции доставки, которое определяется в базолатеральных участках в клетках с нокдауном HSPG по сравнению с клетками, экспрессирующими HSPG. Транспортировка только IL-22 (SEQ ID NO: 143) (т.е., не связанного с носителем) не зависит от HSPG.

На **ФИГ. 8** изображено определение флуоресцентным микроскопом конструкции доставки (SEQ ID NO: 154) в апикальные участки (обозначенные белой стрелкой #2) в эпителиальных клетках через 15 мин после интралюминальной инъекции с применением модели интралюминальной инъекции на крысах (белая стрелка #1 показывает апикальную поверхность, белая стрелка #3 показывает базальную мембрану, и белая стрелка #4 показывает lamina propria). Данные демонстрируют, что носитель, полученный из примера Cholix<sup>41-187</sup> (например, SEQ ID NO: 137), способен транспортировать полезную нагрузку в апикальные участки эпителиальных клеток, но не через эпителиальные клетки. Красная флуоресценция показывает локализацию носителя Cholix, зеленая флуоресценция показывает локализацию hGH (SEQ ID NO: 146), и синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI.

На **ФИГ. 9** изображено определение флуоресцентным микроскопом конструкции доставки (SEQ ID NO: 156) в апикальные участки (обозначенные белой стрелкой #2) эпителиальных клеток через 15 мин после интралюминальной инъекции с применением модели интралюминальной инъекции на крысах (белая стрелка #1 показывает апикальную поверхность, белая стрелка #3 показывает базальную мембрану, и белая стрелка #4 показывает lamina propria). Данные демонстрируют, что носитель, полученный из примера Cholix<sup>40-205</sup> (например, SEQ ID NO: 138), способен транспортировать полезную нагрузку (например, hGH) в апикальные участки эпителиальных клеток, но не через эпителиальные клетки в lamina propria. Эти данные также позволяют предположить, что остатки 1-39 из SEQ ID NO: 1 могут играть роль в транцитозе, но могут не потребоваться для эндоцитоза носителя Cholix. Красная флуоресценция показывает локализацию носителя Cholix, зеленая флуоресценция показывает локализацию hGH (SEQ ID NO: 146), и синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI.

На **ФИГ. 10А** изображено определение флуоресцентным микроскопом конструкции доставки (SEQ ID NO: 153) в апикальные участки внутри эпителиальных клеток через 5 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки в тощую кишку крысы. На **Фиг. 10А-10С**, красная флуоресценция показывает локализацию носителя Cholix, зеленая флуоресценция показывает локализацию hGH (SEQ ID NO: 146), и синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI; белая стрелка #1 показывает апикальные участки, и белая стрелка #2 показывает надъядерные участки.

На **ФИГ. 10В** изображено определение флуоресцентным микроскопом конструкции доставки (SEQ ID NO: 153) через 10 мин после интралюминальной инъекции. Данные демонстрируют, что носитель транспортирует hGH полезную нагрузку из апикальных участков в надъядерные и базальные участки с течением времени.

На **ФИГ. 10С** изображено определение флуоресцентным микроскопом конструкции доставки (SEQ ID NO: 153) через 15 мин после интралюминальной инъекции. Данные показывают, что носитель транспортирует полезную нагрузку из апикальных участков в надъядерные и базальные участки с течением времени.

На **Фиг. 11А-11В** изображена апикально-базальная транспортировка только

гормона роста человека (hGH, SEQ ID NO: 190) по сравнению с hGH (SEQ ID NO: 146), связанным с носителями. Длины носителя показаны С-концевым усечением относительно эталонной SEQ ID NO: 1 (например, «134» означает носитель, имеющий остатки 1-134 из SEQ ID NO: 1). Все носители дополнительно включают N-концевой метионин). Вестерн-блоттинг для hGH количественно оценивает способность этих белков к апикально-базальной транспортировке через поляризованные монослои первичных эпителиальных клеток тонкого кишечника человека через 2 ч. Количества апикально нанесенных материалов эквивалентно на молярной основе содержанию hGH, и базальные коллекции концентрируют ~10-кратно до анализа.

На **ФИГ. 11А** показано сравнение апикально-базальной транспортировки только hGH (SEQ ID NO: 190) относительно той, которая измерена для конструкций доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 151 - SEQ ID NO: 154 и SEQ ID NO: 159 с усечениями в положениях 134, 151, 187, 41-187 и 266, соответственно. Данные демонстрируют, что носители Cholix с С-концевыми усечениями в положениях 134, 151, 187 из SEQ ID NO: 1 или N-концевым усечением в 41 и С-концевым усечением в 187 из SEQ ID NO: 1, демонстрируют значительно более низкую апикально-базальную транспортировку соединенных hGH по сравнению с конструкцией с носителем Cholix (SEQ ID NO: 159) с С-концевым усечением в 266.

На **ФИГ. 11В** показано, что конструкции доставки с SEQ ID NO: 155 и SEQ ID NO: 157 - SEQ ID NO: 159, и которые включают носители Cholix с С-концевыми усечениями в положениях 206 (SEQ ID NO: 131), 245 (SEQ ID NO: 132), 251 (SEQ ID NO: 133) и 266 (SEQ ID NO: 134), соответственно, по сравнению с SEQ ID NO: 1 продемонстрировали эффективную апикально-базальную транспортировку соединенных hGH (SEQ ID NO: 146). Хотя носители с Cholix С-концевыми усечениями в положениях 245 и 251 демонстрируют апикально-базальную транспортировку соединенного (SEQ ID NO: 146) по сравнению с таковой носителя с С-концевым усечением в положении 266, носитель с Cholix С-концевым усечением в положении 206 показывает значительное улучшение апикально-базальной транспортировки hGH по сравнению с носителями с С-концевыми усечениями в положениях 245, 251 и 266.

На **Фиг. 12А-12F** показана степень апикально-базальной транспортировки через поляризованные эпителиальные клетки кишечника в тощей кишке крысы для шести конструкций доставки, каждая из которых включает разные носители Cholix. Локализация носителя Cholix (красная флуоресценция) и hGH (зеленая флуоресценция) продемонстрирована иммунофлуоресцентной микроскопией с применением поликлональных анти-Cholix и моноклональных анти-hGH антител, соответственно. Белые стрелки показывают апикальную мембрану, «l-p» относятся к lamina propria, «GC» относится к бокаловидным клеткам и полые стрелки показывают конструкцию доставки, присутствующую в lamina propria.

На **ФИГ. 12А** показана степень апикально-базальной транспортировки через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 151),

включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 140), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146). На **ФИГ. 12А** показано, что носитель не позволяет конструкции доставки проникать в эпителиальные клетки, позволяя предположить, что фрагмент функциональной последовательности, имеющий аминокислотные остатки 135-151 из SEQ ID NO: 1, может играть роль в эндоцитозе в поляризованные эпителиальные клетки (наоборот, **ФИГ. 12В** демонстрирует, что носитель с SEQ ID NO: 139 позволяет клеточное проникновение соответствующей конструкции доставки через эндоцитоз).

На **ФИГ. 12В** показана степень апикально-базальной транспортировки через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 152), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 139) связанный с hGH (SEQ ID NO: 146), продемонстрированную иммунофлуоресцентной микроскопией. На **ФИГ. 12В** показано, что конструкция не проникает в эпителиальные клетки (в отличие от конструкции с SEQ ID NO: 151, описанной на **ФИГ. 12А**), но в основном остается в апикальных и, до некоторой степени, в базальных везикулярных пулах, но не проникает в lamina propria, тем самым обеспечивая доставку полезной нагрузки в апикальные и базальные участки эпителиальных клеток.

На **ФИГ. 12С** показана степень апикально-базальной транспортировки через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 153), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 136), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) продемонстрированную иммунофлуоресцентной микроскопией. На **ФИГ. 12С** показано, что эта конструкция проникает в эпителиальные клетки, достигает апикальных и базальных участков, а также достигает надъядерного участка клетки, все еще оставаясь внутри эпителиальной клетки, позволяя предположить, что фрагмент последовательности, состоящий из аминокислотных остатков 152-187 из SEQ ID NO: 1 может позволить доступ и доставку в надъядерные участки, а также позволить локализацию в базальных участках.

На **ФИГ. 12D** показана степень апикально-базальной транспортировки через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 154), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 137), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) продемонстрированную иммунофлуоресцентной микроскопией. На **ФИГ. 12D** показано, что эта конструкция проникает в эпителиальные клетки, но остается в апикальных участках и не похоже, что достигает базальных или надъядерных участков.

На **ФИГ. 12Е** показана степень апикально-базальной транспортировки через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 155), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 131), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) продемонстрированную иммунофлуоресцентной микроскопией. На **ФИГ. 12Е** показано, что эта конструкция завершает процесс транцитоза как показано конструкцией доставки, достигшей lamina propria (см. полную стрелку), позволяя предположить, что фрагмент последовательности, состоящий из аминокислотных остатков 188-206 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, может позволить носителю (и конструкциям, содержащим такой носитель) взаимодействовать с базальными

рециркулирующими процессами, которые позволяют выделять носитель или соответствующую конструкцию из эпителиальных клеток в базолатеральную область (например, *lamina propria*).

На **ФИГ. 12F** показана транспортировка через эпителиальные монослои тощей кишки крысы *in vivo* через 15 мин после интраюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146), продемонстрированную иммунофлуоресцентной микроскопией. На **ФИГ. 12F** показано, что эта конструкция завершает процесс транцитоза, как показано конструкцией доставки, достигшей *lamina propria* (см. полную стрелку).

На **ФИГ. 13A**, **ФИГ. 13B** и **ФИГ. 13C** показано, что конструкции доставки с SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 153, соответственно, колокализованные с Rab11a на апикальной стороне эпителиальных клеток. Данные также показывают, что конструкции с SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 154 не имеют значительной локализации на базальной стороне, но остаются в основном на апикальной стороне. Конструкция с SEQ ID NO: 153 локализуется на обеих, апикальной и базальной стороне, однако, только колокализованные с Rab11a на апикальной стороне и не на базальной стороне (суб-изображения 3a и 3b на **ФИГ. 13C**). Вместе эти результаты позволяют предположить, что носители, которые не способны к транцитозу, могут проникать в апикальные системы рециркулирования эпителиальных клеток. Измерения проводят через 15 мин после интраюминальной инъекции. Зеленая флуоресценция показывает локализацию hGH, красная флуоресценция показывает локализацию Rab11a (или Rab11) и синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI (описание эксперимента включает **ФИГ. 13D**).

На **ФИГ. 13D** показано, что конструкция доставки с SEQ ID NO: 159 колокализована с Rab11a на базальной стороне, но незначительно на апикальной стороне поляризованной эпителиальной клетки. Это позволяет предположить, что носители, способные к транцитозу, могут использовать базальную систему рециркуляции для их выделения из эпителиальной клетки в *lamina propria* (см. суб-изображения 4a и 4b на **ФИГ. 13D**).

На **Фиг. 14A-14C** показаны эффекты нокаута K8, HSPG (перлекан) и GRP75, соответственно, на функцию транцитоза конструкции доставки с SEQ ID NO: 150, которая включает полученный из Cholix носитель с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 134, связанной с hGH через спейсер, последовательность которого указана в SEQ ID NO: 177, по сравнению с только hGH (SEQ ID NO: 190). Стабильные клеточные линии клеток Caco-2, с отсутствием экспрессии определенных кандидатных белков K8 (Caco-2<sup>K8-</sup>), HSPG (Caco-2<sup>HSPG-</sup>) и GRP75 (Caco-2<sup>GRP75-</sup>) применяют в качестве монослоев *in vitro* для подтверждения их вовлечения в транцитоз носителя (например, носители Cholix) через механизмы активной и селективной эндогенной транспортировки.

На **ФИГ. 14A** показано, что нокаут K8 не значительно снижает функцию транцитоза конструкции доставки (SEQ ID NO: 150).

На **ФИГ. 14B** показано, что нокаут HSPG (перлекана) значительно снижает функцию транцитоза конструкции доставки (SEQ ID NO: 150).

На **ФИГ. 14C** показано, что нокаут GRP75 значительно снижает функцию транцитоза конструкции доставки (SEQ ID NO: 150).

На **ФИГ. 15A** показаны связывающие взаимодействия Biacore™, применяемые для проверки pH-зависимости взаимодействий носителя Cholix-GRP75. Для этого, биотин сочетают с С-концом полноразмерного белка Cholix, последовательность которого указана в SEQ ID NO: 1, и затем присоединяют к поверхности (например, поверхности чипа, пластикового 96-луночного планшета и т.д.) с применением биоконъюгирования биотина-стрептавидина и инкубируют с очищенным белком GRP75 в буферных растворах при pH 5,5, 6,5 и 7,5, соответственно. Наивысшая аффинность связывания для этого взаимодействия была измерена при pH 6,5.

На **ФИГ. 15B** показана pH-зависимость взаимодействия полученного из Cholix носителя (SEQ ID NO: 189, полноразмерная последовательность Cholix SEQ ID NO: 1 с делецией остатка глутаминовой кислоты в положении 581) с апикальным рецептором (например, TMEM132, таким как TMEM132A), рецепторами лизосомного избегания (например, GRP75), транзитным рецептором (например, ERGIC-53) и базальным рецептор (например, перлеканом). Эта pH зависимость рецепторного взаимодействия, определенная в анализе плазмонного резонанса, показывает, что полученный из Cholix носитель может взаимодействовать с определенными рецепторами, последовательно зависимыми от их расположения. Например, эти данные показывают, что полученный из Cholix носитель имеет значительно более высокую аффинность к эндоцитозу и ранним рецепторам миграции, таким как апикальный входной рецептор и рецептор лизосомного избегания при pH 7,5. Как только pH упадет до примерно 5,5, аффинность носителя Cholix для этих ранних рецепторов миграции снижается, в то время как его аффинность к апикально-базальному рецептору миграции ERGIC-53 и базальному белку секреции перлекану значительно увеличивается при этом pH, позволяя носителю Cholix быть «переданным» на миграцию и базальным рецепторам секреции во время процесса везикулярного транцитоза.

На **ФИГ. 16** показаны значительные связывающие взаимодействия Biacore™ полноразмерного белка Cholix, последовательность которого указана в SEQ ID NO: 1, с перлеканом и GRP75.

На **ФИГ. 17** показаны значительные связывающие взаимодействия Biacore™ полноразмерного белка Cholix, последовательность которого указана в SEQ ID NO: 1, с GRP75, перлеканом и TMEM132A.

На **Фиг. 18A-18D** показана судьба гормона роста человека (hGH, SEQ ID NO: 190), который вводят интралюминальной инъекцией (ILI, люминальная поверхность обозначена белой стрелкой на **ФИГ. 18A - ФИГ. 18F**) в тощую кишку крысы in vivo, которую оценивают сначала как отрицательный контроль, ожидая транспортировки в лизосомы после клеточного поглощения.

На **ФИГ. 18А** показано, что локализация hGH (SEQ ID NO: 190) через 15 минут после инъекции (ILI) ограничена до небольшой популяции везикул в апикальной области эпителиальных клеток, как показано определением зеленой иммунофлуоресценции.

На **ФИГ. 18В, ФИГ. 18С и ФИГ. 18D** показано, что через 15 мин после ILI, hGH (SEQ ID NO: 190) колокализуется с ассоциированным с лизосомой мембранным белком 1 (LAMP1, красная флуоресценция) (**ФИГ. 18В**) и Ras-родственным белком (Rab7, пурпурная флуоресценция) (**ФИГ. 18С**) с примерно той же частотой и характеристиками резидентных LAMP1<sup>+</sup>, Rab7<sup>+</sup> лизосом (**ФИГ. 18D**), показывая, что hGH направлен на путь разрушения лизосомы (например, рециркулирование) сразу же после поглощения в эпителиальные клетки.

На **ФИГ. 18Е и ФИГ. 18F** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 159), которая включает полученный из Cholix носитель (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) через спейсер (SEQ ID NO: 175), направлена от лизосомного пути и, следовательно, не демонстрирует колокализацию с любым из LAMP1 (**ФИГ. 18Е**) или Rab7 (**ФИГ. 18F**), тем самым позволяя транцитоз функциональной полезной нагрузки через поляризованные эпителиальные клетки в lamina propria.

На **ФИГ. 19А** показано, что распределение оболочечного белка I (COP1, красная флуоресценция) ограничена люминальной апикальной мембраной и апикальным везикулярным участком эпителиальных клеток до люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), в которой применяется полученный из Cholix носитель (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) через спейсер (SEQ ID NO: 175). Для сравнения, после апикальной интралюминальной инъекции (ILI, люминальная поверхность обозначена белой стрелкой на **ФИГ. 19А - ФИГ. 19D**) конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), на **ФИГ. 19В** показано, что COP1 перераспределяется до надъядерной локации, показывая колокализацию везикул, содержащих и конструкцию доставки с SEQ ID NO: 159, и COP1. Синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI. Измерения на **Фиг. 19А - 19D** проводят через 15 минут после ILI.

На **ФИГ. 19С** показано, что LMAN1 (зеленая флуоресценция), колокализованный с COP1 (красная флуоресценция) в апикальной области (обозначенной белой стрелкой) поляризованных эпителиальных клеток до инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 159).

На **ФИГ. 19D** показано, что после апикальной ILI (обозначенной белой стрелкой) конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), LMAN1 взаимодействует и распределяется с конструкцией доставки до базальной области эпителиальной клетки, которая является соседней к lamina propria (обозначенной как «l-p»). Таким образом, похоже, что механизм распределения LMAN1 применяется носителями Cholix для движения из апикальной стороны эпителиальной клетки в базальный участок.

На **Фиг. 19Е-19Н** показана миграция носителя Cholix (SEQ ID NO: 134) из апикального (показанного белой стрелкой #1) в базальный (показанный белой стрелкой #2) участки в эпителиальных клетках через 5 (**ФИГ. 19F**), 10 (**ФИГ. 19G**) и 15 мин (**ФИГ.**

**19H)** после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), содержащей полученный из Cholix носитель (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146), в тощую кишку крысы. Локализация носителя Cholix показана зеленой флуоресценцией, локализация ERGIC показана красной флуоресценцией, и локализация другого маркера ERGIC, который может играть роль в апикально-базальной миграции (также называемого в настоящем документе комплекс ER-Гольджи с белком миграции) показана пурпурной флуоресценцией; таким образом, взаимодействие носителя Cholix и ERGIC рецептора показано желтой флуоресценцией, взаимодействие носителя Cholix и комплекса ER-Гольджи с белком миграции показано розовой флуоресценцией, и взаимодействие и/или колокализация носителя Cholix, ERGIC рецептора и комплекса ER-Гольджи с белком миграции показана белыми пятнами (наложение зеленой, красной и пурпурной флуоресценции). Окрашивание DAPI показано синей флуоресценцией.

На **ФИГ. 19E** показаны необработанные поляризованные эпителиальные клетки кишечника.

На **ФИГ. 19F** показана локализация и взаимодействие носителя Cholix (SEQ ID NO: 134) с комплексом ER-Гольджи с белком миграции через 5 минут после люминальной инъекции в апикальный участок, как показано сигналом розовой флуоресценции в апикальных участках.

На **ФИГ. 19G** показана миграция носителя Cholix (SEQ ID NO: 134) в ассоциации с ERGIC-53 в базальную мембрану через 10 минут после люминальной инъекции с последующим базальным выделением носителя (и конструкции) в lamina propria (золотая стрелка). Эти данные демонстрируют, что полученный из Cholix носитель может использовать специфические взаимодействия с ERGIC белками (например, ERGIC-53) для «похищения» везикулярной миграции от апикального к базальному участкам поляризованной эпителиальной клетки.

На **ФИГ. 19H** показаны количества носителя Cholix (SEQ ID NO: 134), присутствующего в lamina propria через 15 минут после люминальной инъекции.

На **Фиг. 19I-19K** показано, что носитель Cholix (SEQ ID NO: 134) применяет механизмы секреции базального белка для миграции через поляризованную эпителиальную клетку в lamina propria. Изображения флуоресцентного микроскопа получают через 15 мин после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), содержащей полученный из Cholix носитель (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) в тощую кишку крысы, и они показывают, что базальные везикулы (обозначенные белыми кругами и цифрами «1-3» в разных эпителиальных клетках) могут содержать носитель Cholix и ERGIC-53 рецептор, носитель Cholix и белок базальной секреции или все три из носителя Cholix, ERGIC рецептора и белка базальной секреции. Локализация носителя Cholix показана зеленой флуоресценцией (с применением антитела против носителя Cholix), локализация ERGIC-53 рецептора показана красной флуоресценцией, и локализация белка базальной секреции показана пурпурной флуоресценцией; таким образом, взаимодействие носителя Cholix и ERGIC-53 рецептора

показано желтой флуоресценцией, взаимодействие носителя Cholix и белка базальной секреции перлекана показано розовой флуоресценцией, и взаимодействие и/или колокализация носителя Cholix, ERGIC-53 рецептора и перлекана показано белыми пятнами (наложение зеленой, красной и пурпурной флуоресценции). Окрашивание DAPI показано синей флуоресценцией.

На **ФИГ. 19I** показано, что базальный участок везикул содержит носитель Cholix (SEQ ID NO: 134) и ERGIC-53 рецептор, как показано желтой флуоресценцией.

На **ФИГ. 19J** показано, что базальный участок везикул содержит носитель Cholix (SEQ ID NO: 134) и перлекан, как показано розовой флуоресценцией.

На **ФИГ. 19K** показано, что базальный участок везикул содержит носитель Cholix (SEQ ID NO: 134), ERGIC-53 рецептор и перлекан, как показано белыми пятнами (например, наложением зелено, красной и пурпурной флуоресценции).

На **ФИГ. 20A** показано распределение другого эндоплазматического элемента ретикулум-Гольджи-промежуточный участок (ERGIC), SEC22b, при отсутствии конструкции доставки (SEQ ID NO: 159). В необработанных (т.е., без инъекции конструкции доставки) тканях, SEC22b и LMAN1 обширно колокализуются в апикальном участке, а только LMAN1 отдельно наблюдается рядом с апикальной мембраной плазмы. На **Фиг. 20A-20D**, красная флуоресценция показывает локализацию LMAN1, пурпурная флуоресценция показывает локализацию SEC22b, зеленая флуоресценция показывает локализацию hGH, белая стрелка показывает апикальную поверхность и «G» означает Бокаловидные клетки.

На **ФИГ. 20B** показано, что через 5 минут после ILI конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146), LMAN1, SEC22b и hGH колокализуются в апикальном участке, но не значительно в базальных участках эпителиальных клеток.

На **ФИГ. 20C** показано, что через 10 мин после ILI, наблюдается, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 159) и LMAN1 колокализуются в базальном участке эпителиальных клеток без SEC22b, подтверждая, что LMAN1 взаимодействует и движется с конструкцией доставки внутри везикулы из апикального в базальный везикулярный участок эпителиальных клеток.

На **ФИГ. 20D** показано, что степень колокализации конструкции доставки (SEQ ID NO: 159) и LMAN1 в базальном участке через 15 мин после ILI повышается, при повышении количества hGH, достигающего lamina propria с течением времени.

На **ФИГ. 20E - ФИГ. 20H** показаны те же срезы тканей, как описаны выше и показаны на **ФИГ. 20A - ФИГ. 20D**, но демонстрирующие только LMAN1 и SEC22b сигналы (без hGH сигнала). Это демонстрирует значительное перераспределение LMAN1 в базальный участок без перераспределения SEC22b в ответ на апикальное применение доставки (SEQ ID NO: 159). Эти данные демонстрируют, что конструкции доставки, содержащие полученный из Cholix носитель, могут использовать эндогенные пути миграции Cholix, которые позволяют быструю и эффективную транспортировку полезной

нагрузки через эпителий кишечника через связывание такой полезной нагрузки с носителем.

На **Фиг. 21А - 21Е** показана типовая поверхностная модель полученного из CholiX носителя, состоящего из SEQ ID NO: 178 (включает аминокислотные остатки 1-265 из SEQ ID NO: 1 и N-концевой метионин), который применяют для подчеркивания выбранных областей, представляющих интерес, которые могут играть роль в определенных функциональностях, связанных с апиально-базальным транцитозом, а также их относительное положение и близость на поверхности белка. Области аминокислот, расположенные в пределах остатков V<sup>1</sup> и E<sup>39</sup> являются соседними к доступным на поверхности аминокислотам D<sup>150</sup>-K<sup>186</sup> и K<sup>186</sup>-L<sup>205</sup>. Более конкретно, L<sup>17</sup>-I<sup>25</sup> (область X1, SEQ ID NO: 160) и T<sup>170</sup>-I<sup>176</sup> (область X2, SEQ ID NO: 161) координируются с образованием кармана, окруженного несколькими отрицательными зарядами. Аналогично, K<sup>186</sup>-H<sup>202</sup> (область X3, SEQ ID NO: 162) координируется с I<sup>31</sup>-E<sup>39</sup> (область X4, SEQ ID NO: 163) с образованием непрерывной гребневой структурой. Кроме того, поверхностная модель показывает остатки D<sup>135</sup>-N<sup>139</sup> (область X5, SEQ ID NO: 164) и аспарагиновые остатки (например, потенциальные сайты гликозилирования), выделенные пурпурным.

На **ФИГ. 21А** показана аминокислотная последовательность CholiX полипептида с SEQ ID NO: 178.

На **ФИГ. 21В** показано расположение областей X1, X3 и X4.

На **ФИГ. 21С** показано расположение областей X1 и X2, а также X3 и X4.

На **ФИГ. 21D** показано расположение областей X1, X2, X4 и X5.

На **ФИГ. 21Е** показано расположение областей X1, X2, X3, X4 и X5.

На **Фиг. 22А - 22L** показан анализ пути миграции для полученной конструкции доставки (SEQ ID NO: 149). Конструкция доставки содержит полученный из CholiX носитель (SEQ ID NO: 135), связанный с активной секретированной формой IL-10 (SEQ ID NO: 145) через глицин-сериновый спейсер (SEQ ID NO: 176). На **Фиг. 22А - 22L** белая стрелка #1 показывает апиальную поверхность, белая стрелка #2 показывает базальную поверхность и белая стрелка #3 показывает lamina propria.

На **ФИГ. 22А** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) сильно колокализована с EEA1 антигеном в клеточных локациях, согласующихся с миграцией на обоих, апиальном и базальном участках эпителиальных клеток, позволяя предположить присутствие полученной из CholiX конструкции доставки в ранних эндосомальных участках. Красная флуоресценция показывает локализацию EEA1 антигена и зеленая флуоресценция показывает локализацию IL-10.

На **ФИГ. 22В** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) сильно колокализована с Rab7 (наверху слева) преимущественно в апиальном участке эпителиальных клеток, но только с ограниченной колокализацией в клетках в lamina propria, позволяя предположить присутствие полученной из CholiX конструкции доставки в поздних эндосомальных участках (снизу слева показано изображение белого света и

снизу справа показано слившееся окрашивание DAPI, показанное голубым, красная флуоресценция показывает локализацию EEA1 антигена и зеленая флуоресценция показывает локализацию IL-10).

На **ФИГ. 22С** показано, что LAMP1 идентифицирован в больших, специфических везикулах, согласующихся со зрелыми лизосомами, которые лишены конструкции доставки (SEQ ID NO: 149) (белые стрелки, красная флуоресценция показывает локализацию EEA1 антигена и зеленая флуоресценция показывает локализацию IL-10). Конструкция доставки (SEQ ID NO: 149), однако, колокализована с LAMP1 антигеном в клеточных локациях, отличных от лизосомоподобных структур, согласуясь с миграцией везикул на обоих, апикальном и базальном участках эпителиальных клеток, позволяя предположить присутствие полученной из CholiX конструкции доставки в поздних эндосомальных участках.

На **ФИГ. 22D** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) также сильно колокализована с покрытыми клатрином везикулами, особенно в областях, соседних к ядру, и с Rab11a преимущественно в базальном участке эпителиальных клеток, а также в выбранных клетках в lamina propria. Окрашивание DAPI показано синим, красная флуоресценция показывает локализацию IL-10 антигена, и зеленая флуоресценция показывает локализацию клатрина.

На **ФИГ. 22Е** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) колокализована с эндоплазматическим ретикулумом, что показано кальнексином (красная флуоресценция показывает локализацию кальнексина, и зеленая флуоресценция показывает локализацию IL-10) в шаблоне, соседнем к ядру в эпителиальных клетках, и большой доле клеток в lamina propria. Более конкретно, конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) сильно колокализована с эндоплазматическим элементом ретикулум-Гольджи-промежуточный участок (ERGIC) и LMAN1 антигеном, вероятно перераспределенным в ответ на эндоцитоз и транцитоз носителя, как показано через 5 (**ФИГ. 22F**), 10 (**ФИГ. 22G**) и 15 минут после инъекции (**ФИГ. 22H**).

На **ФИГ. 22F** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) сильно колокализована с эндоплазматическим элементом ретикулум-Гольджи-промежуточный участок 53 (ERGIC-53) и LMAN1 антигеном (красная флуоресценция показывает локализацию ERGIC-53 и LMAN1 и зеленая флуоресценция показывает локализацию IL-10, синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI), вероятно перераспределенным в ответ на эндоцитоз и транцитоз носителя, как показано через 5 минут после инъекции.

На **ФИГ. 22G** показана конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) колокализованная с LMAN1 антигеном через 10 минут после инъекции. Данные показывают значительную локализацию конструкции доставки (SEQ ID NO: 149) в lamina propria.

На **ФИГ. 22H** показана конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) колокализованная с LMAN1 антигеном через 15 минут после инъекции. Данные показывают значительную локализацию конструкции доставки (SEQ ID NO: 149) в lamina propria.

На **ФИГ. 22I** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) не

колокализуется с низкими уровнями гиантина, присутствующего в эпителиальных клетках (красная флуоресценция показывает локализацию IL-10 и зеленая флуоресценция показывает локализацию гиантина, синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI). Некоторое количество гиантина, колокализованного с конструкцией в подмножестве клеток, присутствующих в *lamina propria*, позволяет предположить, что полученный из CholiX носитель не локализуется с участком Гольджи.

На **ФИГ. 22J** показано, что 58K антиген локализован в эпителиальных клетках на сайте, апиальном к ядру, и конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) показала некоторую колокализацию (красная флуоресценция показывает локализацию IL-10 и зеленая флуоресценция показывает локализацию антигена 58K Гольджи, синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI) с этим белком так, что можно предположить краткое движение через этот участок. 58K антиген не наблюдается в клетках в *lamina propria*.

На **ФИГ. 22K** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149, сверху слева, IL-10 локализация) показала некоторый уровень колокализации с TGN38 антигеном (сверху справа), которая показала клеточное распределение, которое ограничено апиальной стороной ядра в эпителиальных клетках, и является соседним к ядру в некоторых клетках в *lamina propria*. Изображение слева снизу показывает изображение белого света, показывающее слияние (наложение) с сигналом IL-10 (красный), TGN38 (зеленый) и DAPI (синяя флуоресценция).

На **ФИГ. 22L** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) (IL-10 локализация показана зеленой флуоресценцией, сверху справа) сильно колокализована с Rab11a (сверху слева, локализация показана красной флуоресценцией) преимущественно в базальном участке эпителиальных клеток и в выбранных клетках в *lamina propria*. Изображение слева снизу показывает изображение белого света, и снизу справа показывает слияние (наложение) с сигналом IL-10 (зеленый), Rab11a (красный) и DAPI (синяя флуоресценция).

На **Фиг. 23A - 23C** показаны микроскопические изображения, показывающие транцитоз IL-10 через поляризованные эпителиальные клетки кишечника у крыс Wistar в разные моменты времени после люминального применения конструкции доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 149, в тощую кишку крысы. Конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) включает носитель с SEQ ID NO: 135, связанный с IL-10 полезной нагрузкой, имеющей аминокислоту, указанную в SEQ ID NO: 145, через спейсер, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 176. Зеленая флуоресценция показывает присутствие IL-10 (через окрашивание анти-IL-10 антителом). Синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI, которое метит ДНК, и красная флуоресценция показывает присутствие СК-8 (цитокератина-8) с которым полученный из CholiX носитель может колокализоваться (например, в надъядерной области эпителиальной клетки) во время транцитоза. Белые стрелки #1 показывают апиальную мембрану эпителиальных клеток, и белые стрелки #2 показывают базальную мембрану эпителиальных клеток.

На **ФИГ. 23А** показана степень транцитоза IL-10 через одну минуту после люминального применения конструкции доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 149, в тощую кишку крысы. Данные показывают, что транспортировка IL-10 полезной нагрузки из апикального в базальный сайт и в lamina propria происходит не позже 1 минуты после применения конструкции доставки. Белая стрелка #3 показывает присутствие IL-10 в lamina propria (см., например, белые стрелки #3).

На **ФИГ. 23В** показана степень транцитоза IL-10 через пять минут после люминального применения конструкции доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 149, в тощую кишку крысы. Данные показывают повышенное количество транспортированной IL-10 полезной нагрузки, которая присутствует в lamina propria (см., например, белые стрелки #3) через 5 минут после люминального применения конструкции доставки.

На **ФИГ. 23С** показана степень транцитоза IL-10 через десять минут после люминального применения конструкции доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 149 в тощую кишку крысы. Данные показывают даже большее количество транспортированной IL-10 полезной нагрузки, которая присутствует в lamina propria (см., например, белые стрелки #3) через 10 минут после люминального применения конструкции доставки.

На **Фиг. 23D - 23F** показан апикальный эндоцитоз и ранняя миграция носителя Cholix с SEQ ID NO: 135 в эпителиальных клетках через 1 мин после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 149), содержащей носитель Cholix с SEQ ID NO: 135, связанный с IL-10 (SEQ ID NO: 145) в тощей кишке крысы. Данные показывают, что полученные из Cholix носители не избегают пути лизосомного разрушения через взаимодействие с рецепторами лизосомного избегания. Локализация носителя Cholix показана зеленой флуоресценцией, локализация апикального входного рецептора TMEM132 показана красной флуоресценцией; и локализация рецепторов лизосомного избегания показана пурпурной флуоресценцией; тем самым, взаимодействие носителя Cholix и апикального входного рецептора TMEM132 показано желтой флуоресценцией, взаимодействие носителя Cholix и рецептора лизосомного избегания показано розовой флуоресценцией, и взаимодействие и/или колокализация носителя Cholix, апикального входного рецептора TMEM132 и рецептора лизосомного избегания показана белыми пятнами (наложение зеленой, красной и пурпурной флуоресценции). Окрашивание DAPI показано синей флуоресценцией.

На **ФИГ. 23D** показана локализация носителя Cholix (SEQ ID NO: 135) на апикальной мембране (показанная белой стрелкой #1) поляризованной эпителиальной клетки. Базальная мембрана показана белой стрелкой #2 и lamina propria показана белой стрелкой #3.

На **ФИГ. 23Е** показано взаимодействие носителя Cholix (SEQ ID NO: 135) с апикальным входным рецептором TMEM132, как показано желтой флуоресценцией на и вокруг апикальной мембраны.

На **ФИГ. 23F** показано, что носитель Cholix (SEQ ID NO: 135), апикальный входной рецептор TMEM132 и рецептор лизосомного избегания находятся в непосредственной близости от апикальной мембраны, как показано белыми пятнами (например, наложением зеленой, красной и пурпурной флуоресценции), показанной белой стрелкой. Предполагают, что рецептор лизосомного избегания (GRP75) может сближать комплекс носитель Cholix-апикальный входной рецептор с последующей диссоциацией носителя Cholix с апикальным входным рецептором TMEM132 и ассоциацией носителя Cholix с рецептором лизосомного избегания GRP75 из-за изменений в pH среде и pH-зависимости этого взаимодействия носитель Cholix-рецептор, как показано, например, на **ФИГ. 15B**.

На **Фиг. 23G - 23H** показана миграция носителя Cholix (SEQ ID NO: 135) из апикального в надъядерный участки в эпителиальных клетках через 5 и 15 мин после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 149), содержащей полученный из Cholix носитель (SEQ ID NO: 135), связанный с IL-10 (SEQ ID NO: 145) в тощей кишке крысы. Локализация носителя Cholix показана зеленой флуоресценцией, локализация ERGIC рецептора показана красной флуоресценцией, локализация апикального входного рецептора (например, TMEM132) показана оранжевой флуоресценцией; и локализация рецептора лизосомного избегания показана пурпурной флуоресценцией; таким образом, взаимодействие носителя Cholix и ERGIC рецептора показано желтой флуоресценцией, взаимодействие носителя Cholix и рецептора лизосомного избегания показано розовой флуоресценцией, и взаимодействие и/или колокализация носителя Cholix, апикального входного рецептора и рецептора лизосомного избегания показана белыми пятнами (наложение зеленой, красной и пурпурной флуоресценции). Окрашивание DAPI показано синей флуоресценцией.

На **ФИГ. 23G** показана локализация носителя Cholix (SEQ ID NO: 135) в поляризованных эпителиальных клетках кишечника через 5 минут после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 149). Данные показывают, что после опосредованного апикальным рецептором эндоцитоза, носитель Cholix образует комплексы с рецептором лизосомного избегания и апикальным входным рецептором близко к апикальной мембране (показанной белыми пятнами (наложение зеленой, красной и пурпурной флуоресценции) и обозначенной белой стрелкой) и также начинает взаимодействие с ERGIC рецептором, что показано желтой флуоресценцией (и желтой стрелкой) незначительно ближе к надъядерным областям в клетке.

На **ФИГ. 23H** показана локализация носителя Cholix (SEQ ID NO: 135) в поляризованных эпителиальных клетках кишечника через 15 минут после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 149). Данные показывают, что носитель движется из апикального в надъядерные участки при ассоциации с ERGIC (см. желтую стрелку), где интенсивность желтой флуоресценции повышается по сравнению с 5 минутами после инъекции, показывая движение носителя Cholix из апикальной в надъядерные области с течением времени. Данные также показывают локализацию

носителя Cholix на базальной мембране и в lamina propria (золотые стрелки).

На **ФИГ. 24** показана диаграмма элементов внутриклеточного участка (например, клеточные области, участки и рецепторы, такие как партнеры взаимодействия рецептора транспортировки (или TRIP) носителей), вовлеченных к апикальный к базальному транцитоз носителей, описанных в настоящем документе. Процесс транцитоза схематически описан для 15-минутного курса. Например, полученные из Cholix носители, способные к транцитозу, могут или не могут значительно проникать в лизосомы или апикальный путь рециркуляции после эндоцитоза (например, как изображено рециркулирующими эндосомами или «RE»). Перераспределение COPI и LMAN1, но не SEC22b, после апикального нанесения полученного из Cholix носителя, а также доступ в сети рециркулирования базального участка показаны как характеристики пути полученных из Cholix носителей. Таким образом, полученные из Cholix носители, описанные в настоящем документе, могут применять ряд внутриклеточных везикулярных участков для прохождения через поляризованные эпителиальные клетки кишечника, которое может завершиться апикальным к базальному транцитозом и позволить таким носителям быстро и эффективно (например, по меньшей мере, 5%, 10%, 20%, 25% или 50% продукта, нанесенного на апикальную поверхность) доставлять полезную нагрузку (например, терапевтические белки) в lamina propria.

На **ФИГ. 25** показано, что оба полученных из Cholix<sup>386</sup> носителя (например, SEQ ID NOs: 135 или 180) и полученного из Cholix<sup>415</sup> носителя (например, содержащего остатки 1-415 из SEQ ID NO: 1) транспортируют анти-TNF $\alpha$  агент (например, анти-TNF $\alpha$  антитело или его функциональный фрагмент) через эпителиальные клетки кишечника через 10 минут и 40 минут. Более того, Cholix<sup>386</sup>-анти-TNF $\alpha$  конструкция транспортирует со скоростью примерно 12х от скорости только анти-TNF- $\alpha$  и Cholix<sup>415</sup>-анти-TNF $\alpha$  транспортирует со скоростью ~7х от скорости только анти-TNF- $\alpha$ .

На **ФИГ. 26** показана чистота SEQ ID NO: 192-Экзенатида (SEQ ID NO: 192 поперечно сшитого с Экзенатидом (SEQ ID NO: 195)) проводимая на окрашенном Coomassie Blue SDS-PAGE геле.

На **ФИГ. 27** показан *in vivo* транцитоз Экзенатида, поперечно-сшитого с носителями SEQ ID NO: 191 или SEQ ID NO: 192 через тощую кишку крыс Sprague Dawley. Количество (в пМ) транспортировки Экзенатида через ткани кишечника измеряют через 10 минут и 40 минут после обработки. Данные показывают, что оба SEQ ID NO: 191-Экзенатид и SEQ ID NO: 192-Экзенатид способны транспортировать с более высокой скоростью, чем только Экзенатид через 10 минут и 40 минут.

На **ФИГ. 28A** показано, что длина аминокислотных спейсеров с SEQ ID NOs: 175, 196 и 197 не влияет на способность IL-22 (SEQ ID NO: 142) при включении в конструкции доставки с SEQ ID NOs: 147, 198 и 199 для того чтобы вызвать димеризацию IL-22 рецептора. Индукция димеризации рецептора контрольным рекомбинантным IL-22 человека (rhIL-22, SEQ ID NO: 143) показана черной кривой.

На **ФИГ. 28B** показано, что сочетание IL-22 полезной нагрузки (SEQ ID NO: 142) с

N- или C-концом носителя, содержащего аминокислотные остатки 1-266 из SEQ ID NO: 1 через спейсер с SEQ ID NO: 196 значительно не меняет способность конструкций доставки с SEQ ID NOs: 198, 200 и 201 вызывать димеризацию IL-22 рецептора. Индукция димеризации рецептора контрольным рекомбинантным IL-22 человека (rhIL-22) показана черной кривой.

На **ФИГ. 28C** показано, что длина аминокислотных спейсеров с SEQ ID NOs: 175, 196 и 197 не влияет на способность IL-22 (SEQ ID NO: 142) при включении в конструкции доставки с SEQ ID NOs: 147, 198 и 199, вызывать активацию pSTAT3. Активация pSTAT3 контрольным рекомбинантным IL-22 человека (rhIL-22, SEQ ID NO: 143) показана черной кривой.

На **ФИГ. 28D** показано, что сочетание IL-22 полезной нагрузки (SEQ ID NO: 142) с N- или C-концом носителя, содержащего аминокислотные остатки 1-266 из SEQ ID NO: 1 через спейсер с SEQ ID NO: 196 не изменяет значительно способность конструкций доставки с SEQ ID NOs: 198, 200 и 201 вызывать активацию pSTAT3. Активация pSTAT3 контрольным рекомбинантным IL-22 человека (rhIL-22) показана черной кривой.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

### **I. Введение**

В настоящем документе представлены, в определенных вариантах осуществления, конструкции доставки (например, комплекс носитель-полезная нагрузка), способные транспортировать одну или несколько молекул гетерологичной полезной нагрузки (например, одну или несколько терапевтических полезных нагрузок) в эпителиальные клетки (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника), например, эндоцитозом или через эпителиальные клетки (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника) через, например, трансцитоз. Конструкции доставки могут содержать носитель, который связан с гетерологичной полезной нагрузкой. Носитель может быть способен транспортировать гетерологичную полезную нагрузку в или через эпителиальные клетки с применением эндогенных путей миграции. Применение эндогенных путей миграции, в отличие от применения пассивной диффузии, может позволить носителю доставлять гетерологичную полезную нагрузку быстро (например, по меньшей мере,  $10^{-6}$  см/сек,  $10^{-5}$  см/сек) и эффективно (например, по меньшей мере, 5%, 10%, 20%, 25% или 50% от продукта, нанесенного на апикальную поверхность) в или через эпителиальные клетки, не ухудшая барьерную функцию этих клеток или биологическую активность гетерологичной полезной нагрузки.

### **II. Носители**

Носителем в конструкции доставки, представленной в настоящем документе, может быть любая молекула (например, малая молекула, полипептид, нуклеиновая кислота и т.д.), способная повышать скорость и/или количество гетерологичной полезной нагрузки (например, терапевтической полезной нагрузки), доставляемой в и/или через эпителий.

Носитель в настоящем документе может иметь множество признаков. В некоторых

вариантах осуществления, носитель в настоящем документе может иметь пониженную (например, по меньшей мере, на 50% пониженную) или удаленную активность рибозилирования ADP (например, рибозилирования фактора элонгации 2) относительно существующего в природе Cholix полипептида, такого как SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления, носитель в настоящем документе использует эндогенный путь миграции для транспортировки гетерологичной полезной нагрузки, связанной с ним, через поляризованную эпителиальную клетку. Такой носитель может быть назван в настоящем документе трансцитозирующий носитель, может использовать эндогенный путь миграции для транспортировки гетерологичной полезной нагрузки, связанной с ним, в поляризованную эпителиальную клетку. Такой носитель может быть назван в настоящем документе эндоцитозирующий носитель. Среди эндоцитозируемых носителей могут быть носители, которые доставляют полезную нагрузку, связанную с ним, в определенные области в поляризованных эпителиальных клетках, такие как апикальный участок, надъядерный участок или базальный участок.

Любой из носителей в настоящем документе может транспортировать молекулы, связанные с ним, путем взаимодействия и/или колокализации с одним или несколькими эндогенными белками такого эпителия. Один или несколько эндогенных белков могут быть рецепторами или ферментами, способными перемещать носитель в или через эпителиальную клетку. Взаимодействие и/или колокализация с одним или несколькими эндогенными белками эпителиальной клетки может обеспечивать носитель одной или несколькими функциями, включая эндоцитоз в эпителиальную клетку, избегание пути лизосомного разрушения, миграцию из апикального участка в базальный участок и/или экзоцитоз из базальной мембраны эпителиальной клетки в подслизистый участок, такой как *lamina propria*.

Взаимодействие такого носителя с эндогенным белком может быть селективным взаимодействием. Такое селективное взаимодействие может быть pH-зависимым взаимодействием. В случаях, когда носитель взаимодействует с двумя или несколькими эндогенными белками, такие взаимодействия могут быть последовательными взаимодействиями, где первый взаимодействующий белок передает носитель второму взаимодействующему белку. Такие последовательные взаимодействия могут происходить при разных pH (например, pH 5,5, 7,0, 7,5, и т.д.). Взаимодействие между носителем и эндогенным белком может быть ковалентным или не ковалентным взаимодействием. Не ковалентные взаимодействия включают водородное связывание, взаимодействия ванн дер Ваальса, ионные связи  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействия и т.д.

В некоторых случаях, один из эндогенных белков, с которым может взаимодействовать носитель, может быть апикальным входным рецептором. Таким апикальным входным рецептором может быть трансмембранный белок 132 (TMEM132). Взаимодействие носителя с таким апикальным входным рецептором может позволить носителю проникнуть в эпителиальную клетку через рецептор-опосредованный эндоцитоз.

Носитель также может взаимодействовать с рецептором лизосомного избегания. Такое взаимодействие с рецептором лизосомного избегания может происходить внутри эпителиальной клетки и после эндоцитоза. Рецептором лизосомного избегания может быть регулируемый глюкозой белок 75 (GRP75, например, GRP75B). Взаимодействие носителя с таким рецептором лизосомного избегания может позволить носителю избежать или обойти лизосомное разложение. Такая способность может позволить носителю значительно снизить количество полезной нагрузки, связанной с носителем, достигающей лизосомы клетки, судьбы, с которой сталкивается большинство терапевтических белков, будучи захваченными эпителием кишечника.

Кроме того, носитель может взаимодействовать с белком апикально-базальной миграции. Такое взаимодействие может возникать внутри эпителиальной клетки и после эндоцитоза. Таким белком апикально-базальной миграции может быть белок эндоплазматического элемента ретикулум-Гольджи-промежуточный участок (ERGIC), такой как ERGIC-53. Взаимодействие носителя с ERGIC белком может позволить носителю передвигаться из апикального участка в надъядерный участок или базальный участок.

Трансцитозирующий носитель также может взаимодействовать с белком базальной секреции, способным способствовать экзоцитозу носителя из базального сайта эпителиальной клетки. Такое взаимодействие может возникать на базальном сайте эпителиальной клетки и после движения из апикального участка в базальный участок. Таким белком базальной секреции может быть перлекан (также названный в настоящем документе специфическим к базальной мембране гепарансульфатпротеогликановым коровым белком или HSPG). Взаимодействие носителя с перлеканом может позволить носителю достигать базальной системы рециркулирования, которая позволяет выделять носитель из базального участка в подслизистый участок, такой как *lamina propria*.

Таким образом, трансцитозирующим носителем в настоящем документе может быть молекула, которая способна взаимодействовать с эндогенными белками TMEM132 (например, TMEM132A), GRP75 (например, GRP75B), ERGIC (например, ERGIC-53) и перлеканом (HSPG), что позволяет такому носителю транспортировать молекулу полезной нагрузки, связанной с ним, через поляризованный эпителий, например, поляризованный эпителий кишечника.

Эндоцитозирующий носитель в настоящем документе может быть молекулой, которая способна взаимодействовать с эндогенным белком TMEM132, позволяя апикальный вход такого носителя. Эндоцитозирующий носитель может оставаться ассоциированным с TMEM132 после эндоцитоза (например, по сравнению с трансцитозирующим носителем, который может диссоциировать из TMEM132 после эндоцитоза для взаимодействия с, например, GRP75 или ERGIC белком) и внутри апикальных областей и участков клетки (например, поляризованной эпителиальной клетки). В некоторых случаях, такой эндоцитозирующий носитель также может взаимодействовать с GRP75. Такие взаимодействия с TMEM132 и/или GRP75 могут

позволить носителю и полезной нагрузке, связанной с ним, избежать или, по меньшей мере, значительно снизить (например, менее чем на примерно 50% по сравнению с молекулой полезной нагрузки, когда она не связана с носителем), лизосомное разложение. В некоторых случаях, эндоцитозирующий носитель может оставаться в апикальном участке и не показывать значительную транслокацию в базальный участок, в течение, например, по меньшей мере, примерно 5, 10, 15, 30, 60 или 120 минут после апикального (например, люминального) нанесения носителя по сравнению с транцитозирующим носителем, который может демонстрировать полный транцитоз практически всех апикально нанесенных молекул, например, примерно через 5, 10, 15 или 30 минут после апикального (например, люминального) нанесения. В некоторых случаях, по меньшей мере, примерно 50%, 75% или 90% молекул носителя остается в апикальных участках через 5 минут после люминального применения носителя. В некоторых случаях, по меньшей мере, примерно 50%, 75% или 90% молекул носителя остается в апикальных участках через 10 минут после люминального применения носителя. В некоторых случаях, по меньшей мере, примерно 50%, 75% или 90% молекул носителя остается в апикальных участках через 15 минут после люминального применения носителя. В некоторых случаях, по меньшей мере, примерно 50%, 75% или 90% молекул носителя остается в апикальных участках через 30 минут после люминального применения носителя. Доля молекул носителя, которые остаются в апикальном участке эпителиальной клетки, может быть определена делением интенсивности сигнала флуоресценции, измеренного в базальном участке клетки, на интенсивность сигнала флуоресценции, измеренного в апикальном участке клетки в соответствующий момент времени.

В других случаях, эндоцитозирующий носитель, который способен транспортировать полезную нагрузку в надъядерный или базальный участок, может взаимодействовать с ERGIC белком и/или другим комплексом ER-Гольджи с белком миграции, который может позволить носителю достигать таких участков внутри эпителиальной клетки.

Эндоцитозирующим или транцитозирующим носителем может быть полипептид. Такой носитель может быть получен из полипептида, секретированного бактерией, такой как *Vibrio cholerae* (в настоящем документе, получен из Cholix полипептида). Носителем может быть химерный полипептид, полученный из двух или нескольких разных бактериальных полипептидов. Такие два или несколько разных бактериальных полипептидов могут быть получены из двух или нескольких бактерий (например, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* и т.д.), и/или получен из двух или нескольких разных штаммов бактерий (например, двух или нескольких разных штаммов *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* и т.д.).

Носителем может быть природно или не природно полученный полипептид из полипептида, секретированного такой бактерией.

Не существующие в природе полипептиды могут включать те, которые имеют C-и/или N-концевую модификацию.

В одном примере, полипептид содержит одно или несколько аминокислотных замещений, и/или одну или несколько аминокислотных делеций, и/или одно или несколько аминокислотных добавлений относительно выравнивания последовательности с существующим в природе полипептидом (например, SEQ ID NO: 3) или относительно выравнивания последовательности с консенсусной последовательностью (например, SEQ ID NO: 130).

Примеры замещений, рассматриваемых в настоящем документе, включают консервативные замещения одной или нескольких аминокислот. Следующие шесть групп содержат аминокислоты, которые являются консервативными замещениями друг для 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); и (6) Фенилаланин (F), Тирозин (Y) и Триптофан (W).

Дополнительно или альтернативно, мутации в носителе, рассматриваемом в настоящем документе, включают одну или несколько из: V1L, L1V, D3E, E4A, E581A, и т.д., например, относительно последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 1, 2 или 130 (число означает положение аминокислоты, буква перед числом означает модифицированную аминокислоту и буква после числа означает замененную аминокислоту). В некоторых случаях, носитель содержит валин в положении 1, лейцин в положении 1, аспарагиновую кислоту в положении 3, глутаминовую кислоту в положении 3, глутаминовую кислоту в положении 4 или аланин в положении 4 в носителе (нумерация относительно положений в SEQ ID NO: 1).

Примеры делеций включают N-концевые усечения и C-концевые усечения.

В настоящем документе, если C-концевое усечение упоминается как встречающееся «в» положении аминокислоты, такая аминокислота включается в усеченный полипептид. Когда N-концевое усечение упоминается как встречающееся «в» положении аминокислоты, такая аминокислота исключается из усеченного полипептида. Например, в одном случае, носитель содержит SEQ ID NO: 1 с C-концевым усечением в положении 386. Такой носитель заканчивается у аминокислоты 386 (A) из SEQ ID NO: 1 на ее С конце. Дополнительно, вышеупомянутый носитель может быть дополнительно усечен в положении 20 на его N-конце, тем самым имея N-концевую аминокислоту пролин (P) (которая находится в положении 21 в контрольной последовательности SEQ ID NO: 1).

N-концевые усечения включают такие, которые удаляют до 10, 20, 30, 39 или 40 аминокислот на N-конце последовательности CholiX в настоящем документе (например, любой из SEQ ID NO: 1-3 или 130). C-концевые усечения могут быть такими, как указаны в настоящем документе. Такие N- и/или C-концевые усечения могут приводить к разным функциям. Усечения могут быть описаны относительно последовательности дикого типа (например, SEQ ID NO: 3), относительно не существующей в природе последовательности (например, SEQ ID NO: 1) или относительно консенсусной последовательности

(например, SEQ ID NO: 130), где остатки пронумерованы от N-конца до С-конца, начиная с положения 1 и заканчивая N-концом. Например, носитель с С-концевым усечением в положении 266 относительно SEQ ID NO: 1 содержит аминокислотные остатки 1-266 из SEQ ID NO: 1.

Примеры добавлений включают: последовательность сигнального пептида, последовательность пептида очистки или другие N-концевые модификации. Последовательность сигнального пептида может содержать от 1 до примерно 40 аминокислот. В некоторых случаях носитель содержит N-концевой метионин. Термин «примерно», используемый в настоящем документе в контексте числового значения или диапазона, обычно означает  $\pm 10\%$ ,  $9\%$ ,  $8\%$ ,  $7\%$ ,  $6\%$ ,  $5\%$ ,  $4\%$ ,  $3\%$ ,  $2\%$  или  $1\%$  числового значения или диапазона, указанного или заявленного, если не указано иное.

Носитель может иметь существенную идентичность последовательности (например, примерно или более  $50\%$ ,  $60\%$ ,  $70\%$ ,  $80\%$ ,  $90\%$ ,  $95\%$ ,  $98\%$  или  $99\%$  идентичность последовательности или  $100\%$  идентичность последовательности) к существующему в природе полипептиду (например, SEQ ID NO: 3), не существующему в природе полипептиду (например, SEQ ID NO: 1-2) или любому из функциональных фрагментов, описанных в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 160-168).

Термин «идентичность последовательности» или доля (%) идентичности последовательности, в настоящем документе, относится к доле остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны остаткам в выбранной последовательности, после выравнивания последовательностей введения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной доли идентичности последовательности, и не рассматривая какие-либо консервативные замещения как часть идентичности последовательности. Выравнивание для целей определения доли идентичности аминокислотной последовательности может быть проведено разными путями, которые находятся в компетенции специалиста в данной области техники, например, с применением общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Специалист в данной области техники сможет определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Носитель (например, эндоцитозирующий или трансцитозирующий носитель) в настоящем документе может быть получен из полипептида, секретированного из бактерии *Vibrio cholerae* (например, такого, который содержит последовательность по любой из SEQ ID NOs: 3-125 или 127-129). Такой носитель может быть назван полученным из Cholix полипептидом. Носитель, полученный из Cholix полипептида, может включать существующие и не существующие в природе последовательности Cholix полипептида, а также последовательности, которые имеют, по меньшей мере, примерно  $75\%$ ,  $80\%$ ,  $85\%$ ,  $90\%$ ,  $95\%$ ,  $98\%$ ,  $99\%$  или  $100\%$  идентичность последовательности к существующему в природе (например, SEQ ID NO: 3-78) или не существующему в природе (например, SEQ

ID NO: 1-2) Cholix полипептиду, описанному в настоящем документе. Носитель, полученный из Cholix полипептида, также может включать эндоцитозирующиеся и/или трансцитозирующиеся фрагменты (например, N- и/или C-концевые усечения Cholix полипептида) существующих и не существующих в природе последовательностей Cholix полипептида, где такие эндоцитозирующиеся и/или трансцитозирующиеся фрагменты могут иметь, по меньшей мере, примерно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности к любой из таких существующих или не существующих в природе последовательностей Cholix полипептида.

В **ТАБЛИЦЕ 1** представлены типовые полноразмерные Cholix и полученные из Cholix последовательности.

**ТАБЛИЦА 1 - Типовые последовательности Cholix полипептида**

| SEQ ID NO    | Аминокислотная последовательность                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Описание                                                 |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 1 | VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAWHTGLALCWLVPMDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSDLRRINENNPMTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISTKPPYKERKDELK | Не<br>существующ<br>ий в природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 2 | LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAWHTGLALCWLVPMDAIYNYIT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Не<br>существующ<br>ий в природе<br>Cholix<br>полипептид |



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                       |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|              | SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVP<br>IDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITV<br>KQGIEQKPVEQRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLET<br>LARSRKPRDLRDDLSLAYQAQNIVSLFVATRILFSHL<br>DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGRMVTQV<br>LTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLF<br>CPDADKPCVASNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVI<br>TPQGVNTWNTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNH<br>VAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAE<br>VAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPR<br>ASLERFYRTNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTG<br>PESAGGEDETIGWDMIAHAVAIPSTIPGNAYEELAI<br>DEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK                                                                                                                                                                                                             |                                                       |
| SEQ ID NO: 5 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM汀INDEQNDIMDEGKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPAGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIQKQSIASWPS<br>VSYKAAQKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPIDAI<br>YNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGI<br>EQKPVEQRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARS<br>RKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVF<br>TLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGRMVTQVLTVA<br>RQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDA<br>DKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV<br>TNWNTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQ<br>TIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHG<br>YARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE<br>RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESA<br>GGEDETIGWDMIAHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEAA<br>VAKEQSISTKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 6 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPAGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix               |

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                       |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|              | DNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDE<br>QEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVA<br>SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAAEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYERLTPAEEAVVKEAI<br>AKEQSIKAPPYKEQKDELK                                                                                                                                                                      | полипептид                                            |
| SEQ ID NO: 7 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDE<br>QEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVA<br>SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAAEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYERLTPAEEAVVKEAI<br>AKEQSIKAPPYKEQKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 8 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKQIQSKLSIPSDVVLDE<br>EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Существую<br>щий в<br>природе                         |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                       |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | AINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK<br>AAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLTDLLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSALRQINENNNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISTKPPYKERKDELK                                                                                                                              | Cholix<br>полипептид                                  |
| SEQ ID NO: 9  | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM TINDEQN DIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHVYNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLTDLLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSDLRRINENNNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISAKPPYKERKDELK | Существуя<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 10 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM TINDEQN DIKDEDKGESIITIGEFATVRAT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Существуя<br>щий в                                    |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSDLRRINENNPGRMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVSTHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISTKPPYKERKDELK                                                                                    | природе<br>Cholix<br>полипептид                       |
| SEQ ID NO: 11 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>TDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDE<br>QEPEVAERLSALRQINENNPGRMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVA<br>SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWY<br>QELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISTKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 12 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Существую                                             |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                      |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|               | GVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDE<br>QEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVA<br>SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIHRASLERFYRTN<br>TPLENAAEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISTKPPYKERKDELK                                            | щй в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид              |
| SEQ ID NO: 13 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDE<br>QEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVA<br>SDNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAAEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISTKPPYKERKDELK | Существуя<br>щй в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                       |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 14 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDE<br>QEPEVAERLSALRQINENNPGRMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLIPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVAS<br>NNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQ<br>ELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAP<br>VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGT<br>GEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTP<br>LENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVI<br>GWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSIG<br>AKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 15 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDE<br>QEPEVAERLSALRQINENNPGRMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLIPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVAS<br>NNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQ<br>ELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAP<br>VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGT<br>GEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTP<br>LENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVI<br>GWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSIG                  | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | AKPPYKEQKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                       |
| SEQ ID NO: 16 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRMLFSHLDSVFTLNLD<br>EQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYN<br>DYVTHHPGLIPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCV<br>ASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWT<br>YQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNR<br>IAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK<br>EGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRT<br>NTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDE<br>TVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQ<br>SISAKPPYKEQKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 17 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLD<br>QEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVA<br>SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARLK<br>KGTGNAELPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRT<br>NTPLENAEEHITHVIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDE                                                               | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                       |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | TVIGWDMIAHAVAIPSTIPGNAYEVLAIDEEAVAEQ<br>SISAKPPYKERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                       |
| SEQ ID NO: 18 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM TINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVP IGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQ TLEQWKTQGNVFFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDE<br>QEPEVTERLSALRQINENNP GMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVA<br>SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIHRASLERFYRTN<br>TPLENAAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMIAHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISTKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 19 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM TINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVP IGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQ TLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDE<br>QEPAVAERLSALRQINENNP GMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVA<br>SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN                                                                                                       | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                       |
| SEQ ID NO: 20 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLD<br>QEPAVAERLSALRQINENNPMTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVA<br>LNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWTY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 21 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>TDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLD<br>QAPEVAERLSALRQINENNPVVVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVA<br>SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWTY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE                                                                                                                                            | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                       |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | GTGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKEQKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |
| SEQ ID NO: 22 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM TINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKTVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>TDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLEE<br>QEPEVAERLSALRQINENNP GMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVA<br>SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAEEHITDVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKEQKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 23 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM TINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAIMVKQGIEQKPV<br>EQRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRY<br>LPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLD<br>EQEPEVAERLSALRQINENNP GMVTQVLTVARQIYN<br>DYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCV<br>ASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWT<br>YQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNR                                                                                                                                                                                      | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                       |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | IAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK<br>EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRT<br>NTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDE<br>TVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQ<br>SISPKPPYKERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                       |
| SEQ ID NO: 24 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKDGEFA<br>INWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDE<br>QEPAVAERLSAIRQINENNPGRMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVA<br>SDNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISTKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 25 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKDGEFA<br>INWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDE<br>QEPEVAERLSALRQINENNPGRMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKHCV<br>SNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWY                                                                                                                                                                                                                             | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                       |
| SEQ ID NO: 26 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWRTGLALCWLVPMDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>EEQEPEVAERLSALRQINENNPMTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISTKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 27 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSNGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSDLRRINENNPMTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC                                                                                                                                                                                                                                                                      | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISTKPPYKERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |
| SEQ ID NO: 28 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSDLRRINENNPMTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLLNRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISTKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 29 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYIT<br>QKNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSDLRRINENNPMTQVLTVARQIY                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                       |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISAKPPYKEQKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |
| SEQ ID NO: 30 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM TINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDE<br>QEPEVAERLSALRQINENNP GMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVA<br>SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW TY<br>QELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIYAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKEQKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 31 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM TINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | QEPAVAERLSALRQINENNNPGMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVA<br>SNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKEQKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                       |
| SEQ ID NO: 32 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLDVSFTLNL<br>DEQEPEVAERLSDLRRINENNNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTW<br>TYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIYAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISAKPPYKEQKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 33 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYIT<br>QKNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | DLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISTKPPYKERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                       |
| SEQ ID NO: 34 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKTVE<br>QRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>TDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLEE<br>QEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYND<br>YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVA<br>SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWY<br>QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br>APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br>GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br>TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDET<br>VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br>ISTKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 35 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                      |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|               | <p>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br/> PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLD<br/> QEPEVAERLSALRQINENNPGRMTQVLTVARQIYND<br/> YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVA<br/> SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTY<br/> QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br/> APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br/> GTGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br/> TPLENAAEHITDVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br/> VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br/> ISAKPPYKEQKDELK</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                      |
| SEQ ID NO: 36 | <p>VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br/> GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br/> RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br/> HWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br/> DNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br/> AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br/> QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKTVE<br/> QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br/> TDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLEE<br/> QEPEVAERLSALRQINENNPGRMTQVLTVARQIYND<br/> YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVA<br/> SNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTY<br/> QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI<br/> APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE<br/> GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN<br/> TPLENAAEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br/> VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQS<br/> ISTKPPYKERKDELK</p> | <p>Существую<br/> щий в<br/> природе<br/> Cholix<br/> полипептид</p> |
| SEQ ID NO: 37 | <p>VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br/> GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATIRATR<br/> HYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br/> NWLVPAGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br/> DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br/> AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYIT</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <p>Существую<br/> щий в<br/> природе<br/> Cholix<br/> полипептид</p> |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                       |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSDLRRINENNNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISAKPPYKEQKDELK                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                       |
| SEQ ID NO: 38 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITFGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPAGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSDLRRINENNNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISTKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 39 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDE<br>EGVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFA<br>INWLVPAGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                       |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | AQKEGSRHKRWAWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTNLNDGQ<br>EPEVAERLDDLRRINENNNPGMVIQVLTVARQIYNDY<br>VTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVAS<br>NSDQANINIESRSGRSYLPENRAVITQQGVTNWTYQ<br>ELEATHQALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSIVNRISP<br>VPRGSDTESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEGT<br>ADGGGLTPAERKARGVMLRVYLPQASLERFYRINA<br>DLEKERNLVERVIGHPLPLRNEAFTGTDAEEGSDDET<br>AIGWDMAIHGVAIPSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKEQKDELK                                                                                                                                                                                                                 |                                                       |
| SEQ ID NO: 40 | VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK<br>AAQKEGSRHKRWAWHTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLHDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSALRQINENNNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISTKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 41 | VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSID                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix               |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                       |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK<br>AAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASDNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISTKPPYKERKDELK                                                                                                                                                                        | полипептид                                            |
| SEQ ID NO: 42 | VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK<br>AAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQNIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISTKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 43 | VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Существую<br>щий в<br>природе                         |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                       |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | AINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK<br>AAQKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSALRQINENNNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDIAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQ<br>SISTKPPYKERKDELK                                                                                                                             | Cholix<br>полипептид                                  |
| SEQ ID NO: 44 | VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK<br>AAQKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSALRQINENNNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPC<br>VASNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMIAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISAKPPYKERKDELK | Существуя<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 45 | VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Существуя<br>щий в                                    |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                      |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|               | TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK<br>AAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKKNAMETLAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPC<br>VASNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISAKPPYKERKDELK                                                                                     | природе<br>Cholix<br>полипептид                      |
| SEQ ID NO: 46 | VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK<br>AAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPC<br>VASNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISAKPPYKEQKDELK | Существу<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 47 | VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Существу                                             |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|               | EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK<br>AAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKKNAMETLAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLHDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSALRQINENNPMTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPC<br>VASNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISAKPPYKEQKDELK                                          | щй в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид              |
| SEQ ID NO: 48 | VEDELNIFDECRSPCLLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIASWPSVSYK<br>AAHKNGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLHDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSALRQINENNPMTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPC<br>VASNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSISAKPPYKEQKDELK | Существую<br>щй в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                       |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 49 | VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVIPGEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSID<br>LDNQTTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK<br>AAQKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSKKNAMETLAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPC<br>VASNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW<br>TYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAEAREARGVMLRVYIPRASLERFYR<br>TNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED<br>ETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKE<br>QSIKAKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 50 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAI<br>NWLVPAGEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYG<br>DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>KKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDL<br>CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEV<br>AERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH<br>HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND<br>QANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWNTYQELEA<br>THQALTREDYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG<br>NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEY<br>GLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLEN<br>AEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGWDM<br>MAIHAVAIPSTIPGNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQS                     | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                       |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | ISAKPPYKERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                       |
| SEQ ID NO: 51 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYG<br>DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>QKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC<br>CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEV<br>AERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH<br>HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND<br>QANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEA<br>THQALTREDYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG<br>NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEY<br>GLPTRAEQETRGMVLRVYIPRASLERFYRTNTPLEN<br>AEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWD<br>MAIHAVAIPSTIPGNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQS<br>ISAKPPYKEQKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 52 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSIDLD<br>NQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAA<br>HKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGD<br>DWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK<br>KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC<br>AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVA<br>ERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA<br>NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATH<br>QALTREDYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN<br>NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL<br>PTRAEQETRGMVLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE<br>HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAI                                                          | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | HAVAIPSTIPGNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISA<br>KPPYKERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                       |
| SEQ ID NO: 53 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSIDLD<br>NQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAA<br>HKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGD<br>DWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK<br>KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC<br>AYQAQNIVSLFVATRILFSLDVSFTLNLDEQEPEVA<br>ERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA<br>NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTNWTYQELEATH<br>QALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN<br>NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL<br>PTRAEQETRGMVLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE<br>HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAI<br>HAVAIPSTIPGNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISA<br>KPPYKEQKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 54 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSIDLD<br>NQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAA<br>HKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGD<br>DWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK<br>KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC<br>AYQAQNIVSLFVATRILFSLDVSFTLNLDEQEPEVA<br>ERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA<br>NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTNWTYQELEATH<br>QALTREDYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN<br>NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL<br>PTRAEQETRGMVLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE                                                                                                   | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAI<br>HAVAIPSTIPGNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISA<br>KPPYKEQKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                       |
| SEQ ID NO: 55 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM TINDEQN DIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSIDLD<br>NQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAA<br>HKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGD<br>DWHGGAYKTVAGIPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK<br>KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC<br>AYQAQNIIVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDEQEPEVA<br>ERLSALRQINENNP GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA<br>NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNW TYQELEATH<br>QALTREDYV FVG YHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN<br>NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL<br>PTRAEQETRGM LRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE<br>HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAI<br>HAVAIPSTIPGNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISA<br>KPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 56 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM TINDEQN DIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSIDLD<br>NQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAA<br>HKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGD<br>DWHGGAYKTVAGIPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK<br>KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC<br>AYQAQNIIVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDEQEPEVA<br>ERLSALRQINENNP GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA<br>NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNW TYQELEATH<br>QALTREDYV FVG YHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN<br>NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL                                                                                                                                            | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                      |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|               | <p>PTRAEQETRGMRLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE<br/> HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDEVIGWDMAI<br/> HAVAIPSTIPGNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISA<br/> KPPYKEQKDELK</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                      |
| SEQ ID NO: 57 | <p>VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLD<br/> EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br/> TRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFA<br/> INWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br/> DNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIASWPSVSYKA<br/> AHKNGSRHKRWANWLTTLPEVVLCFFEDPELCTYG<br/> DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br/> KKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDL<br/> CAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQEPEVA<br/> ERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHP<br/> GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNSDQA<br/> NINIESRSGRSYLPENRAVITQQGVNTWYQELEATH<br/> QALTQEGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN<br/> NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL<br/> PTRAEQETRGMRLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE<br/> HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDEVIGWDMAI<br/> HAVAIPSTIPGNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISA<br/> KPPYKEQKDELK</p> | <p>Существую<br/> щий в<br/> природе<br/> Cholix<br/> полипептид</p> |
| SEQ ID NO: 58 | <p>VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLD<br/> EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br/> TRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSFNRKEGEF<br/> AINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSID<br/> LDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIASWPSVSYK<br/> AAQKDGARHKRWAHWHTGLALCWLVPDLAIYNYI<br/> TQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGMEQK<br/> PVEQRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARGRKP<br/> RDLTDDLQCAVQAQNVSLFLATRILFSLDVSFTLN<br/> LDEQEPEVAERLTDLRRINENNPGMVTQVLTARQIY<br/> NDYVTEHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADESC<br/> VASNSDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWY<br/> YQELEAKHQTLTREGYVFGYHGTNHVAAQSIVNRI</p>                                                                                                                                                                                               | <p>Существую<br/> щий в<br/> природе<br/> Cholix<br/> полипептид</p> |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                       |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | TPVPRGNTEKEEEEWGGVYVATHAELAHRYARIKE<br>GTGENGLPTTEEEKKSRGVMLRVYLPRASLERFYRTN<br>IPLENADEHVTQVIGHPLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>AIGWDMAIHGVAIPSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKEHDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                       |
| SEQ ID NO: 59 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSFNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIASWPSVSYK<br>AAQKDGARHKRWAHWHTGLALCWLVPPLDAIYNYI<br>TQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGMEQK<br>PVEQRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARGRKP<br>RDLTDDLQCA YQAQNIVSLFLATRILFSLDSDVFTLN<br>LDEQEPEVAERLTDLRRINENNP GMVTQVLT IARQIY<br>NDYVTEHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADESC<br>VASNSDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWT<br>YQELEAKHQTLTREGYVFGYHGTNHVAAQSIVNRI<br>TPVPRGNTEKEEEEWGGVYVATHAEVNHRYARIKE<br>GTGENGLPTTEEEKKSRGVMLRVYLPRASLERFYRTN<br>IPLENADEHVTQVIGHPLPLRNEAFTGPESAGGEDET<br>AIGWDMAIHGVAIPSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKEHDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 60 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSFNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIASWPSVSYK<br>AAQKDGARHKRWAHWHTGLALCWLVPPLDAIYNYI<br>TQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGMEQK<br>PVEQRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARGRKP<br>RDLTDDLQCA YQAQNIVSLFLATRILFSLDSDVFTLN<br>LDEQEPEVAERLTDLRRINENNP GMVTQVLT IARQIY<br>NDYVTEHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADESC<br>VASNSDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWT                                                                                                                                                                                                                            | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                       |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | YQELEAKHQTLTREGYVFGYHGTNHVAAQSIVNRI<br>TPVPRGNNTKEKEEWGGVYVATHAELAHRYARIKE<br>GTGENGLPTTEKKKSRGVMLKVYLPRASLERFYRTN<br>IPLENADEHVTQVIGHPLPLRNEAFTGPESAGGENET<br>AIGWDMAIHGVAIPSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKEHDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                       |
| SEQ ID NO: 61 | VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPAGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSID<br>LDNQTLQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYK<br>AAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTY<br>GDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIH<br>FSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDD<br>LSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEP<br>EVAERLSALRQINENNPMTQVLTVARQIYNDYVT<br>HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNN<br>DQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTNWTYQELE<br>ATHQALTREDYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPR<br>GNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGE<br>YGLPTRAEQETRGMVLRVYIPRASLERFYRTNTPLE<br>NAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGW<br>DMAIHAVAIPSTIPGNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQ<br>SISAKPPYKEQKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 62 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVIPGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSIDLD<br>NQTLQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAA<br>HKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGD<br>DWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK<br>KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC<br>AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVA<br>ERLSALRQINENNPMTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA                                                                                                                                                                                                                                                                   | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                       |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQELEATH<br>QALTREDYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN<br>NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL<br>PTRAEQETRGMRLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE<br>HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAI<br>HAVAIPSTIPGNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISA<br>KPPYKERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                       |
| SEQ ID NO: 63 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDE<br>EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSFNRKEGEF<br>AINWLVIPGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYK<br>AAQKDGARHKRWAWHTGLALCWLVPDLAIYNYI<br>TQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGMEQK<br>PVEQRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARGRKP<br>RDLTDDLQCAVQAQNVSLFLATRILFSHLDSVFTLN<br>LDEQEPEVAERLTDLRRINENNPGMVTQVLTARQIY<br>NDYVTEHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADESC<br>VASNSDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWY<br>QELEAKHQTLTREGYVFGYHGTNHVAAQSIVNRI<br>TPVPRGNNTKEKEEWGGVYVATHAELAHRYARIKE<br>GTGENGLPTTEKKSRGMRLRVYLPRASLERFYRTN<br>IPLENADHVTQVIGHPLPLRNEAFTGPESAGGEDE<br>AIGWDMAIHGVAIPTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQS<br>ISAKPPYKEHDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 64 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAI<br>NWLVPAGEDSPASIKISVDELQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYG<br>DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>KKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLDPDDL<br>CAYQAQNVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEV<br>AERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                       |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND<br>QANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQEELEA<br>THQALTREGYVVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG<br>NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEY<br>GLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLEN<br>AEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIVIGWD<br>MAIHAVAIPSTIPGNA YEELAIDEEAVAKEQSISTKPP<br>YKERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                       |
| SEQ ID NO: 65 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYG<br>DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>KKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDL<br>CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEV<br>AERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH<br>HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND<br>QANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQEELEA<br>THQALTREDYVVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG<br>NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEY<br>GLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLEN<br>AEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIVIGWD<br>MAIHAVAIPSTIPGNA YEELAIDEEAVAKEQSISTKPP<br>YKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 66 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEQSIAISWPSVSYNA<br>AHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYG<br>DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>KKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDL<br>CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                      |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|               | <p>AERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH<br/> HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND<br/> QANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELE<br/> ATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPR<br/> GNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGE<br/> YGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLE<br/> NAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGW<br/> DMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKP<br/> PYKERKDELK</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                      |
| SEQ ID NO: 67 | <p>VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br/> GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br/> RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br/> NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br/> DNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIASWPSVSYKA<br/> AHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYG<br/> DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br/> KKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDL<br/> CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEV<br/> AERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH<br/> HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND<br/> QANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEA<br/> THQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG<br/> NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGNG<br/> GLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLEN<br/> AEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWD<br/> MAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPP<br/> YKEQKDELK</p> | <p>Существую<br/> щий в<br/> природе<br/> Cholix<br/> полипептид</p> |
| SEQ ID NO: 68 | <p>VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br/> GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br/> RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br/> NWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSIDLD<br/> NQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIASWPSVSYKAA<br/> HKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGD<br/> DWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK<br/> KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <p>Существую<br/> щий в<br/> природе<br/> Cholix<br/> полипептид</p> |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                      |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|               | AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVA<br>ERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA<br>NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATH<br>QALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN<br>NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL<br>PTRAEARDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE<br>EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDM<br>AIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPY<br>KERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                      |
| SEQ ID NO: 69 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKMYSYNRKEGEFA<br>INWLVPAGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYG<br>DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>KKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDL<br>CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEV<br>AERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH<br>HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND<br>QANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEA<br>THQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG<br>NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEY<br>GLPTRAEARDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLEN<br>AEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWD<br>MAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPP<br>YKERKDELK | Существо<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 70 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSM汀INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEEPELCTYG<br>EDWHGGAYKTVAGTPEAITVKQGIEQKTVEQRIHFS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Существо<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                      |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|               | KKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLQDDLS<br>CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDQEPAV<br>AERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH<br>HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND<br>QANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEA<br>THQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG<br>NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEY<br>GLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLEN<br>AEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWD<br>MAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSSISAKPP<br>YKEQKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                      |
| SEQ ID NO: 71 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVD<br>EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFA<br>INWLVPAGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIASWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWLTTLPEVVLCFFEDPELCTYG<br>DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>KKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLS<br>CAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQEPEVA<br>ERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNSDQA<br>NINIESRSGRSYLPENRAVITQQGVTNWTYQELEATH<br>QALTQEGYVFGYHGTNHVAAQSIVNRISPVPRGSD<br>TESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEGTADGGGL<br>TPAERKARGVMLRVYLPQASLERFYRINADLEKERN<br>LVERVIGHPLPLRNEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMA<br>IHGVAIPSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQSSISAKPPYK<br>EQKDELK | Существо<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 72 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVD<br>EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFA<br>INWLVPAGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIASWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWLTTLPEVVLCFFEDPELCTYG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Существо<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>KKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDL<br>CAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQEPEVA<br>ERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>LLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNSDQA<br>NINIESRSGRSYLPENRAVITQQGVNTWNTYQELEATH<br>QALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSIVNRISPVPRGSD<br>TESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEGTADGGGL<br>TPAERKARGVMLRVYLPQASLERFYRINADLEKERN<br>LVERVIGHPLPLRNEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMA<br>IHGVAIPSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYK<br>EQKDELK                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                       |
| SEQ ID NO: 73 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFA<br>INWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWLTTLPEVVLCFFEDPELCTYG<br>DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>KKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDL<br>CAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQEPEVA<br>ERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNSDQA<br>NINIESRSGRSYLPENRAVITQQGVNTWNTYQELEATH<br>QALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSIVNRISPVPRGSD<br>TESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEGTADGGGL<br>TPAERKARGVMLRVYLPQASLERFYRINADLEKERN<br>LVERVIGHPLPLRNEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMA<br>IHGVAIPSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYK<br>EQKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 74 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLFIPGDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | AAHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTY<br>GDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIH<br>FSKKNAIEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDL<br>SCAYQAQNIVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDEQEPA<br>VAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT<br>HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNN<br>DQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELE<br>ATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPR<br>GNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGE<br>YGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLE<br>NAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGW<br>DMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKP<br>PYKERKDELK                                                                                                                                                                                                               |                                                       |
| SEQ ID NO: 75 | VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPAGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYK<br>AAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTY<br>GDDWYGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIH<br>FSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDD<br>LSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDEQEP<br>EVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT<br>HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDTDKSCVASNN<br>DQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELE<br>ATHQALTREDYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPR<br>GNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGE<br>YGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLE<br>NAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGW<br>DMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKP<br>PYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 76 | VEDELKIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPAGEDSPASIKISVDELQQRNIIEVPKLYSIDL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix               |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                       |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | DNQTLEQWENQGNVSAVTRPEQSIASWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYG<br>DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>KKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLS<br>CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEV<br>AERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH<br>HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND<br>QANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEA<br>THQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG<br>NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEY<br>GLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLEN<br>AEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGWD<br>MAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSSISAKPP<br>YKEQKDELK                                                                                                                                                                        | полипептид                                            |
| SEQ ID NO: 77 | VEDELKIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSAVTRPEQSIASWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYG<br>DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>KKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLS<br>CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQAPEV<br>AERLSDLRRINEDNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH<br>HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND<br>QANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEA<br>THQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG<br>NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEY<br>GLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLEN<br>AEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGWD<br>MAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSSISAKPP<br>YKEQKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 78 | VEDELKIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Существую<br>щий в<br>природе                         |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                       |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYG<br>DDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKAVEQRIHF<br>SKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDL<br>SCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDQEPE<br>VAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT<br>HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNN<br>DQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELE<br>ATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPR<br>GNNTEEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGN<br>GGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLE<br>NAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDEVIGW<br>DMAIYAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKP<br>PYKEQKDELK                                                                                                                    | Cholix<br>полипептид                                  |
| SEQ ID NO: 79 | TPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTINDEQND<br>IKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLD<br>ITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISI<br>DELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFS<br>VTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAWHWT<br>GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETV<br>AGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAH<br>RVCVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLF<br>LATRILFTHIDSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINEN<br>NPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA<br>AADILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYL<br>PENRAVITQQGVTNWTYQELEATHQALTQEGYVFGY<br>GYHGTNHVAAQSIVNRISPVRGSDTESERAWGGLY<br>VSTDASVAYGYARIQEGTADGGGLTPAERKARGVM<br>LRVYLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGHPLPL<br>RNEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPSTIPGN<br>SYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 80 | SIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI<br>GEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYS<br>YNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNII                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Существую<br>щий в<br>природе                         |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                       |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI<br>SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVP<br>IDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITV<br>KQGIEQKPVEQRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLET<br>LARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL<br>DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQV<br>LTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLF<br>CPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVIT<br>PQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNH<br>VAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAE<br>VAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIP<br>RASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFT<br>GPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELA<br>IDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK                                                                                                                 | Cholix<br>полипептид                                  |
| SEQ ID NO: 81 | MTINDEQNDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYVNQ<br>DAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI<br>GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE<br>QWENQGNVSFAVTRPEQSIQKQSIASWPSVSYKAA<br>QKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQ<br>NCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ<br>RIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLT<br>DDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQ<br>EPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDY<br>VTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVAS<br>NNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWTYQ<br>ELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP<br>VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGT<br>GEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNT<br>PLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVI<br>GWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSIS<br>TKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 82 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFTINWLVPIGEDSPASI<br>KISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix               |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                       |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | VSFAVTRPEQSIQKQSIASWPSVSYKAAQKEGSRHK<br>RWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNW<br>FGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKNA<br>MEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQ<br>AQNIVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDEQEPEVAERLS<br>DLRRINENNPGRMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTP<br>EQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIE<br>SRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALT<br>REGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENE<br>EKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE<br>RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQ<br>VIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIIGWDMAIHAVA<br>IPS                                                                                                                                                                        | полипептид                                            |
| SEQ ID NO: 83 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSFVAVTRPEQSIQKQSIASWPSVSYKAAQKEGSRH<br>KRWAWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGD<br>NWFSGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSK<br>KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSC<br>AYQAQNIVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDEQEPEVA<br>ERLSALRQINENNPGRMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA<br>NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATH<br>QALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN<br>NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL<br>PTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE<br>EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDM<br>AIHAVAIPS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 84 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSFVAVTRPEQSIQKQSIASWPSVSYKAAQKEGSRH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | KRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDN<br>WFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKK<br>NAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCA<br>YQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAE<br>RLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA<br>NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATH<br>QALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN<br>NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL<br>PTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE<br>EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDM<br>AIHAVAIPS                                                                                                                                                                                                           |                                                       |
| SEQ ID NO: 85 | MTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQ<br>DAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI<br>GEDSPASIKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLE<br>QWENQGNVSFAVTRPEQSAISWPSVSYKAAHKNGS<br>RHKRWANWLTTLPKVVLFCFYEDPELCTYGDDWHG<br>GAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKAVEQRIHFSKKNAM<br>EALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSA<br>LRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES<br>RSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTR<br>EGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRAER<br>ETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIYAVAI<br>PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSSAKPPYKEQKDE<br>LK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 86 | MTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGDFATVRATRHYVNQ<br>DAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI<br>GEDSPASIKISVDEIDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQ<br>WENQGNVSFAVTRPEQSAISWPSVSYKAAHKNGSR<br>HKRWANWFTTSPKVTLFCFYEDPAQCTYGDDWHGG<br>AYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNAME                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                      |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|               | ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAAQ<br>NIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSAL<br>RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ<br>TSAGAAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESR<br>SGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTRE<br>GYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEER<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPERVDGEDETIVIGWDMAIHAVA<br>PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDEL<br>K                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                      |
| SEQ ID NO: 87 | CSLTPEPGKPIQSQLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br>HWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG<br>SYETVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNNAME<br>ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAAQ<br>NIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLEEQEPEVAERLSAL<br>RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ<br>TSAGAAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESR<br>SGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTRE<br>GYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEER<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPERAGGEDETIVIGWDMAIHAVA<br>PS | Существо<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 88 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQG<br>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br>HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAM                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Существо<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                      |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|               | <p>SALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA<br/> QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSA<br/> LRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br/> QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES<br/> RSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTR<br/> EGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br/> KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE<br/> DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br/> GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGWDMIAHVAI<br/> PS</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                      |
| SEQ ID NO: 89 | <p>CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br/> NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br/> NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br/> IKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQG<br/> NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br/> HWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG<br/> SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNNAME<br/> ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLDPDDLSCAYQAQ<br/> NIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSA<br/> RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ<br/> TSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESR<br/> SGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTRE<br/> GYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br/> KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE<br/> DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br/> GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGWDMIAHVAI<br/> PS</p> | <p>Существую<br/> щий в<br/> природе<br/> Cholix<br/> полипептид</p> |
| SEQ ID NO: 90 | <p>CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br/> NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br/> NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br/> IKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQG<br/> NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br/> HWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG<br/> SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNNAME<br/> ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLDPDDLSCAYQAQ</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <p>Существую<br/> щий в<br/> природе<br/> Cholix<br/> полипептид</p> |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                              |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
|               | <p>NIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSAL</p> <p>RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLIPEQ</p> <p>TSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESR</p> <p>SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTRE</p> <p>GYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE</p> <p>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER</p> <p>EARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVI</p> <p>GHSPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI</p> <p>PS</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                              |
| SEQ ID NO: 91 | <p>CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ</p> <p>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI</p> <p>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPAS</p> <p>IKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG</p> <p>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA</p> <p>HWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG</p> <p>SYETVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNNAME</p> <p>ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQ</p> <p>NIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLEEQEPEVAERLSAL</p> <p>RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ</p> <p>TSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESR</p> <p>SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTRE</p> <p>GYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE</p> <p>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRAER</p> <p>ETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITDVI</p> <p>GHSPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI</p> <p>PS</p> | <p>Существую</p> <p>щий в</p> <p>природе</p> <p>Cholix</p> <p>полипептид</p> |
| SEQ ID NO: 92 | <p>CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ</p> <p>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI</p> <p>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPAS</p> <p>IKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG</p> <p>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA</p> <p>HWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG</p> <p>SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNNAME</p> <p>ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQ</p> <p>NIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDQEPVAERLSAL</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <p>Существую</p> <p>щий в</p> <p>природе</p> <p>Cholix</p> <p>полипептид</p> |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ<br>TSAGAQAAADILSLFCPDADKSCVALNNDQANINIESR<br>SGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALTRE<br>GYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVA<br>PS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                       |
| SEQ ID NO: 93 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPAS<br>IKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br>HWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG<br>SYETVAGTPKAIMVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNNAME<br>ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRYLPDDLSCAYQAQ<br>NIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSAL<br>RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ<br>TSAGAQAAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESR<br>SGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALTRE<br>GYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVA<br>PS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 94 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKDGEFAINWLVPIGEDSPAS<br>IKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQG<br>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br>HWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG<br>SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNNAME<br>ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLDDLSCAYQAQ<br>NIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPAVAERLSAI<br>RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ                                                                                                                                                                                                                                                      | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | TSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIESR<br>SGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTRE<br>GYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMIAHVAI<br>PS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                       |
| SEQ ID NO: 95 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKDGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQG<br>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br>HWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG<br>SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAM<br>ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLDDLSLAYQAQ<br>NIVSLFVATRILFSLDSVFTLNLDEQEPAVAERLSAL<br>RQINENNPGRMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ<br>TSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIESR<br>SGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTRE<br>GYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYLTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMIAHVAI<br>PS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 96 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQG<br>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br>HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAM<br>SALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSA<br>LRRINENNPGRMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES                                                                                                                                                                                                           | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|               | RSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTR<br>EGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMIAHAVA<br>PS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                       |
| SEQ ID NO: 97 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPAS<br>IKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQG<br>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br>HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAM<br>SALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSD<br>LRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES<br>RSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTR<br>EGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYTRIKEGTGEYGLPTRAE<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMIAHAVA<br>PS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO: 98 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPAS<br>IKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQG<br>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br>HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAM<br>SALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSD<br>LRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAADILSLFYDPADKSCVASNNDQANINIES<br>RSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTR                                                                                                                                                                     | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | EGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI<br>PS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                       |
| SEQ ID NO: 99     | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPAS<br>IKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQG<br>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br>HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAM<br>SALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSD<br>LRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES<br>RSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTR<br>EGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRAER<br>ETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI<br>PS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>100 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPAS<br>IKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br>HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQKNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAM<br>SALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSD<br>LRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES<br>RSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTR<br>EGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE                                                                                                                               | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI<br>PS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                       |
| SEQ ID NO:<br>101 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPAS<br>IKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA<br>HWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG<br>SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNNAME<br>ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQ<br>NIVSLFVATRILFSLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSAL<br>RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ<br>TSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESR<br>SGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTRE<br>GYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI<br>PS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>102 | CSLTPELGKPIQSKLSISSDVVLDEGVLYYSMTINDE<br>QNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV<br>INLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPA<br>SIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ<br>GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW<br>AHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAM<br>EALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSA<br>LRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVE<br>SRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALT<br>REGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENE<br>EKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER                                                                                         | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                       |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQ<br>VIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMIAHAV<br>AIPS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                       |
| SEQ ID NO:<br>103 | CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE<br>QNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV<br>INLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPA<br>SIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ<br>GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW<br>AHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAM<br>EALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDQEPEVAERLSA<br>LRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES<br>RSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTR<br>EGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI<br>GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMIAHAVAI<br>PS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>104 | CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE<br>QNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV<br>INLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPA<br>SIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ<br>GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW<br>AHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAM<br>EALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLEEQEPEVAERLSA<br>LRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES<br>RSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTR<br>EGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEE<br>KWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER<br>DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI                                              | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                       |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMIAHVAI<br>PS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                       |
| SEQ ID NO:<br>105 | CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE<br>QNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV<br>INLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPA<br>SIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ<br>GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW<br>AHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAM<br>EALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPAVAERLS<br>ALRQINENNPQMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTP<br>EQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIE<br>SRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALT<br>REGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENE<br>EKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE<br>RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQ<br>VIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMIAHAV<br>AIPS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>106 | CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE<br>QNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV<br>INLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPA<br>SIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ<br>GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW<br>AHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAM<br>EALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSA<br>LRQINENNPQMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVE<br>SRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALT<br>REGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENE<br>EKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE<br>REARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQ<br>VIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMIAHAV         | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                       |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | AIPS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                       |
| SEQ ID NO:<br>107 | CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE<br>QNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV<br>INLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPA<br>SIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ<br>GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW<br>AHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAM<br>EALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPAVAERLS<br>ALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTP<br>EQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIE<br>SRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALT<br>REGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENE<br>EKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE<br>RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQ<br>VIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAV<br>AIPS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>108 | CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDD<br>QNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV<br>INLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPA<br>SIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ<br>GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW<br>AHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAM<br>EALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQA<br>QNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSA<br>LRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIES<br>RSGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALTR<br>EGYVFVGYHGTNHVAAQNIVNRIAPVPRGNNTENE<br>EKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE<br>RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQ<br>VIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAV<br>AIPS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                       |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:<br>109 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPAS<br>IKISVDELDDQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSAFVTRPEQSIKQSIASWPSVSYKAAHKNGSRH<br>KRWANWLTTLPKVVLCFFEDPELCTYGEDWHGGA<br>YKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNAM<br>EALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNI<br>VSLFVATRILFSLDVSFTLNLDQEPEVAERLSALR<br>QINENNPMTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQT<br>SAGAAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS<br>GRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELATHQALTREG<br>YVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEK<br>WGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERD<br>ARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTLLENAAEHITQVIG<br>HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGWDMIAHVAIPS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>110 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVIN<br>LDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIK<br>ISVDELDDQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWETQGNV<br>SFAVTRPEQSIASWPSVSYKAAHKNGSRHKRWAN<br>WFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDWHGGAYKTVA<br>GTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNAM<br>EALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNI<br>VSLFVATRILFSLDVSFTLNLDQEPEVAERLSALRQINEN<br>NPGMTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA<br>QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSY<br>LPENRAVITPQGVNTWNTYQELATHQALTREDYVFGY<br>HGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLY<br>VATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGV<br>MLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPL<br>RNEAFTGPESAGGEDETIGWDMIAHVAIPS    | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>111 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVIN<br>LDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Существую<br>щий в<br>природе                         |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                       |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | ISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWETQGNV<br>SFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWAN<br>WFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVA<br>GTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNNAMEALAAHR<br>VCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFV<br>ATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINEN<br>NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA<br>QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSY<br>LPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALTREDYVVFV<br>GYHGTNHAAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGL<br>YVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGV<br>MLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPL<br>RNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS                                                                                                                                  | Cholix<br>полипептид                                  |
| SEQ ID NO:<br>112 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWAN<br>NWLTTLPKVVLFCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTV<br>AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNNAMEALAAH<br>RVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLF<br>VATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINE<br>NNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG<br>AQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS<br>YLPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALTREGYVF<br>VGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGL<br>LYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEERDARG<br>VMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSL<br>PLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>113 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWAN<br>NWLTTLPKVVLFCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                       |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNNAMEALAAH<br>RVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLF<br>VATRILFSLDSDVFTLNLDEQAPEVAERLSDLRRINE<br>DNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG<br>AQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS<br>YLPENRAVITPQGVNTWNTYQELETTHQALTREGYVF<br>VGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGG<br>LYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERETRG<br>VMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSL<br>PLRNEAFTGPESAGGEDETIVIGWDMAIHAVAIPS                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                       |
| SEQ ID NO:<br>114 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSAFVTRPEQSIASWPSVSYKAAHKNGSRHKRWA<br>NWLTTLPKVVLFCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTV<br>AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNNAMEALAAH<br>RVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLF<br>VATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINE<br>NNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG<br>AQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS<br>YLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATHQALTREGYVF<br>VGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGG<br>LYVATHAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRAERETRG<br>VMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSL<br>PLRNEAFTGPESAGGEDETIVIGWDMAIYAVAIPS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>115 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGN<br>VSAFVTRPEQSIASWPSVSYKAAHKNGSRHKRWAN<br>WFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVA<br>GIPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNNAMEALAAHR<br>VCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFV<br>ATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINEN                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                       |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA<br>QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSY<br>LPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALTREDYVVFV<br>GYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGL<br>YVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGV<br>MLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPL<br>RNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                       |
| SEQ ID NO:<br>116 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSAFVTRPEQSIASWPSVSYKAAHKNGSRHKRWA<br>NWLTTLPKVVLFCFYEEPELCTYGEDWHGGAYKTVA<br>GTPGAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKGNAMSALAAHR<br>VCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFV<br>ATRILFSLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINEN<br>NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA<br>QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSY<br>LPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALTREGYVVFV<br>GYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGL<br>YVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGV<br>MLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPL<br>RNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>117 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPAS<br>IKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQG<br>NVSAFVTRPEQSIASWPSVSYKAAHKNGSRHKRWA<br>NWLTTLPKVVLFCFYEEPELCTYGEDWHGGAYKTVA<br>GTPEAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNNAMEALAAHR<br>VCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFV<br>ATRILFSLDSVFTLNLDEQEPVAERLSALRQINEN<br>NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA<br>QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSY<br>LPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALTREGYVVFV                                                                                                                                                             | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                       |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | GYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGL<br>YVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGV<br>MLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPL<br>RNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                       |
| SEQ ID NO:<br>118 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ<br>NDIKDEDKGESIIIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIN<br>LDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASI<br>KISVDELQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGN<br>VSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWAN<br>WLTTLPKVVLCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTVA<br>GTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKGNAMSALAAHR<br>VCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFV<br>ATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN<br>NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA<br>QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSY<br>LPENRVVITPQGVNTWYQELDATHQALTREDYVF<br>VGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGG<br>LYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERETRG<br>VMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSL<br>PLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>119 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTINDE<br>QNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASI<br>KISIDELQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGN<br>VSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWAN<br>WLTTLPEVVLCFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTAVAG<br>TPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNNAMEALAAHRV<br>CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLAT<br>RILFTHIDSIFTLNLGDGEPEVAERLDDLRRINENNPG<br>MVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAAQA<br>DILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPEN<br>RAVITQQGVNTWYQELEATHQALTQEGYVVFVGYH<br>GTNHVAAQSIVNRISPVRGSDTESERAWGGLYVST<br>DASVAYGYARIQEGTADGGGLTPAERKARGVMLRV<br>YLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGHPLPLRNE                               | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                       |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | AFTGTDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                       |
| SEQ ID NO:<br>120 | CSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTINDE<br>QNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVI<br>NLDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASI<br>KISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGN<br>VSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNNGSRHKRWAN<br>WLTTLPEVVLCFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAG<br>TPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSSKNAMEALAAHRV<br>CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLAT<br>RILFTHIDSIFTNLNDGQEPEVAERLDDLRRINENNP<br>GMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSASAQAAD<br>ILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPENR<br>AVITQQGVNTWNTYQELEATHQALTQEGYVFVGYHG<br>TNHVAAQSIVNRISPVPRGSDTESERAWGGLYVSTD<br>ASVAYGYARIQEGTADGGGLTPAERKARGVMLRVY<br>LPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGHPLPLRNEA<br>FTGTDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPS | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>121 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKQIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK<br>AAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKP<br>VEQRIHFSSKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR<br>DLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSLDLSVFTLNL<br>DEQEPEVAERLSALRQINENNPMTQVLTVARQIY<br>NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC<br>VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTW<br>TYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVN<br>RIAPVPRGNNTENKKGWGLYVATHAEVAHGYARI<br>KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV                                                        | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>122 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKEGEFA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Существую<br>щий в<br>природе                         |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                       |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | INWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKA<br>AEKDGARHKRWAWHWTGLALCWLVPDLAIYNYIT<br>QQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGMEQKP<br>VEQRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARGRKP<br>RDLTDDLQCA YQAQNIVSLFLATRILFSLDSDVFTLN<br>LDEQEPEVAERLTDLRRINENNPGRMVTQVLTIRQIY<br>NDYVTEHPGLTPEQTSAGAAADILSLCPDADGSC<br>VASNSDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWT<br>YQELEAKHQTLTREGYVFVGYHGTNHVAAQSIVNRI<br>TPVPRGNNTKEEEEWGG                                                                                                                              | Cholix<br>полипептид                                  |
| SEQ ID NO:<br>123 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLD<br>EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSFNRKEGEF<br>AINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSID<br>LDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYK<br>AAEKDGARHKRWAWHWTGLALCWLVPDLAIYNYI<br>TQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGMEQKP<br>PVEQRIHFSKKNNAMEALAAHRVCGVPLETLARGRKP<br>RDLTDDLQCA YQAQNIVSLFLATRILFSLDSDVFTLN<br>LDEQEPEVAERLTDLRRINENNPGRMVTQVLTIRQIY<br>NDYVTEHPGLTPEQTSAGAAADILSLCPDADESC<br>VASNSDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWT<br>YQELEAKHQTLTREGYVFVGYHGTNHVAAQSIVNRI<br>TPVPRGNNTKEEEEWGG | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>124 | YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSV<br>SYKAAQKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIY<br>NYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIE<br>QKPVEQRIHFSNGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSR<br>KPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSLDSDVFT<br>LNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGRMVTQVLTIR<br>QIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAAADILSLCPDAD<br>KSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV<br>NTWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTI<br>VNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA                                                                                                                                                        | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                          |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|                   | RIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERF<br>YRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGG<br>EDETIVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVA<br>KEQSISAKPPYKERKDELK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                          |
| SEQ ID NO:<br>125 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE<br>GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT<br>RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI<br>NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQKRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSAISWPSVSYKA<br>AHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEEPELCTYG<br>EDWHGGAYKTVAGTPEAITVKQGIEQKTVEQRIHFS<br>KKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLQDDLS<br>CAYQAQNIIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPAV<br>AERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH<br>HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND<br>QANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQELEA<br>THQALTREGYVFGYHGTNHV | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид    |
| SEQ ID NO:<br>126 | VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDE<br>EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRA<br>TRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFA<br>INWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDL<br>DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA<br>AQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQ<br>QNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVE<br>QRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL<br>PDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDDGQ<br>EPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDY<br>VTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVAS<br>NSDQANINIES                                             | Не<br>существующ<br>ий в природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>127 | LSHLDSVFTLNLHEQEPAVAERLSALRQINENNPG<br>MVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA<br>DILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPE<br>NRAVITPQGVNTWYQELEATHQALTREGYVFGY<br>HGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYV<br>ATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVML                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид    |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                       |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | RVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRN<br>EAFTGPESAGGEDETVIGWDMIAHAVAIPSTIPGNAY<br>EELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK                                                                                                                    |                                                       |
| SEQ ID NO:<br>128 | AVITPQGVNTNWTYQELEATHQALTREGYVFGYHG<br>TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT<br>HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV<br>YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA<br>FTGPESAGGEDETVIGWDMIAHAVAIPSTIPGNAYEE<br>LAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |
| SEQ ID NO:<br>129 | AVITPQGVNTNWTYQELEATHQALTREGYVFGYHG<br>TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT<br>HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV<br>YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA<br>FTGPESAGGEDETVIGWDMIAHAVAIPSTIPGNAYEE<br>LAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDEL  | Существую<br>щий в<br>природе<br>Cholix<br>полипептид |

В **ТАБЛИЦЕ 2** представлена консенсусная последовательность (SEQ ID NO: 130, **ФОРМУЛА I**) полученных из Cholix полипептидов, которые могут применяться в качестве носителей в настоящем документе.

**ТАБЛИЦА 2 - ФОРМУЛА I**

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

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>R-X345-I-N-E-X349-N-P-G-X353-V-X355-Q-V-L-T-X360-A-R-Q-I-Y-N-D-Y-V-T-X371-H-P-X374-L-X376-P-E-Q-T-S-A-X383-A-Q-A-A-D-I-L-S-L-X393-X394-P-D-X397-D-X399-X400-C-V-A-X404-X405-X406-D-Q-A-N-I-N-X413-E-S-R-S-G-R-S-Y-L-X423-E-N-R-A-V-I-T-X431-Q-G-V-T-N-W-T-Y-Q-E-L-X443-X444-X445-H-Q-X448-L-T-X451-E-X453-Y-V-F-V-G-Y-H-G-T-N-H-X465-A-A-Q-X469-I-V-N-R-I-X475-P-V-P-R-G-X481-X482-T-E-X485-E-X487-X488-W-G-G-X492-Y-V-X495-T-X497-A-X499-X500-X501-X502-X503-Y-X505-R-X507-X508-X509-G-T-X512-X513-X514-X515-X516-X517-T-X519-X520-X521-X522-X523-X524-R-G-V-M-L-X530-V-Y-X533-X534-X535-A-S-L-E-R-F-Y-R-X544-N-X546-X547-L-E-X550-X551-X552-X553-X554-X555-X556-X557-V-I-G-H-X562-L-P-L-R-N-E-A-F-T-G-X573-X574-X575-X576-X577-G-X579-X580-E-T-X583-I-G-W-D-X588-A-I-X591-X592-V-A-I-P-S-T-I-P-G-N-X603-Y-X605-X606-L-X608-X609-X610-E-E-A-X614-A-X616-E-Q-S-I-S-X622-K-P-P-Y-K-E-X629-X630-D-E-L-K; где X1</p> <p>выбран из группы, состоящей из V и L; X3 выбран из группы, состоящей из E и D; X4 выбран из группы, состоящей из A и E; X6 выбран из группы, состоящей из N и K; X16 выбран из группы, состоящей из S и L; X21 выбран из группы, состоящей из P и L; X24 выбран из группы, состоящей из P и Q; X30 выбран из группы, состоящей из S и F; X33 выбран из группы, состоящей из S и G; X56 выбран из группы, состоящей из K и M; X59 выбран из группы, состоящей из D и G; X67 выбран из группы, состоящей из I и F; X73 выбран из группы, состоящей из V и I; X81 выбран из группы, состоящей из N и S; X90 выбран из группы, состоящей из H и N; X101 выбран из группы, состоящей из T и M; X104 выбран из группы, состоящей из Y и F; X108 выбран из группы, состоящей из E и D; X109 выбран из группы, состоящей из G и S; X112 выбран из группы, состоящей из A и T; X114 выбран из группы, состоящей из N и H; X118 выбран из группы, состоящей из P и I; X119 выбран из группы, состоящей из I и P; X131 выбран из группы, состоящей из V и I; X134 выбран из группы, состоящей из L и I; X137 выбран из группы, состоящей из Q и K; X160 выбран из группы, состоящей из K и E; X161 выбран из группы, состоящей из T и N; X166 выбран из группы, состоящей из S и F; X168 выбран из группы, состоящей из S и A; X174</p> |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p> выбран из группы, состоящей из H и Q; X175 выбран из группы, состоящей из N, S, SIAKQS и SIAKQSIAKQS; X186 выбран из группы, состоящей из K и N; X189 выбран из группы, состоящей из Q, E и H; X191 выбран из группы, состоящей из E, N и D; X193 выбран из группы, состоящей из S и A; X200 выбран из группы, состоящей из H и N; X202 выбран из группы, состоящей из H, L, F и R; X204 выбран из группы, состоящей из G и T; X205 выбран из группы, состоящей из L и S; X206 выбран из группы, состоящей из A и P; X207 выбран из группы, состоящей из L, E и K; X208 выбран из группы, состоящей из C и V; X209 выбран из группы, состоящей из W, V и T; X211 выбран из группы, состоящей из V и без аминокислоты; X212 выбран из группы, состоящей из P и без аминокислоты; X213 выбран из группы, состоящей из M, I, L и без аминокислоты; X214 выбран из группы, состоящей из D и без аминокислоты; X215 выбран из группы, состоящей из A и без аминокислоты; X216 выбран из группы, состоящей из I и без аминокислоты; X217 выбран из группы, состоящей из Y и C; X218 выбран из группы, состоящей из N и F; X219 выбран из группы, состоящей из Y и F; X220 выбран из группы, состоящей из I и E; X221 выбран из группы, состоящей из T и D; X222 выбран из группы, состоящей из Q и P; X223 выбран из группы, состоящей из Q, E и A; X224 выбран из группы, состоящей из N, L и Q; X227 выбран из группы, состоящей из L и Y; X229 выбран из группы, состоящей из D и E; X230 выбран из группы, состоящей из N и D; X232 выбран из группы, состоящей из F, H и Y; X235 выбран из группы, состоящей из S и A; X237 выбран из группы, состоящей из E и K; X242 выбран из группы, состоящей из T и I; X244 выбран из группы, состоящей из K, E и G; X245 выбран из группы, состоящей из V и A; X247 выбран из группы, состоящей из T и M; X252 выбран из группы, состоящей из I и M; X256 выбран из группы, состоящей из P, T и A; X265 выбран из группы, состоящей из K, Q и N; X266 выбран из группы, состоящей из G и K; X269 выбран из группы, состоящей из M и I; X270 выбран из группы, состоящей из S и E; X271 выбран из группы, состоящей из A и T; X288 выбран из группы, состоящей из S и G; X293 выбран из группы, состоящей из D и Y; X295 выбран из группы, состоящей из T, P и Q; X299 выбран из группы, состоящей из </p> |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

S и Q; X301 выбран из группы, состоящей из A и V; X303 выбран из группы, состоящей из Q и N; X306 выбран из группы, состоящей из N и Q; X312 выбран из группы, состоящей из V и L; X316 выбран из группы, состоящей из I и M; X319 выбран из группы, состоящей из S и T; X321 выбран из группы, состоящей из L и I; X324 выбран из группы, состоящей из V и I; X330 выбран из группы, состоящей из D, E и H; X331 выбран из группы, состоящей из E и G; X333 выбран из группы, состоящей из E и A; X335 выбран из группы, состоящей из E и A; X337 выбран из группы, состоящей из A и T; X341 выбран из группы, состоящей из S, D и T; X342 выбран из группы, состоящей из D и A; X343 выбран из группы, состоящей из L и I; X345 выбран из группы, состоящей из R и Q; X349 выбран из группы, состоящей из N и D; X353 выбран из группы, состоящей из M и V; X355 выбран из группы, состоящей из T и I; X360 выбран из группы, состоящей из V и I; X371 выбран из группы, состоящей из H и E; X374 выбран из группы, состоящей из G и L; X376 выбран из группы, состоящей из T и I; X383 выбран из группы, состоящей из G и S; X393 выбран из группы, состоящей из F и L; X394 выбран из группы, состоящей из C и Y; X397 выбран из группы, состоящей из A и T; X399 выбран из группы, состоящей из K, E и G; X400 выбран из группы, состоящей из S, P и H; X404 выбран из группы, состоящей из S и L; X405 выбран из группы, состоящей из N и D; X406 выбран из группы, состоящей из N и S; X413 выбран из группы, состоящей из I и V; X423 выбран из группы, состоящей из P и L; X431 выбран из группы, состоящей из P и Q; X443 выбран из группы, состоящей из E и D; X444 выбран из группы, состоящей из A и T; X445 выбран из группы, состоящей из T и K; X448 выбран из группы, состоящей из A и T; X451 выбран из группы, состоящей из R и Q; X453 выбран из группы, состоящей из G и D; X465 выбран из группы, состоящей из V и A; X469 выбран из группы, состоящей из T, S и N; X475 выбран из группы, состоящей из A, S и T; X481 выбран из группы, состоящей из N и S; X482 выбран из группы, состоящей из N и D; X485 выбран из группы, состоящей из N, S и K; X487 выбран из группы, состоящей из E, R и K; X488 выбран из группы, состоящей из K, A и E; X492 выбран из группы, состоящей из L и V; X495 выбран из группы, состоящей из A и S; X497 выбран из

группы, состоящей из Н и D; X499 выбран из группы, состоящей из Е и S; X500 выбран из группы, состоящей из V и L; X501 выбран из группы, состоящей из А и N; X502 выбран из группы, состоящей из Н и Y; X503 выбран из группы, состоящей из G и R; X505 выбран из группы, состоящей из А и T; X507 выбран из группы, состоящей из I и L; X508 выбран из группы, состоящей из K и Q; X509 выбран из группы, состоящей из Е и K; X512 выбран из группы, состоящей из G и A; X513 выбран из группы, состоящей из E, D и N; X514 выбран из группы, состоящей из Y, G, A и N; X515 выбран из группы, состоящей из G и E; X516 выбран из группы, состоящей из L и G; X517 выбран из группы, состоящей из P и L; X519 выбран из группы, состоящей из R, P и T; X520 выбран из группы, состоящей из А и E; X521 выбран из группы, состоящей из Е и K; X522 выбран из группы, состоящей из R, Q и K; X523 выбран из группы, состоящей из D, K и E; X524 выбран из группы, состоящей из А, T и S; X530 выбран из группы, состоящей из R и K; X533 выбран из группы, состоящей из I и L; X534 выбран из группы, состоящей из P и H; X535 выбран из группы, состоящей из R и Q; X544 выбран из группы, состоящей из T и I; X546 выбран из группы, состоящей из T, A и I; X547 выбран из группы, состоящей из P и D; X550 выбран из группы, состоящей из N и K; X551 выбран из группы, состоящей из А и E; X552 выбран из группы, состоящей из E, R и D; X553 выбран из группы, состоящей из E, N и R; X554 выбран из группы, состоящей из Н и L; X555 выбран из группы, состоящей из I и V; X556 выбран из группы, состоящей из T и E; X557 выбран из группы, состоящей из Q, R, H и D; X562 выбран из группы, состоящей из S и P; X573 выбран из группы, состоящей из P и T; X574 выбран из группы, состоящей из Е и D; X575 выбран из группы, состоящей из S, A и R; X576 выбран из группы, состоящей из А, E и V; X577 выбран из группы, состоящей из G, E и D; X579 выбран из группы, состоящей из E и S; X580 выбран из группы, состоящей из D и N; X583 выбран из группы, состоящей из V и A; X588 выбран из группы, состоящей из M и I; X591 выбран из группы, состоящей из Н и Y; X592 выбран из группы, состоящей из А и G; X603 выбран из группы, состоящей из А и S; X605 выбран из группы, состоящей из Е и A; X606 выбран из группы, состоящей из E, A, Q, G, V и R; X608 выбран из группы,

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | состоящей из A, P и T; X609 выбран из группы, состоящей из I, T и P; X610 выбран из группы, состоящей из D и A; X614 выбран из группы, состоящей из V и VVKEAI; X616 выбран из группы, состоящей из K и E; X622 выбран из группы, состоящей из T, A и P; and X629 выбран из группы, состоящей из R, Q и H; и X630 выбран из группы, состоящей из K и без аминокислоты. |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Носители могут включать все полученные из Cholix полипептиды, имеющие пониженную или исключенную активность ADP рибозилирования (например, рибозилирования фактора элонгации 2) относительно существующего в природе Cholix полипептида, такого, который имеет последовательность SEQ ID NO: 3. Такие носители могут быть названы нетоксичными носителями. Примеры таких полученных из Cholix полипептидов включают любые из полипептидов с последовательностями, указанными в любой из SEQ ID NO: 1-10, которые могут иметь делецию в положении 581 (например, E581 делецию, как, например, в SEQ ID NO: 189), замену в положении 581 (например, E581A замену) или альтернативную делецию или замену, которая делает носитель нетоксичным. В некоторых случаях, носитель имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130 с мутацией в положении 581. В некоторых случаях, носитель имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NOs: 1-3 с мутацией в положении 581.

В некоторых случаях, носитель содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, любой из **ТАБЛИЦЫ 1** или **ТАБЛИЦЫ 2** с С-концевой делецией, заменой и/или добавлением, тем самым давая пониженную или исключенную активность рибозилирования ADP. Такая делеция, замена и/или добавлением сохраняет транспортирующую функциональность, такую как транцитоз или эндоцитоз. Как таковые, некоторые из носителей в настоящем документе транцитотируют, либо отдельно, либо вместе с гетерологичной полезной нагрузкой, а некоторые из носителей в настоящем документе эндоцитотируют, либо отдельно, либо вместе с гетерологичной полезной нагрузкой.

В некоторых случаях, первый носитель, полученный из первого Cholix полипептида, может иметь улучшенные свойства по сравнению со вторым носителем, полученным из второго Cholix полипептида. Такие свойства могут включать способность носителя транспортировать гетерологичную полезную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку (или клеточный слой), стабильность носителя (например, *in vivo* стабильность или *ex vivo* стабильность, такую как срок годности), способность носителя функционально экспрессироваться в системе экспрессии, такой как *E. coli* или клетки CHO, способность носителя к очищению, например, с применением хроматографических способов, и способность мультимеризоваться (например, димеризоваться) при, например, ассоциации (например, сочетании) с гетерологичной полезной нагрузкой. Неожиданно может быть показано, что первый носитель, полученный из Cholix полипептида,

имеющего последовательность SEQ ID NO: 1, может иметь одно или несколько из следующих свойства по сравнению со вторым носителем, полученным из Cholix полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 3 и/или 126: (i) улучшенную функцию транцитоза (например, повышенную скорость транспортировки для транспортировки полезной нагрузки через эпителиальные клетки); (ii) улучшенную функциональную экспрессию (например, более высокий выход) в *E. coli* и/или клетках СНО; (iii) улучшенные свойства очистки (например, более высокую чистоту и/или выход при восстановлении); и (iv) улучшенную *in vivo* стабильность (например, повышенную протеазную и/или pH стабильность, температуру плавления). Такая *in vivo* стабильность может быть определена инкубированием носителя с, например, клетками Сасо-2 или введением (например, инъекцией в просвет) носителя млекопитающему (например, крысе или человеку). Улучшенная функция транцитоза, например, скорость или скорость транспортабельности может быть определена, например, как описано в **ПРИМЕРЕ 1** через определение количества транспортированного носителя и/или полезной нагрузки в базолатеральной камере в определенные моменты времени (например, 1, 5, 10, 15, 20 или 30 минут после апикального нанесения носителя или конструкции доставки). В некоторых случаях, стабильность носителя против протеазы может быть определена инкубированием носителя с протеазой (например, трипсином) в определенных молярных соотношениях (например, 1:1) и при температуре окружающей среды, и измерением количества интактного носителя в разные моменты времени (например, 5, 10, 15, 30 или 45 минут) с применением, например, эксклюзионной хроматографии по размеру. Стабильность носителя при определенном pH может быть определена инкубированием носителя с буфером, имеющим подходящий pH (например, pH 5,5, 6, 6,5, 7 и т.д.) и измерением количества интактного носителя в разные моменты времени (например, 5, 10, 15, 30 мин) с применением, например, эксклюзионной хроматографии по размеру.

Трансцитозирующий носитель может транспортировать полезную нагрузку, связанную с ним, через эпителиальную клетку. Такая транспортировка может происходить *in vitro*, например, с применением монослоя эпителиальных клеток, таких как монослой клеток Сасо-2 или SMI-100. В других случаях, такая транспортировка может происходить *in vivo*, например, через эпителий кишечника субъекта (например, грызуна или человека) в подслизистые участки, такие как *lamina propria*.

Механизм действия транцитозирующего носителя может включать один или несколько из: рецептор-опосредованного эндоцитоза в поляризованную эпителиальную клетку через взаимодействие с TMEM132, LMAN1 и/или GPR75, избегания пути лизосомного разрушения через взаимодействие с GRP75, апикально-базальной транспортировки через взаимодействие с ERGIC рецептор (например, ERGIC-53) и выделения из базальной мембраны в подслизистые участки, такие как *lamina propria* через взаимодействие с перлеканом (HSPG).

Трансцитозирующим носителем может быть такой, который взаимодействует с одним или несколькими из следующих эндогенных белков: TMEM132A, GPR75, ERGIC

белок и перлекан (HSPG), как показано в **ПРИМЕРАХ 10** и **12**. Взаимодействие трансцитозирующего носителя с апикальным входным рецептором, таким как TMEM132A, может позволить апикальный вход носителя в поляризованную эпителиальную клетку. Взаимодействие трансцитозирующего носителя с рецептором лизосомного избегания, таким как GRP75, может позволить носителю и полезной нагрузке, связанной с ним, избежать лизосомного разложения, тем самым позволяя транспортировку неизмененного и функционально интактного носителя и полезной нагрузки. Взаимодействие трансцитозирующего носителя с белком апикально-базальной транспортировки, таким как ERGIC белок (например, ERGIC-53) может позволить носителю, после эндоцитоза, двигаться к базальному сайту эпителиальной клетки. Взаимодействие трансцитозирующего носителя с белком базальной секреции, таким как перлекан, может позволить носителю проникать в базальные системы рециркулирования и экзоцитоз носителя в базолатеральные области, такие как подслизистые участки (например, lamina propria).

Кроме того, трансцитозирующий носитель может колокализоваться с любым одним или несколькими из оболочечного белка I (COPI) раннего эндосомального антигена 1 (EEA1) для захвата механизма эндогенной апикально-базальной транспортировки, и Ras-родственного белка 11a (Rab11a) на базальной стороне эпителиальной клетки для входа в базальные системы секреции, показанные в **ПРИМЕРЕ 10**.

В некоторых случаях, трансцитозирующий носитель не колокализуется с Ras-родственным белком 7 (Rab7) и/или лизосома-ассоциированным мембранным белком 1 (LAMP1) во время транспортировки через такую эпителиальную клетку, позволяя такому носителю избегать лизосомного разложения, как показано в **ПРИМЕРЕ 10**.

Примеры трансцитозирующих носителей включают такие, которые имеют С-концевое усечение любой из SEQ ID NOs 1-78 или 130, где С-концевое усечение может происходить на С-конце полипептида в любом аминокислотном положении после С-концевого остатка в положении 195 (например, усечение на любом из положений 195-634 из SEQ ID NOs: 1-2). Аминокислотные положения для усечения могут быть определены с применением выравнивания последовательности с консенсусной последовательностью SEQ ID NO: 130 или любой из эталонных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2 или 3. В **ТАБЛИЦЕ 3** ниже показаны типовые носители через идентификацию разных аминокислотных остатков последовательностей таких носителей и С-концевых положений, в которых SEQ ID NOs 1-78 или 130 могут быть усечены. В некоторых случаях, трансцитозирующие носители включают такие, которые имеют С-концевое усечение любой из SEQ ID NOs 1-2 или 4-78.

**ТАБЛИЦА 3 - Типовые трансцитозирующие носители, идентифицирующие аминокислотные остатки любой из SEQ ID NOs: 1-78 или 130**

| АА остатки | АА остатки | АА остатки |
|------------|------------|------------|
| 1-195      | 1-246      | 1-297      |

|       |       |       |
|-------|-------|-------|
| 1-196 | 1-247 | 1-298 |
| 1-197 | 1-248 | 1-299 |
| 1-198 | 1-249 | 1-300 |
| 1-199 | 1-250 | 1-301 |
| 1-200 | 1-251 | 1-302 |
| 1-201 | 1-252 | 1-303 |
| 1-202 | 1-253 | 1-304 |
| 1-203 | 1-254 | 1-305 |
| 1-204 | 1-255 | 1-306 |
| 1-205 | 1-256 | 1-307 |
| 1-206 | 1-257 | 1-308 |
| 1-207 | 1-258 | 1-309 |
| 1-208 | 1-259 | 1-310 |
| 1-209 | 1-260 | 1-311 |
| 1-210 | 1-261 | 1-312 |
| 1-211 | 1-262 | 1-313 |
| 1-212 | 1-263 | 1-314 |
| 1-213 | 1-264 | 1-315 |
| 1-214 | 1-265 | 1-316 |
| 1-215 | 1-266 | 1-317 |
| 1-216 | 1-267 | 1-318 |
| 1-217 | 1-268 | 1-319 |
| 1-218 | 1-269 | 1-320 |
| 1-219 | 1-270 | 1-321 |
| 1-220 | 1-271 | 1-322 |
| 1-221 | 1-272 | 1-323 |
| 1-222 | 1-273 | 1-324 |
| 1-223 | 1-274 | 1-325 |
| 1-224 | 1-275 | 1-326 |
| 1-225 | 1-276 | 1-327 |
| 1-226 | 1-277 | 1-328 |
| 1-227 | 1-278 | 1-329 |
| 1-228 | 1-279 | 1-330 |
| 1-229 | 1-280 | 1-331 |

|       |       |       |
|-------|-------|-------|
| 1-230 | 1-281 | 1-332 |
| 1-231 | 1-282 | 1-333 |
| 1-232 | 1-283 | 1-334 |
| 1-233 | 1-284 | 1-335 |
| 1-234 | 1-285 | 1-336 |
| 1-235 | 1-286 | 1-337 |
| 1-236 | 1-287 | 1-338 |
| 1-237 | 1-288 | 1-339 |
| 1-238 | 1-289 | 1-340 |
| 1-239 | 1-290 | 1-341 |
| 1-240 | 1-291 | 1-342 |
| 1-241 | 1-292 | 1-343 |
| 1-242 | 1-293 | 1-344 |
| 1-243 | 1-294 | 1-345 |
| 1-244 | 1-295 | 1-346 |
| 1-245 | 1-296 | 1-347 |

Такие транскитизирующие носители могут быть далее усечены на их N-конце а аминокислотном положении вплоть до N-концевого положения 20 (например, SEQ ID NO: 79, которая усечена в N-концевом положении 17 (начиная с положения 18)).

Также в настоящем документе рассматриваются транскитизирующие носители, которые имеют, по меньшей мере, примерно 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к любой из последовательностей носителя, показанных в **ТАБЛИЦЕ 3**.

В одном случае, носитель содержит SEQ ID NO: 1 с C-концевым усечением в положении 386. В одном случае, носитель содержит SEQ ID NO: 2 с C-концевым усечением в положении 386. В одном случае, носитель содержит SEQ ID NO: 4-79 с C-концевым усечением в положении 386. В одном случае, носитель содержит SEQ ID NO: 130 с C-концевым усечением в положении 386. В таких случаях, последовательность не включает SEQ ID NO: 3 с C-концевым усечением в положении 386. В таких случаях, последовательность не включает SEQ ID NO: 126.

Если полученный из Cholix носитель имеет C-концевое усечение в положении 386, он может быть назван в настоящем документе Cholix<sup>386</sup>. «386» означает C-концевое усечение после аминокислоты, которая наиболее близко выравнивается с положением 386, когда последовательность является частью или выравнивается с SEQ ID NO: 130. Cholix<sup>38</sup> не требует, чтобы полипептид имел 386 аминокислот в себе. Например, усечение SEQ ID NO: 79 в положении 386 дает носитель, который короче, чем 386 аминокислотных остатков. Примеры молекул Cholix<sup>386</sup> носителя включают любую из SEQ ID NOs: 1-79 или

130, усеченных в положении 386 при выравнивании для наивысшей идентичности последовательности с SEQ ID NO 130, или при выравнивании с любой из SEQ ID NOs: 1-3 для наивысшей идентичности последовательности, например, оканчивающихся аминокислотными остатками «AQA».

Cholix<sup>386</sup> также может включать полипептиды, сохраняющие по существу ту же функцию, как и SEQ ID NO: 180, но с одним или несколькими добавлениями/делециями/заменами, и имеющие, по меньшей мере, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к молекулам Cholix<sup>386</sup>, описанным в настоящем документе.

Другим примером трансцитозирующего полученного из Cholix носителя является Cholix<sup>266</sup>. В одном случае, Cholix<sup>266</sup> состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 181. Другие фрагменты Cholix<sup>266</sup> могут включать таковые из любых из SEQ ID NO: 1-78, усеченных в аминокислотном положении 266 при выравнивании для наивысшей идентичности последовательности с SEQ ID NO 130 или при выравнивании с любой из SEQ ID NOs 1-3 для наивысшей идентичности последовательности. Альтернативно, носитель может иметь любую последовательность **ФОРМУЛЫ I** (SEQ ID NO: 130) усеченную на С-конце в положении 266.

Другим примером трансцитозирующего полученного из Cholix носителя является Cholix<sup>251</sup>. В одном случае, Cholix<sup>251</sup> состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 182. Другие фрагменты Cholix<sup>251</sup> могут включать таковые с любой из SEQ ID NO: 1-78, усеченных на аминокислотном положении 251 при выравнивании для наивысшей идентичности последовательности с SEQ ID NO 130 или при выравнивании с любой из SEQ ID NOs 1-3 для наивысшей идентичности последовательности. Альтернативно, носитель может иметь любую последовательность **ФОРМУЛЫ I** (SEQ ID NO: 130), усеченную на С-конце в положении 251.

Другим примером трансцитозирующего полученного из Cholix носителя является Cholix<sup>245</sup>. В одном случае, Cholix<sup>245</sup> состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 183. Другие фрагменты Cholix<sup>245</sup> включают таковые с любой из SEQ ID NO: 1-79, усеченной на аминокислотном положении 245 при выравнивании для наивысшей идентичности последовательности с SEQ ID NO 130 или при выравнивании с любой из SEQ ID NOs 1-3 для наивысшей идентичности последовательности. Альтернативно, носитель может иметь любую из последовательностей **ФОРМУЛЫ I** (SEQ ID NO: 130), усеченную на С-конце в положении 245.

Другим примером трансцитозирующего полученного из Cholix носителя является Cholix<sup>206</sup>. В одном случае, Cholix<sup>206</sup> состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 184. Другие фрагменты Cholix<sup>206</sup> включают таковые с любой из SEQ ID NO: 1-78, усеченной на аминокислотном положении 206 при выравнивании для наивысшей идентичности последовательности с SEQ ID NO 130 или при выравнивании с любой из SEQ ID NOs 1-3 для наивысшей идентичности последовательности. Альтернативно, носитель может иметь любую последовательность **ФОРМУЛЫ I** (SEQ ID NO: 130),

усеченную на С-конце в положении 206.

Другие примеры носителей включают такие, которые имеют С-концевое усечение в любом из аминокислотных положений 195-634 последовательности, указанной в **ФОРМУЛЕ I** (SEQ ID NO: 130). Предпочтительно, такое усечение происходит в любом из аминокислотных положений 195-347 последовательности, указанной в **ФОРМУЛЕ I** (SEQ ID NO: 130).

На N-конце, транцитозирующий носитель может иметь любую из аминокислот 1-20 из SEQ ID NOs: 1-78 или 130. В некоторых вариантах осуществления, N-конец носителя имеет аминокислотные остатки 1-20 из SEQ ID NO: 1 или 2 (100% идентичность последовательности в положениях 1-20) или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, примерно 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к аминокислотным остаткам 1-20 из SEQ ID NO: 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления, первые четыре аминокислоты на N-конце являются VEEA (SEQ ID NO: 185). В некоторых вариантах осуществления, такие носители не содержат SEQ ID NO: 126. В некоторых вариантах осуществления, N-конец носителя имеет аминокислотные остатки 1-20 **ФОРМУЛЫ I** (SEQ ID NO: 130). Любой из таких носителей необязательно может иметь N-концевую модификацию, как описано в настоящем документе. Такой N-концевой модификацией может быть N-концевой метионин. Примеры таких носителей включают такие, которые содержат, состоят по существу из или состоят из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 131-135.

Как таковой, транцитозирующий носитель может включать, состоять по существу из или состоять из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, примерно 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности, или имеющей 100% идентичность последовательности, к аминокислотным остаткам от положения 1 до любого из аминокислотных остатков в любом из положений 205-275 аминокислотной последовательности, указанной в **ФОРМУЛЕ I** (SEQ ID NO: 130).

В таких случаях, транцитозирующий носитель состоит, состоит по существу из или содержит аминокислотные остатки 1-275, 1-266, 1-265, 2-265, 3-265, 4-265, 5-265, 1-251, 1-250, 2-250, 3-250, 4-250, 5-250, 1-245, 2-245, 3-245, 4-245, 5-245, 1-206, 1-205, 2-205, 3-205, 4-205 или 5-205 из аминокислотных остатков, указанных в **ФОРМУЛЕ I** (SEQ ID NO: 130). В разных случаях, такой носитель может состоять или состоять по существу из аминокислотных остатков 1-275, 1-266, 1-265, 2-265, 3-265, 4-265, 5-265, 1-251, 1-250, 2-250, 3-250, 4-250, 5-250, 1-245, 2-245, 3-245, 4-245, 5-245, 1-206, 1-205, 2-205, 3-205, 4-205 или 5-205 тех же аминокислотных остатков, указанных в любой из SEQ ID NOs: 1-78.

Более конкретно, в некоторых случаях, такой транцитозирующий носитель может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотных остатков 1-275, 1-266, 1-265, 2-265, 3-265, 4-265, 5-265, 1-251, 1-250, 2-250, 3-250, 4-250, 5-250, 1-245, 2-245, 3-245, 4-245, 5-245, 1-206, 1-205, 2-205, 3-205, 4-205 или 5-205 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1.

Альтернативно, в некоторых случаях, такой трансцитозирующий носитель может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотных остатков 1-275, 1-266, 1-265, 2-265, 3-265, 4-265, 5-265, 1-251, 1-250, 2-250, 3-250, 4-250, 5-250, 1-245, 2-245, 3-245, 4-245, 5-245, 1-206, 1-205, 2-205, 3-205, 4-205 или 5-205 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2.

Носитель может быть далее модифицирован на его N-конце. Такие N-концевые модификации включают функциональные группы, которые могут улучшить экспрессию и/или стабильность полипептида. Такие концевые модификации могут быть проиллюстрированы следующим обозначением «FG-Носитель», где FG является функциональной группой, присоединенной к N-концу носителя. Примеры функциональных групп, рассматриваемых в настоящем документе, включают метионин для бактериальной экспрессии и другие сигнальные последовательности для экспрессии в клетках CHO или клетках HEK-293. Примеры трансцитозирующих носителей с N-концевым метионином включают такие, которые имеют аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 131-135 (ТАБЛИЦА 4). Необходимо отметить, что функциональные группы могут быть также связаны с C-концом носителя.

**ТАБЛИЦА 4 - Типовые трансцитозирующие полученные из Cholix носители**

| SEQ ID NO         | Последовательность                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:<br>131 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT<br>INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITT<br>ENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ<br>KEGSRHKRWAWHWTGLA                                                  |
| SEQ ID NO:<br>132 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT<br>INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITT<br>ENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ<br>KEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKV       |
| SEQ ID NO:<br>133 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT<br>INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITT<br>ENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ<br>KEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQG |
| SEQ ID NO:        | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT                                                                                                                                                                                                                                 |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 134               | INDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITT<br>ENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ<br>KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG                                                                                                                                                                                         |
| SEQ ID NO:<br>135 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT<br>INDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITT<br>ENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ<br>KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG<br>VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTL<br>NLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQA |
| SEQ ID NO:<br>184 | VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN<br>DEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN<br>GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKE<br>GSRHKRWAHWHTGLA                                                                                                                                                                                                      |
| SEQ ID NO:<br>183 | VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN<br>DEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN<br>GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKE<br>GSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS<br>YETVAGTPKV                                                                                                                                                           |
| SEQ ID NO:<br>182 | VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN<br>DEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN<br>GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKE<br>GSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS<br>YETVAGTPKVITVKQG                                                                                                                                                     |
| SEQ ID NO:<br>181 | VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN<br>DEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN<br>GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKE                                                                                                                                                                                                                         |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   | GSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS<br>YETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| SEQ ID NO:<br>180 | VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN<br>DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN<br>GKTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEVPK<br>LYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKE<br>GSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS<br>YETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVP<br>LETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN<br>LDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPG<br>LTPEQTSAGAQA                                         |
| SEQ ID NO:<br>178 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT<br>INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITT<br>ENGKTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ<br>KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSK                                                                                                                                                                             |
| SEQ ID NO:<br>191 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT<br>INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITT<br>ENGKTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ<br>KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG<br>VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTL<br>NLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESCENLF<br>Q |
| SEQ ID NO:<br>192 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT<br>INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITT<br>ENGKTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ<br>KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG<br>VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTL<br>NLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP                                                         |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   | GLTPEQTSAGAQAACENLFQ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| SEQ ID NO:<br>193 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT<br>INDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITT<br>ENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ<br>KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG<br>VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTL<br>NLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESCENLF<br>QSGTCHHHHHH |
| SEQ ID NO:<br>194 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT<br>INDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITT<br>ENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEV<br>PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ<br>KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG<br>GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG<br>VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTL<br>NLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP<br>GLTPEQTSAGAQAACENLFQSGTCHHHHHH                                 |

Используя информацию о кристаллической структуре полученного из Cholix носителя, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178, было идентифицировано несколько областей, которые могут играть роль в эндоцитозе и трансцитозе. Такие области названы в настоящем документе X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>1</sub> спены аминокислотных остатков 17-25, имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160 и могут играть роль в апикально-базальной транспортировке носителя, например, позволяя взаимодействие носителя с ERGIC белком (например, ERGIC-53). X<sub>2</sub> спен аминокислотных остатков 170-176, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161 и может играть роль в доступе носителя в надъядерные участки и для их апикально-базального движения в сайт эпителиальной клетки, например, позволяя взаимодействие носителя с ERGIC белком. X<sub>3</sub> спен аминокислотных остатков 186-202, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162 и может играть роль в базальном выделении носителя в базолатеральные области, например, позволяя взаимодействие носителя с белком базальной секреции, таким как перлекан. X<sub>4</sub> спен аминокислотных остатков 31-39, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163 и может играть роль в движении носителя из апикального сайта эпителиальной клетки в базальный сайт, например, позволяя взаимодействие носителя с ERGIC белком. X<sub>5</sub> спен

аминокислотных остатков 135-139, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164 и может играть роль в апикальном входе носителя в эпителиальную клетку, например, позволяя взаимодействие носителя с апикальным входным рецептором, таким как TMEM132.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, трансцитозирующий носитель включает аминокислотные остатки любой из SEQ ID NOs: 1-78 или 130 на X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> и/или X<sub>5</sub>. Например, носитель в настоящем документе может иметь аминокислоты 1-266 из SEQ ID NO: 1 или 2 или последовательность, имеющую по существу идентичность последовательности к ней; при условии, однако, что любой один или несколько из X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> и X<sub>5</sub> идентичны таковым из SEQ ID NO: 1 или 2. В одном варианте осуществления, все из X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> идентичны таковым из SEQ ID NO: 1 или 2. то же может быть сказано для всех других носителей и полученных из Cholix носителей, описанных в настоящем документе, Таких, как представлены в **ТАБЛИЦЕ 3** или **ТАБЛИЦЕ 4**.

В некоторых вариантах осуществления, трансцитозирующие носители исключают такие, которые имеют последовательность любой одной или нескольких из Cholix последовательностей полипептидов, указанных в SEQ ID NOs: 1-78 или 130. В некоторых случаях, эти полипептиды исключают такие, которые имеют последовательности, указанные в SEQ ID NO: 3 или усеченной SEQ ID NO: 3 с С-концевым усечением на остатке 425-348, 291, 266, 265, 251, 250, 245, 244, 234, 206, 205, 187, 186, 151, 150, 134, 133, а также фрагмент, состоящий из остатков 40-187 из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, трансцитозирующие носители исключают такие, которые содержат, состоят по существу из или состоят из последовательности SEQ ID NO: 126.

Неожиданно было также установлено, что носители короче трансцитозирующих носителей могут транспортировать гетерологичную полезную нагрузку в поляризованную эпителиальную клетку без значительной транспортировки такой полезной нагрузки через эпителиальную клетку. Такие носители могут быть названы в настоящем документе как «эндоцитозирующие носители». Эндоцитозирующие носители могут оказаться во внутриклеточной везикуле или цитозоле эпителиальной клетки.

Примеры эндоцитозирующего носителя включают такие, которые содержат аминокислотные остатки от любого из положений 1-40 до любого из положений 145-194 **ФОРМУЛЫ I** (SEQ ID NO: 130). В некоторых вариантах осуществления, эндоцитозирующий носитель имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-80 или 82-120, имеющую С-концевое усечение в любом из аминокислотных положений 145-194.

Более того, любой из эндоцитозирующих носителей дополнительно может иметь N-концевое усечение. Такое N-концевое усечение может удалить до 40 аминокислот с N-конца носителя. Например, в настоящем документе рассматриваются носители, содержащие аминокислоты VLYY (SEQ ID NO: 186) или GVLYY (SEQ ID NO: 187) на N-конце, которые являются типовыми для аминокислотных положений 41-44 и 40-44 в SEQ

ID. NO: 130, соответственно. В некоторых случаях, носитель имеет более высокую степень различия последовательностей в положениях 1-40 по сравнению с аминокислотами 41 до С-конца (например, С-конца на аминокислотном остатке, выбранном из положений 145-194) аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-80 или 82-120 или SEQ ID NO: 130. Носитель наиболее предпочтительно содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотных остатков из любого из положений 1-20 до любого из положений 150-187 или от любого одного из аминокислотных остатков в положениях 21-41 до аминокислотного остатка в положении 187 или 205 аминокислотной последовательности, указанной в **ФОРМУЛЕ I** (SEQ ID NO: 130). В **ТАБЛИЦЕ 5** представлены типовые аминокислотные остатки, которые эндоцитозирующий носитель может содержать, состоять по существу из или состоять из.

**ТАБЛИЦА 5 - Типовые аминокислотные остатки Cholix носителей по любой из SEQ ID NOs: 1-78 или 130**

| <b>Cholix AA остатки</b> | <b>Cholix AA остатки</b> |
|--------------------------|--------------------------|
| 1-150                    | 1-178                    |
| 1-151                    | 1-179                    |
| 1-152                    | 1-180                    |
| 1-153                    | 1-181                    |
| 1-154                    | 1-182                    |
| 1-155                    | 1-183                    |
| 1-156                    | 1-184                    |
| 1-157                    | 1-185                    |
| 1-158                    | 1-186                    |
| 1-159                    | 1-187                    |
| 1-160                    | 22-187                   |
| 1-161                    | 23-187                   |
| 1-162                    | 24-187                   |
| 1-163                    | 25-187                   |
| 1-164                    | 26-187                   |
| 1-165                    | 27-187                   |
| 1-166                    | 28-187                   |
| 1-167                    | 29-187                   |
| 1-168                    | 30-187                   |
| 1-169                    | 31-187                   |
| 1-170                    | 32-187                   |

|       |        |
|-------|--------|
| 1-171 | 33-187 |
| 1-172 | 34-187 |
| 1-173 | 35-187 |
| 1-174 | 38-187 |
| 1-175 | 39-187 |
| 1-176 | 40-187 |
| 1-177 | 41-187 |

В некоторых случаях, такой носитель имеет N-концевое усечение в положении 39 **ФОРМУЛЫ I** (SEQ ID NO: 130). В других случаях, такой носитель имеет N-концевое усечение в положении 40 **ФОРМУЛЫ I** (SEQ ID NO: 130). Если такой носитель также усечен на С-конце на любом из аминокислотных остатков в положениях 145-206 (т.е., имеет С-концевой остаток любого из остатков 145-206) последовательности, указанной в **ФОРМУЛЕ I** (SEQ ID NO: 130), такой носитель может применяться для эндоцитоза полезной нагрузки в эпителиальную клетку и транспортировать такую полезную нагрузку в апикальные участки такой эпителиальной клетки (см., например, **ПРИМЕР 4**). Любой из этих эндоцитозирующих носителей, описанных в настоящем документе, также может содержать N-концевую модификацию, такую как N-концевой метионин. Примеры такого носителя включают такие, которые содержат, состоят по существу из или состоят из аминокислотных остатков 41-187 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 137) или аминокислотных остатков 40-205 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 138).

В некоторых вариантах осуществления, эндоцитозирующий носитель может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотных остатков 1-150 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-78 или 130. В некоторых вариантах осуществления, эндоцитозирующий носитель может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотных остатков 1-151 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-78 или 130. В некоторых вариантах осуществления, эндоцитозирующий носитель может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотных остатков 1-186 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-78 или 130. В некоторых вариантах осуществления, эндоцитозирующий носитель может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотных остатков 1-187 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-78 или 130. В одном случае, носитель имеет аминокислоты 1-150, 1-151, 1-186 или 1-187 из SEQ ID NO: 1. В другом случае, носитель имеет аминокислоты 1-150, 1-151, 1-186, 1-187 из SEQ ID NO: 2.

Любой из эндоцитозирующих носителей в настоящем документе может иметь функциональную группу (такую как метионин), присоединенную к его N-концу. Примеры эндоцитозирующих носителей с N-концевым метионином включают те, последовательность которых указана в любой из SEQ ID NO: 136 или 139.

В других случаях, такой эндоцитозирующий носитель содержит аминокислотные

остатки от положения 40 или 41 до любого из аминокислотных остатков в положениях 187-206 аминокислотной последовательности, указанной в **ФОРМУЛЕ I** (SEQ ID NO: 130).

В таких случаях, эндоцитозирующий носитель может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотных остатков 40-187 или 41-187 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-80, 82-120 или 130. В других случаях, носитель, способный транспортировать гетерологичную полезную нагрузку в поляризованную эпителиальную клетку, может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотных остатков 40-205 или 41-205 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-80, 82-120 или 130.

Такой носитель может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотных остатков 40-187, 41-187, 40-205 или 41-205 из SEQ ID NO: 1. Типовые аминокислотные последовательности таких носителей включают такие, которые состоят из, состоят по существу из или содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NOs: 137 и 138. Такие носители могут быть способны транспортировать полезную нагрузку в апикальный участок поляризованной эпителиальной клетки, но не в базальный участок, так как эти носители не имеют аминокислотные остатки 1-39, которые могут играть роль в апикально-базальной транспортировке.

Эндоцитозирующий носитель может содержать фрагмент эндоцитоза, который состоит из аминокислотных остатков от положения 134 к положению 151 аминокислотной последовательности, указанной в Формуле I (SEQ ID NO: 130). В некоторых случаях, такой функциональный фрагмент имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 165 или высокую (например, >90%) идентичность последовательности к ней. Типовые носители включают такие, которые состоят из, состоят по существу из или содержат аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 136-139 (**ТАБЛИЦА 6**). Носители, которые не имеют одного или обоих функциональных фрагментов с SEQ ID NOs: 166-167 (**ТАБЛИЦА 11**), могут транспортировать гетерологичную полезную нагрузку в апикальные участки эпителиальных клеток, которые могут включать локации в апикальных везикулах, в апикальном цитозоле клетки, и/или в апикальные системы рециркуляции, такие как апикальные рециркулирующие эндосомы. Такой носитель может взаимодействовать с апикальным входным рецептором, таким как TMEM132 (например, TMEM132A), но не взаимодействовать или не существенно взаимодействовать с базальными белками миграции или перлеканом (HSPG) и может колокализоваться с Rab11a в апикальных участках эпителиальной клетки после эндоцитоза. В некоторых случаях, такой носитель может состоять из, состоять по существу из или содержать аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 137-139 (**ТАБЛИЦА 6**).

**ТАБЛИЦА 6 - Типовые эндоцитозирующие полученные из Cholix носители**

| SEQ ID NO      | Последовательность                            |
|----------------|-----------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 136 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY |

|                |                                                                                                                                                                                     |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                | SMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV<br>IHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVDE<br>LDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIA<br>ISWPSVSYKA                        |
| SEQ ID NO: 137 | MVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQ<br>DAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASI<br>KISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTR<br>PEHNIAISWPSVSYKA                   |
| SEQ ID NO: 138 | MGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVN<br>QDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPA<br>SIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVT<br>RPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAWHTGL |
| SEQ ID NO: 139 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY<br>SMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV<br>IHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVDE<br>LDQQRNIIEVPKLYSIDL               |

В других вариантах осуществления, эндоцитизирующий носитель может содержать функциональные фрагменты, которые состоят из аминокислотных остатков от положения 1 до положения 40 и от положения 152 до положения 187, соответственно, аминокислотной последовательности, указанной в **ФОРМУЛЕ 1** (SEQ ID NO: 130). В некоторых случаях, такие фрагменты имеют аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 166 и 167, соответственно, или высокую (например, >90%) идентичность последовательности к одному или обоим таким функциональным фрагментам. Такой носитель может взаимодействовать с апикально-базальным рецептором миграции, но не значительно взаимодействовать с перлеканом. Такой рецептор миграции позволяет такому носителю транспортировать полезную нагрузку в надъядерный и/или базальный участок поляризованной эпителиальной клетки. Такой носитель может состоять из, состоять по существу из или содержать аминокислоты 1-187 из SEQ ID NO: 130. Примером такого носителя является такой, который имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 136.

В некоторых случаях, эндоцитизирующий носитель не является фрагментом последовательности, указанной в SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях, такой носитель не является фрагментом любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 4-80 или 82-120. В таких случаях, носитель не содержит или не состоит из аминокислотных остатков 1-151, 1-187 или 40-187 из SEQ ID NO: 3.

#### **D. Функциональные области последовательностей носителей**

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, одна или несколько

функциональных областей последовательности в последовательности носителя могут иметь локализованную высокую (например, >90%) идентичность последовательности к аминокислотным остаткам, обнаруженным в этих областях **ФОРМУЛЕ I** (SEQ ID NO: 130) для поддержания функциональности в многочисленных полипептидах и вариантах осуществления. В некоторых случаях, количество аминокислотных остатков в таких областях может быть ограничено теми, которые найдены в существующих в природе полипептидах Cholix, например, теми, которые имеют последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 1-80 или 82-120.

### 1. Эндоцитозирующий домен

В некоторых случаях, носитель содержит домен, который позволяет носителю проникать в эпителиальную клетку (например, поляризованную эпителиальную клетку) на апикальном сайте. В некоторых случаях, такой домен позволяет носителю взаимодействовать с апикальным входным рецептором. Таким апикальным входным рецептором может быть TMEM132 или TMEM132A. Такой TMEM132 взаимодействующий домен может иметь консенсусную последовательность из аминокислотных остатков 135-151 **ФОРМУЛЫ I** (SEQ ID NO: 130) или аминокислотных остатков из положений 135-151 любой из SEQ ID NOs: 1-120. TMEM132A является трансмембранным белком, который отвечает за апикальный вход носителя в эпителиальную клетку. Для сохранения взаимодействия носителя с TMEM132A, в некоторых вариантах осуществления, носитель в настоящем документе включает SEQ ID NO: 165, которая указана в консенсусной последовательности для TMEM132A взаимодействующим доменом. Альтернативно, носитель в настоящем документе может включать аминокислотные остатки 135-151 из любой одной или нескольких из SEQ ID NOs: 1-120 или 130 в качестве его TMEM132 взаимодействующего домена.

Более того, неожиданно предполагается, что субобласти внутри TMEM132 взаимодействующего домена могут быть особенно важны для апикального входа носителя. Таким образом, носитель в настоящем документе может взаимодействовать с апикальным входным рецептором, таким как TMEM132, через область взаимодействия с аминокислотным мотивом, имеющим аминокислотные остатки 135-139 из SEQ ID NO: 130 (например, «DQQRN» из SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 164). Таким образом, любой из носителей в настоящем документе (включая его полипептиды) может включать такой мотив или весь TMEM132 взаимодействующий домен (например, SEQ ID NO: 165), чтобы обеспечить вход в эпителиальную клетку на апикальной стороне. Поскольку такие области могут иметь функции внутри носителя, аминокислотные последовательности в таких областях могут быть консервативными или иметь только до 1, 2 или 3 аминокислотных остатков, которые являются заменами, вставками и/или делециями.

Любой из носителей в настоящем документе может включать TMEM132 взаимодействующий домен или взаимодействующие с рецептором области для входа в эпителиальную клетку. Например, носитель, содержащий аминокислотные остатки 1-151 из SEQ ID NO: 1, который включает TMEM132 взаимодействующий домен из SEQ ID NO:

165, может проникать в эпителиальные клетки на апикальной стороне. Аналогично, носитель Cholix<sup>266</sup>, такой как носитель, содержащий аминокислотные остатки 1-266 из SEQ ID NO: 1 (например, SEQ ID NO: 181), включает TMEM132 домен и оба могут проникать в апикальную сторону эпителиальных клеток через TMEM132 домен и транспортировать гетерологичную полезную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку. Другими типовыми носителями, содержащими TMEM132 взаимодействующий домен, являются Cholix<sup>187</sup>, Cholix<sup>206</sup>, Cholix<sup>245</sup>, Cholix<sup>251</sup> и Cholix<sup>386</sup> (например, SEQ ID NOs: 136 и 180-184). В некоторых случаях, носителем является такой, который имеет аминокислотные остатки 1-187, 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 или 1-386 из SEQ ID NO: 1.

С другой стороны, носитель, не имеющий TMEM132 взаимодействующий домен, такой как M-Cholix<sup>134</sup>, имеющий SEQ ID NO: 140, может оставаться в кишечном просвете и не проникать или незначительно проникать (например, менее чем 10% продукта носителя, который нанесен на апикальную поверхность) в эпителиальную клетку (см., например, **ПРИМЕР 6**).

## 2. Таргетные домены надъядерного и базального участка

В некоторых случаях, носитель содержит N-концевые аминокислотные остатки 1-40 последовательности, указанные в **ФОРМУЛЕ I** (SEQ ID NO: 130). Такой носитель может применяться для транспортировки гетерологичной полезной нагрузки из апикального в надъядерный или базальный участок (и в подслизистый участок, если такой носитель также может взаимодействовать с белком базальной секреции, таким как перлекан) эпителиальной клетки после эндоцитоза носителя в клетку. Примеры таких носителей включают такие, которые содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NOs: 131-135 (**ТАБЛИЦА 4**).

В некоторых случаях, носитель содержит аминокислотные остатки 17-25 и/или 31-39 последовательности, указанной в **ФОРМУЛЕ I** (SEQ ID NO: 130). Такие области могут быть ограничены такими аминокислотными остатками, которые найдены в существующем в природе Cholix полипептиде или включают вплоть до 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен, вставок и/или делеций. Заменаи могут быть одна или несколько консервативных или не консервативных замен. 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен, вставок и/или делеций могут сохранить функцию аминокислот 17-25 и/или 31-39. В некоторых случаях, носитель имеет существующую в природе последовательность на 17-25 и/или 31-39. В таких случаях, аминокислоты 17-25 носителя могут иметь последовательность SEQ ID NO: 160, и/или аминокислоты 31-39 носителя могут иметь последовательность SEQ ID NO: 163. Функцией аминокислот 17-25 и 31-39 может быть апикально-базальная транспортировка. Такая функция может быть определена, как описано в другом месте в настоящем документе, например, созданием носителей, содержащих N-концевые усечения на таких остатках, и сравнением способности к апикально-базальной транспортировке этих носителей с такими, которые не имеют N-концевого усечения (см., например, **ПРИМЕРЫ 5 и 6**). Типовые носители, содержащие

такие области и способные к апикально-надъядерной и/или базальной транспортировке, могут содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотных остатков 1-187, 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 и 1-386 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. В таких случаях, носитель может состоять из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 131-136.

В некоторых случаях, носитель применяет дополнительный домен для доступа в надъядерный и/или базальный участок. Такой домен может иметь консенсусную последовательность аминокислотных остатков 152-187 **ФОРМУЛЫ I** (SEQ ID NO: 130) или аминокислотных остатков в положениях 152-187 любой из SEQ ID NOs: 1-120. Функцией этого домена может быть доступ в надъядерные области в эпителиальной клетке, достижение базальных участков в эпителиальной клетке и/или колокализация носителя с элементами транс-Гольджи сети, такой как оболочечный белок I (COPI).

Например, носители, такие как Cholix<sup>187</sup> или Cholix<sup>206</sup>, например, носители с последовательностью, указанной в SEQ ID NOs: 136 и 131, соответственно, которые включают такие надъядерные и базальные таргетные области, способны достигать надъядерных областей и базальных участков в эпителиальной клетке, в носитель без такого домена, такой как Cholix<sup>151</sup> (например, SEQ ID NO: 139) остается на апикальной стороне эпителиальной клетки и не имеет значительного доступа в надъядерные области или базальные участки (см., например, **ПРИМЕР 6**).

Считается, что последовательность аминокислотных остатков 170-176 из SEQ ID NO: 130 (например, «TRPEHNI», SEQ ID NO: 161) может иметь особое значение для носителя для доступа к таким надъядерным и базальным участкам и совместной локализации с COPI.

Следовательно, в некоторых случаях, носитель содержит надъядерный и базальный таргетный домен или консенсусную последовательность аминокислотных остатков 170-176 **Формулы I** (SEQ ID NO: 130) или SEQ ID NO: 161 (соответствующую аминокислотным остаткам 170-176 из SEQ ID NO: 1). Такой носитель также может включать TMEM132A взаимодействующий домен, как описано выше.

Надъядерный и базальный таргетный домен является таким, который имеет минимальные вариации последовательности. Как таковой, носитель в настоящем документе может содержать надъядерный и базальный таргетный домен, который имеет аминокислотные остатки существующих в природе полипептидов, таких как в SEQ ID NOs: 3-120, или может содержать только вплоть до 1, 2 или 3, аминокислотных остатков, которые являются заменами, вставками и/или делециями относительно остатков существующих в природе полипептидов, таких как SEQ ID NOs: 3-120.

Типовые носители, включающие надъядерный таргетный домен включают Cholix<sup>187</sup>, Cholix<sup>206</sup>, Cholix<sup>245</sup>, Cholix<sup>251</sup>, Cholix<sup>266</sup> и Cholix<sup>386</sup>. В некоторых случаях, носителем является такой, который имеет аминокислотные остатки 1-187, 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 или 1-386 из SEQ ID NO: 1.

### 3. Домен транцитоза

В некоторых случаях, носитель содержит домен транцитоза. Такой домен предпочтительно может включать консенсусную последовательность из аминокислотных остатков 188-206 **ФОРМУЛЫ I** (SEQ ID NO: 130) или из аминокислотных остатков в положениях 188-206 любой из SEQ ID NOs: 1-120. Функция аминокислотных остатков 188-206 может быть многочисленной и может играть роль в транцитозе. Область транцитоза может позволить взаимодействие носителя с партнерами взаимодействия, такими как транспортный рецептор (также названными в настоящем документе «TRIP»), эндоплазматическим элементом ретикулум-Гольджи-промежуточный участок 53 (ERGIC-53, также названным в настоящем документе LMAN1), регулируемым глюкозой белком 75 (GRP75) и перлеканом в pH-зависимой и/или последовательной манере. Такие взаимодействия могут позволить носителю достигать базальных систем рециркуляции, которые выделяют носитель (вместе с любой гетерологичной полезной нагрузкой, связанной с ним) из базальной мембраны эпителиальной клетки в базолатеральную область (например, lamina propria).

Примеры носителей, способных к транцитозу, включают полученные из Cholix носители, такие как Cholix<sup>206</sup>, Cholix<sup>245</sup>, Cholix<sup>251</sup>, Cholix<sup>266</sup> и Cholix<sup>386</sup>. В некоторых случаях, такие носители имеют аминокислотную последовательность, которая включает аминокислотные остатки 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 и 1-386 из SEQ ID NO: 130. В некоторых случаях, такие носители имеют аминокислотную последовательность, которая включает аминокислотные остатки 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 и 1-386 из SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях, такие носители имеют аминокислотную последовательность, которая включает аминокислотные остатки 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 и 1-386 из SEQ ID NO: 2. Примеры таких носителей с функциональной группой, N-концевым метионином, представлены в SEQ ID NO: 131 - SEQ ID NO: 135. Такой носитель (например, Cholix<sup>206</sup>, Cholix<sup>245</sup>, Cholix<sup>251</sup>, Cholix<sup>266</sup> и Cholix<sup>386</sup>) может применяться для быстрой (например, по меньшей мере, 10<sup>-6</sup> см/сек, 10<sup>-5</sup> см/сек) и эффективной (например, по меньшей мере, 5%, 10%, 20%, 25% или 50% продукта, нанесенного на апикальную поверхность) транспортировки полезной нагрузки через эпителиальную клетку (см., например, **ПРИМЕР 5**).

Было сделано предположение, что последовательность аминокислотных остатков 188-206 (например, «AQKEGSRHKRWANWHTGLA», SEQ ID NO: 168) с одним или несколькими гистидиновыми остатками может действовать как pH-переключатель, тем самым позволяя носителю взаимодействовать с TRIP, такими как TMEM132, LMAN1, GRP75 и перлекан, в последовательной и/или pH-зависимой манере.

В **ТАБЛИЦЕ 7** ниже показаны дополнительные полученные из Cholix полипептидные последовательности, описанные в настоящем документе.

**ТАБЛИЦА 7 - Дополнительные примеры полученных из Cholix полипептидных последовательностей**

| SEQ ID NO      | Последовательность                            |
|----------------|-----------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 140 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY |

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                | SMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV<br>IHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVDE<br>L                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| SEQ ID NO: 179 | VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS<br>MTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVDEL<br>DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI<br>SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAWHTGLALCWLVPMDAIYN<br>YITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI<br>HFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQ<br>AQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRINE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| SEQ ID NO: 189 | VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS<br>MTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI<br>HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVDEL<br>DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI<br>SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAWHTGLALCWLVPMDAIYN<br>YITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI<br>HFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQ<br>AQNIVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRINE<br>NNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADIL<br>SLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV<br>TNWTYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAP<br>VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPT<br>RAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHS<br>LPLRNEAFTGPESAGGEDTVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEEL<br>AIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK |

### **III. Гетерологичная полезная нагрузка**

Гетерологичные полезные нагрузки, рассматриваемые в настоящем документе, могут быть любой природы, включая терапию, диагностику и визуализацию. Полезная нагрузка может быть частью конструкции доставки. Конструкция доставки может включать носитель, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. Полезная нагрузка может быть прямо или косвенно, ковалентно или не ковалентно, связана с носителем. При ковалентном присоединении, полезная нагрузка может быть напрямую прикреплена к носителю или через спейсер.

Гетерологичной полезной нагрузкой может быть малая молекула, нуклеиновая кислота, полипептид, белок, наночастица или их комбинация.

### Терапевтические полезные нагрузки

В некоторых случаях, терапевтической полезной нагрузкой является полипептид, такой как, например, цитокин, гормон, фактор роста, терапевтическое антитело, нуклеиновая кислота, антиген, фермент, фактор свертывания крови, нейротрансмиттер или полимер.

Цитокины, представленные в настоящем документе, включают хемокины и интерлейкины (также сокращенные в настоящем документе как «IL»). Интерлейкином 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, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, IL-37, IL-38, IL-39 или IL-40.

В некоторых случаях, интерлейкином является IL-10 или IL-22. Интерлейкин может происходить от любого вида (например, от человека или грызуна) и предпочтительно от организма, в который предполагается вводить полезную нагрузку или конструкцию доставки, содержащую такую полезную нагрузку. Таким образом, в некоторых случаях, интерлейкин является интерлейкином человека. Интерлейкин, представленный в настоящем документе, может быть предшественником зрелого секретированного интерлейкина. Такой предшественник интерлейкина может содержать сигнальную пептидную последовательность. Например, в некоторых случаях, терапевтическая полезная нагрузка может быть предшественником зрелого секретированного белка. В других случаях, терапевтической полезной нагрузкой является секретированный белок. Например, в некоторых случаях полезная нагрузка содержит, состоит по существу или состоит из SEQ ID NO 141, которая является полноразмерным предшественником IL-22. В других случаях полезная нагрузка включает, состоит по существу или состоит из SEQ ID NO: 142, которая является секретированной формой IL-22. В другом примере, полезная нагрузка включает, состоит по существу или состоит из SEQ ID NO 144, которая является полноразмерным предшественником IL-10. В других случаях, полезная нагрузка включает, состоит по существу или состоит из SEQ ID NO: 145, которая является секретированной формой IL-10.

Гетерологичная полезная нагрузка может содержать N-концевой метионин. Например, IL-22 полезная нагрузка может содержать N-концевой метионин. В таких случаях, IL-22 может иметь последовательность SEQ ID NO: 143.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой является IL-22. IL-22 может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 141 или SEQ ID NO: 142 или ее функционального фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая полезная нагрузка содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 142.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой

является IL-10. IL-10 может содержать, состоять по существу из или состоять из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 144 или SEQ ID NO: 145 или ее функционального фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая полезная нагрузка содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 145.

Гормоны в настоящем документе могут включать пептидные и полипептидные гормоны. Такие гормоны могут включать гормоны роста, например гормон роста человека (также называемый в настоящем документе hGH или соматотропин); гормоны гипофиза, например, хорионический гонадотропин, косинтропин, менотропины, иортикотропин, протирелин, тиреотропин, вазопрессин, липрессин; гормоны парашитовидной железы; гормоны щитовидной железы; гормоны яичек; гормоны желудочно-кишечного тракта, например, желудочно-кишечный полипептид, эпидермальный фактор роста-урогастрон, желудочный ингибиторный полипептид, гастрин-высвобождающий пептид, гастрины, пентагастрин, тетрагастрин, мотилин, нейропептид Y, пептид YY, секретин, вазоактивный кишечный пептид, синкаlid; инкретиновые гормоны, например, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) и глюкозозависимый инсулиноотропный полипептид (GIP); метаболические гормоны, например, инсулин; и любые их производные или фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления, гормоном является гормон роста человека, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 146 или 190 или ее фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтической полезной нагрузкой является агент, снижающий уровень глюкозы. В таких случаях, полезной нагрузкой может быть агент GLP-1 или агонист GLP-1. Таким агонистом может быть Экзенатид или Лираглутид. В других случаях, агентом, снижающим глюкозу, может быть инкретин, глюкагоновый пропротеин, глюкагоноподобный пептид (например, кроме GLP-1), полипептид, связанный с глицентинном, эксендин-3, эксендин-4, ликсисенатид (торговые наименования Adlyxin® и Lixumia®, Sanofi), лираглутид (торговое наименование Victoza®, Novo Nordisk A/S), семаглутид (торговое наименование Ozempic®, Novo Nordisk A/S), албиглутид (торговое наименование Tanzeum®, GlaxoSmithKline; GLP-1 димер, слитый с альбумином), дилаглутид (торговое наименование Trulicity®, Eli Lilly), глюкозозависимый инсулиноотропный полипептид, Тирзепатид (Eli Lilly), двойной агонист амилин-кальцитонинного рецептора DACRA-089, Glargine/Lantus®, Glulisin/Apidra®, Glarine/Toujeo®, Insuman®, Detemir/Levemir®, Lispro/Humalog®/Liprolog®, Humulin®, Linjeta, SuliXen®, NN1045, инсулин плюс SymlinTM, PE0139, быстродействующий и краткосредствующий инсулины (например, Linjeta, PH20, NN1218, HinsBet), (APC-002) гидрогель, пероральный, ингалируемый, чрезкожный и подязычный инсулины (например

Exubera®, Nasulin®, Afrezza®, Tregopil®, TPM 02, Capsulin, Oral-lyn®, Cobalamin®, пероральный инсулин, ORMD-0801, NN1953, NN1954, NN1956, VIAtab и пероральный инсулин Oshadi).

В некоторых случаях, терапевтической полезной нагрузкой является терапевтическое антитело или его связывающий фрагмент. Терапевтические антитела могут включать анти-TNF $\alpha$  антитела. Такие анти-TNF $\alpha$  антитела могут быть гуманизированными или антителами человека. Анти-TNF $\alpha$  агенты могут включать инфликсимаб (Remicade®), адалимумаб (Humira®) или этанерцепт (ENBREL®).

В некоторых случаях полезной нагрузкой является противоопухолевое средство. Противоопухолевые средства могут включать нитрозомочевины, например кармустин, ломустин, семустин, стрепзотоцин; метилгидразины, например, прокарбазин, дакарбазин; стероидные гормоны, например, глюкокортикоиды, эстрогены, прогестины, андрогены, тетрагидродезоксикарикетерон; иммуноактивные соединения, такие как иммунодепрессанты, например, пириметамин, триметоптерин, пеницилламин, циклоспорин, азатиоприн; и иммуностимуляторы, например, левамизол, диэтилдитиокарбамат, энкефалины, эндорфины; противомикробные соединения, такие как антибиотики, например, бета-лактамы, пенициллин, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы, ингибиторы бета-лактамазы, аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, спектиномицин; противомаларийные средства, амебициды; антипротозойные агенты; противогрибковые средства, например, амфотерицин-бета, противовирусные средства, например, ацикловир, идоксуридин, рибавирин, трифлуридин, видарбин, ганцикловир; противопаразитные агенты; противогельминтные агенты; радиофармацевтические агенты; желудочно-кишечные лекарственные средства; гематологические соединения; иммуноглобулины; белки свертывания крови, например, антигемофильный фактор, комплекс фактора IX; антикоагулянты, например, дикумарол, гепарин Na; ингибиторы фибролизина, например, транексамовая кислота; сердечно-сосудистые лекарственные средства; периферические антиадренергические лекарственные средства; антигипертензивные лекарственные средства центрального действия, например, метилдопа, метилдопа HCl; антигипертензивные прямые вазодилататоры, например, diaзоксид, гидралазин HCl; лекарственные средства, влияющие на ренин-ангиотензиновую систему; периферические вазодилататоры, например, фентоламин; противоангинные лекарственные средства; сердечные гликозиды; инодилататоры, например, амрион, милрион, эноксимон, феноксимон, имаодан, сульмазол; антиаритмические агенты; блокаторы входа кальция; лекарственные средства, влияющие на жиры крови, например, ранитидин, бозентан, резулин; респираторные лекарственные средства; симпатомиметические лекарственные средства, например, альбутерол, мезилат битолтерола, добутамин HCl, дофамин HCl, эфедрин натрия (So), адреналин, фенфлурамин HCl, изопротеренол HCl, метоксамин HCl, битартрат норадреналина, фенилэфрин HCl, ритодрин HCl; холиномиметические лекарственные средства, например, ацетилхолин HCl; антихолинэстеразы, например, эдрофония хлорид (Cl); реактиваторы

холинэстеразы; адренергические блокирующие лекарственные средства, например, ацебутолол HCl, атенолол, эсмолол HCl, лабеталол HCl, метопролол, надолол, мезилат фентоламина, пропранолол HCl; антимиокардиальные лекарственные средства, например, метилбромид анизотропина, атропин, бромид клинидия (Br), гликопирролат, ипратропиум Br, скополамин HBr; нервно-мышечные блокирующие лекарственные средства; деполяризующие лекарственные средства, например, безилат атракурия, гексафлуорений Br, метокурина йодид, сукцинилхолин Cl, тубокурарин Cl, векуроний Br; миорелаксанты центрального действия, например баклофен; нейротрансмиттеры и нейротрансмиттерные агенты, например, ацетилхолин, аденозин, аденозинтрифосфат; аминокислотные нейротрансмиттеры, например, возбуждающие аминокислоты, ГАМК, глицин; биогенные аминовые нейротрансмиттеры, например, дофамин, эпинефрин, гистамин, норэпинефрин, октопамин, серотонин, тирамин; нейропептиды, оксид азота; антипаркинсонические лекарственные средства, например, амальтидин HCl, мезилат бензтропина, карбидопа; диуретические лекарственные средства, например, дихлорфенамид, метазоламид, бендрофлуметиазид, политиазид; лекарственные средства против мигрени, например, мезилат трометамин карбопроста или малеат метисергида или его функциональное производное.

В некоторых случаях, полезной нагрузкой является фермент, такой как гиалуронидаза, стрептокиназа, активатор плазминогена ткани, урокиназа, PGE-аденозиндезаминаза; внутривенные анестетики, такие как дроперидол, этомидат, фетанилцитрат/дроверидол, гексобарбитал, кетамин HCl, метогекситал Na, тиамилал Na, тиопентал Na; противоэпилептические средства, например, карбамазепин, клоназепам, дивалпрокс Na, этосуксимид, мефенилоин, параметадион, фенилоин, примидон. В разных вариантах осуществления, биологически активной полезной нагрузкой является фермент, выбранный из гиалуронидазы, стрептокиназы, активатора плазминогена ткани, урокиназы или PGE-аденозиндезаминазы.

В ТАБЛИЦЕ 8 показаны аминокислотные последовательности типовых терапевтических полезных нагрузок, представленных в настоящем документе.

**ТАБЛИЦА 8 - Аминокислотные последовательности типовых терапевтических полезных нагрузок**

| SEQ ID NO         | Последовательность                                                                                                                                                                               |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:<br>141 | MAALQKSVSSFLMGTSLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRLDKSN<br>FQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLLIGEKLFHGVSMSERCYLM<br>KQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDL<br>HIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI |
| SEQ ID NO:<br>142 | APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLLIGEKLF<br>HGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARL<br>SNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFM<br>SLRNACI                                   |

|                   |                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:<br>143 | MAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRDIGEK<br>LFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPFLA<br>RLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLL<br>FMSLRNACI                                                    |
| SEQ ID NO:<br>144 | MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRD<br>AFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCAQALSEMIQFYLE<br>EVMPPAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKA<br>VEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN                  |
| SEQ ID NO:<br>145 | SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDN<br>LLLKESLLEDFKGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHV<br>NSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIY<br>KAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN                                    |
| SEQ ID NO:<br>146 | FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQN<br>PQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSV<br>FANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQT<br>YSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEG<br>SCGF  |
| SEQ ID NO:<br>190 | MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQ<br>NPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRS<br>VFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQ<br>TYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVE<br>GSCGF |
| SEQ ID NO:<br>195 | H-HisGlyGluGlyThrPheThrSerAspLeuSerLysGlnMetGluGluGlu<br>AlaValArgLeuPheIleGluTrpLeuLysAsnGlyGlyProSerSerGlyAla<br>ProProProSer-NH <sub>2</sub>                                                                  |

#### **IV. Спейсер**

Носитель может быть связан с гетерологичной полезной нагрузкой через спейсер. Спейсер, представленный в настоящем документе, может обеспечивать пространственную гибкость, точное свертывание и/или правильную биологическую активность и функционирование обоих, носителя и полезной нагрузки.

Спейсер может содержать один или несколько аминокислотных остатков. В некоторых случаях, спейсером является спейсер на основе аминокислоты. Такой спейсер может содержать, состоять по существу из или состоять из, по меньшей мере, примерно 5, 10, 15, 20, 25, 35, 50, 75 или 100 аминокислотных остатков. В некоторых случаях, спейсер содержит, состоит по существу из или состоит из не более примерно 30, 25, 20, 15 или 10 аминокислотных остатков. В некоторых случаях, большинство (например, более 90%)

этих аминокислотных остатков являются глициновыми и/или сериновыми остатками.

Спейсер может быть расщепляемым или не расщепляемым. В некоторых случаях, расщепляемый спейсер может расщепляться ферментом, например, протеазой. Не расщепляемый спейсер может не расщепляться таким ферментом. Например, не расщепляемый спейсер может использоваться в случаях, когда целью являются более высокие системные концентрации полезной нагрузки.

Спейсер может содержать один или несколько повторов глицин-сериновых олигопептидных последовательностей. Таким образом, в некоторых случаях, носитель содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотных последовательностей  $(GS)_x$  (SEQ ID NO: 169),  $(GGS)_x$  (SEQ ID NO: 170),  $(GGGS)_x$  (SEQ ID NO: 171),  $(GGGGS)_x$  (SEQ ID NO: 172) или  $(GGGGGS)_x$  (SEQ ID NO: 173), где  $x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14$  или  $15$ . В некоторых случаях, спейсер содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности  $(GGGGS)_x$  (SEQ ID NO: 174), где  $x=1, 2, 3, 4$  или  $5$ . В таких случаях, спейсер может состоять из 5, 10, 15, 20 или 25 аминокислот.

Примеры спейсеров, представленных в настоящем документе, включают такие, которые содержат, состоит по существу из или состоят из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 50%, 75%, 90% или 99% идентичность последовательности к  $GGGGS GGGGS GGGGS$  (SEQ ID NO: 175),  $GGGGS GGGGS GGGGS$  (SEQ ID NO: 176) или  $GGGGS NLQGGLRQPR$  (SEQ ID NO: 177), фрагменту любой из вышеперечисленных или комбинацией любых из вышеперечисленных. В некоторых случаях, спейсер состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой одной или SEQ ID NO: 196 ( $GGGGS$ ) или SEQ ID NO: 197 ( $GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS$ ). В некоторых случаях, любой из вышеуказанных спейсеров могут содержать дополнительный глициновый или сериновый остаток на любом из N- и/или C-конце.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер, сопрягающий носитель с терапевтической полезной нагрузкой, содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 50%, 75%, 90% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NOs: 175-176.

## **V. Конструкции доставки**

В настоящем документе представлены конструкции доставки (например, комплекс носитель-полезная нагрузка), которые могут содержать носитель, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. Носитель может быть связан с такой полезной нагрузкой ковалентно или не ковалентно (например, через ионные взаимодействия, ван-дер-ваальсовы взаимодействия,  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия и т.д.). Носитель может быть напрямую или косвенно связан с гетерологичной полезной нагрузкой.

Гетерологичная полезная нагрузка может быть связана с N- и/или C-концом носителя. В некоторых случаях, гетерологичная полезная нагрузка прямо и ковалентно связана с C-концом носителя через образование ковалентной амидной связи между C-концевой карбоксильной группой носителя и N-концевым амином гетерологичной

полезной нагрузки. В некоторых случаях, гетерологичная полезная нагрузка косвенно и ковалентно связана с носителем через спейсер.

Таким образом, в некоторых случаях, если носитель ковалентно связан с полезной нагрузкой, конструкция доставки может быть представлена согласно Формуле II: C-S-P или Формуле III: P-S-C, где C является носителем, S является спейсером или, необязательно, связью, и P является гетерологичной полезной нагрузкой. Конструкция доставки может дополнительно содержать одну или несколько модификаций на ее N-конце и/или C-конце. Такие модификации могут включать N-концевой метиониновый остаток. Таким образом, Формула II и Формула III могут также включать N-концевой метионин (например, M+C-S-P) или (например, M+P-S-C).

Носитель может быть связан с гетерологичной полезной нагрузкой через химическое/синтетическое конъюгирование (например, с применением реакций амидного сочетания) или рекомбинантную экспрессию в бактериальных (например, в *E. coli*) или млекопитающих (например, яичников китайского хомяка (CHO)) клетках в виде слитого белка.

Конструкция доставки или ее часть (например, носитель и/или спейсер) может быть полипептидом. Термин «полипептид», используемый в настоящем документе, может включать как природные, так и не природные аминокислоты.

Конструкции доставки, представленные в настоящем документе, могут транцитозировать через поляризованные эпителиальные клетки с высокой скоростью потока через одно или несколько умеренно-аффинных, высокопроизводительных динамических и/или pH-зависимых взаимодействий носителя с одним или несколькими партнерами, подобными рецептору транспортировки (TRIP). Такие TRIP могут быть элементами эндогенного пути миграции и, как таковые, могут позволить носителю транспортировать гетерологичную полезную нагрузку через эпителиальный клеточный барьер без нарушения самого барьера и без значительного изменения (например, химической/ферментативной модификации) носителя или полезной нагрузки.

Кроме того, взаимодействия с TRIP могут позволять носителю транспортировать полезную нагрузку через интактный эпителий (например, поляризованный эпителий кишечника) со скоростью транспортировки, по меньшей мере, примерно  $10^{-6}$  см/сек,  $10^{-5}$  см/сек или  $10^{-4}$  см/сек.

В некоторых случаях, носитель косвенно и не ковалентно связан с полезной нагрузкой. В таких случаях наночастицы (например, липосомы, металлические наночастицы, наночастицы на полимерной основе и т.д.) могут быть загружены (например, внутри и/или на поверхности частицы) полезными молекулами (например, IL-10, IL-22, GLP-1 и т.д.), и полученный из CholiX носитель молекулы может быть связан с такими наночастицами (например, на его поверхности). В некоторых случаях, соотношение полезной нагрузки к носителю может быть, по меньшей мере, примерно 15000:1, 10000:1, 5000:1, 2500:1, 1000:1, 500:1, 250:1, 100:1, 50:1, 25:1, 10:1, 5:1, 2.5:1, 1:1. Это может позволить транспортировку таких наночастиц, содержащих полезную

нагрузку, внутрь или через поляризованные эпителиальные клетки (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника) с использованием носителей, полученных из Cholix, прикрепленных к поверхности. В некоторых случаях наночастицы могут высвобождать полезную нагрузку после трансцитоза или внутриклеточной доставки. В случаях, когда наночастицы транспортируются через эпителиальные клетки, высвободившаяся полезная нагрузка может связываться с рецепторами в подслизистой ткани (например, lamina propria) и/или могут попадать в системный кровоток и, таким образом, выполнять определенную функцию (например, терапевтическую или диагностическую) системно. В других случаях, когда наночастицы высвобождают полезную нагрузку внутри эпителиальных клеток, полезная нагрузка (например, нуклеиновая кислота) может обеспечивать определенные внутриклеточные функции, например, продуцирование транскриптов в этих клетках, модуляцию экспрессии генов и т.д.

#### **Типовые конструкции доставки**

В разных вариантах реализации, конструкция доставки или комплекс носитель-полезная нагрузка включает (а) носитель, содержащий полипептид Cholix, который не содержит SEQ ID NO: 179 и не состоит из SEQ ID NO: 126, в комплексе с (b) гетерологичной полезной нагрузкой, где носитель способен (i) трансцитозировать гетерологичную полезную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку; или (ii) транспортировать гетерологичную полезную нагрузку в поляризованную эпителиальную клетку.

В некоторых вариантах осуществления, конструкция доставки содержит полученный из Cholix носитель, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к аминокислотным остаткам 1-386 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления, конструкция доставки содержит полученный из Cholix носитель, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к аминокислотным остаткам от любых из положений 1-40 до любых из аминокислотных остатков в положениях 150-347 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях, такой носитель содержит, состоит по существу из или состоит из, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности к аминокислотным остаткам из положений 1-151, 1-187, 41-187, 1-206, 1-245, 1-251 или 1-266 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1. В других случаях, носитель содержит, состоит по существу из или состоит из, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности к аминокислотным остаткам из положений 1-151, 1-187, 41-187, 1-206, 1-245, 1-251 или 1-266 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2.

Любой из таких носителей может быть связан с терапевтически полезной

нагрузкой, содержащей, состоящей по существу из или состоящей из, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности к аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NOs: 141, 142, 144, 145 и 146.

Такая терапевтически полезная нагрузка может быть связана с полученным из Cholix носителем через спейсер содержащий, состоящий по существу из или состоящий из, по меньшей мере, 66%, 73%, 80%, 86%, 93% или 100% идентичности последовательности к аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 175).

Таким образом, в некоторых случаях, конструкция доставки содержит носитель, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 134, связанной через спейсер с терапевтически полезной нагрузкой, содержащей, состоящей по существу из или состоящей из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 142. В некоторых случаях, спейсер содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 66%, 73%, 80%, 86%, 93% или 100% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 175.

В других случаях, конструкция доставки содержит носитель, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 135, связанный со спейсером через терапевтически полезную нагрузку, содержащую, состоящую по существу из или состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 142. В некоторых случаях, спейсер содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 66%, 73%, 80%, 86%, 93% или 100% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 175.

В некоторых случаях, конструкция доставки содержит носитель содержащий, состоящий по существу из или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 134 через спейсер, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из аминокислотную последовательности, имеющей, по меньшей мере, 66%, 73%, 80%, 86%, 93% или 100% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 175, с терапевтически полезной нагрузкой. Такой терапевтически полезной нагрузкой может быть цитокин, гормон или терапевтическое антитело или его функциональный связывающий фрагмент. В некоторых случаях, терапевтически полезная нагрузка содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 145 или SEQ ID NO:

146.

В некоторых случаях, конструкция доставки содержит носитель, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 135 через спейсер, содержащий, состоящий по существу из или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 66%, 73%, 80%, 86%, 93% или 100% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 176 с терапевтически полезной нагрузкой. Такой терапевтически полезной нагрузкой может быть цитокин, гормон или терапевтическое антитело или его функциональный связывающий фрагмент. В некоторых случаях, терапевтически полезная нагрузка содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 145.

В некоторых случаях, конструкция доставки содержит, состоит по существу из или состоит из, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности к аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 147-150, 152-159 или 188.

В некоторых вариантах осуществления, конструкция доставки состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 147.

В некоторых вариантах осуществления, конструкция доставки состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления, конструкция доставки состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 188.

Аминокислотные последовательности типовых конструкций доставки в настоящем документе показаны в **ТАБЛИЦЕ 9**.

**ТАБЛИЦА 9 - Аминокислотные последовательности типовых конструкций доставки**

| SEQ ID NO     | Последовательность                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:147 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHVYNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPK<br>LYSIDLDNQTLQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG<br>SRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY<br>ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGSGGGGSGGGGSAP<br>ISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLLIGEKLFGH<br>VSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNR<br>LSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLR<br>NACI |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID<br>NO:148 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPK<br>LYSIDLDNQTTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG<br>SRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY<br>ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLE<br>TLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLD<br>QEPEVAERLSDLRRINENNPMTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAGGGGSGGGGSGGGGSPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTF<br>MLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEV<br>LFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKD<br>TVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI           |
| SEQ ID<br>NO:149 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPK<br>LYSIDLDNQTTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG<br>SRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY<br>ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLE<br>TLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLD<br>QEPEVAERLSDLRRINENNPMTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAGGGGSGGGGSGGGGSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNML<br>RDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLKESLLEDFKGYLGCAALSEMI<br>QFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFPC<br>NKS KAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN |
| SEQ ID<br>NO:150 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPK<br>LYSIDLDNQTTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG<br>SRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY<br>ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSLNQGGLRQPRFP<br>TIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQ<br>TSLCFSES IPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFAN<br>SLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKF<br>DTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF                                                                                         |
| SEQ ID NO:       | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 151               | NDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELGGGGSGGGG<br>SGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQK<br>YSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQ<br>FLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQI<br>FKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRS<br>VEGSCGF                                                                                                               |
| SEQ ID NO:<br>152 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPK<br>LYSIDLGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFD<br>TYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLEL<br>LRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQT<br>LMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKD<br>MDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF                                         |
| SEQ ID NO:<br>153 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPK<br>LYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAGGGGS<br>GGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIP<br>KEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSW<br>LEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSP<br>RTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRI<br>VQCRSVEGSCGF |
| SEQ ID NO:<br>154 | MVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF<br>GVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELD<br>QQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSV<br>SYKAGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDT<br>YQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELL<br>RISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTL<br>MGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDM<br>DKVETFLRIVQCRSVEGSCGF                                             |
| SEQ ID NO:<br>155 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPK                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   | LYSIDLNDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG<br>SRHKRWAHWHTGLAGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFD<br>TYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISL<br>LLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTG<br>QIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF                                                                                                                                                                                                                  |
| SEQ ID NO:<br>156 | MGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHL<br>DITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNII<br>EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR<br>HKRWAHWHTGLGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFD<br>TYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISL<br>LLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRT<br>GQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSC<br>GFHHHHHH                                                                                      |
| SEQ ID NO:<br>157 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN<br>DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKT<br>YSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDN<br>QTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLA<br>LCVLPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVGGGGSGGGGSGGGG<br>SFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFD<br>TYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISL<br>LLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRT<br>GQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSC<br>GF      |
| SEQ ID NO:<br>158 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN<br>DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKT<br>YSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDN<br>QTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLA<br>LCVLPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGGGGSGGGG<br>SGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFD<br>TYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISL<br>LLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRT<br>GQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSC<br>GF |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:<br>159 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIIIEVPK<br>LYSIDLDNQTTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG<br>SRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY<br>ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGGGGSGGGGSGFP<br>TIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQ<br>TSLCFSES IPTSPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFAN<br>SLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKF<br>DTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF |
| SEQ ID NO:<br>188 | MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIIIEVPK<br>LYSIDLDNQTTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG<br>SRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY<br>ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGGGGSGGGGSGAP<br>ISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFGH<br>VSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNR<br>LSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLR<br>NACI                                                 |
| SEQ ID NO:<br>198 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIIIEVPK<br>LYSIDLDNQTTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG<br>SRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY<br>ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGAPISSHCRLDKSN<br>FQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFGHGVSMSERCYLM<br>KQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDL<br>HIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI                                                              |
| SEQ ID NO:<br>199 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIIIEVPK<br>LYSIDLDNQTTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG<br>SRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY<br>ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGGGGSGGGGSGG                                                                                                                                                                                                                 |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   | GGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTD<br>VRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQE<br>VVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIG<br>ELDLLFMSLRNACI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| SEQ ID NO:<br>200 | MAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKL<br>FHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARL<br>SNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMS<br>LRNACIGGGGSVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVL<br>DEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF<br>GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELD<br>QQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSV<br>SYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTL<br>GDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG                                                                                                                                  |
| SEQ ID NO:<br>201 | MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI<br>NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE<br>NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPK<br>LYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG<br>SRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY<br>ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLE<br>TLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDE<br>QEPEVAERLSDLRRINENNPMTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE<br>QTSAGAQAGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLAD<br>NNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPY<br>MQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEI<br>KAIGELDLLFMSLRNACI |

## **VI. Способы применения**

В настоящем документе представлены, в некоторых вариантах осуществления, конструкции доставки, содержащие носитель, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. Носители, представленные в настоящем документе, могут применяться для транспортировки такой полезной нагрузки (например, терапевтической полезной нагрузки) в разные локации внутри эпителиальной клетки, такие как апикальная сторона (например, апикальная система рециркулирования), базальная сторона и/или надъядерные участки. Доставка через поляризованный эпителий кишечника может включать доставку в подслизистые участки (например, lamina propria и/или другие подслизистые участки кишечника) и/или системный кровоток (например, через воротную систему печени).

## **A. Способы лечения**

Способность к транспортировке с высокой скоростью носителей, представленных в настоящем документе, через интактные эпителиальные барьеры (например, поляризованный эпителий кишечника) могут использоваться для доставки терапевтических и/или диагностических полезных молекул субъекту, нуждающемуся в этом (например, человеку или грызуну). Например, доставка терапевтически полезной нагрузки к подслизистым участкам, например, *lamina propria*, может позволить лечение и/или диагностику заболеваний или состояний, локализованных и/или происходящих из таких локаций в ЖК тракте, тогда как системная доставка полезной нагрузки может применяться для обеспечения терапевтически эффективных концентраций в различных клетках, тканях или органах внутри организма.

Заболевания, которые можно лечить с применением конструкции доставки по настоящему описанию, могут включать воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, рак, метаболические заболевания, нейродегенеративные заболевания и неврологические заболевания, вирусные заболевания или инфекции и сердечно-сосудистые заболевания.

В некоторых случаях воспалительное заболевание может включать воспалительное заболевание кишечника, псориаз, бактериальный сепсис, болезнь Крона (например, фистулизирующую болезнь Крона), язвенный колит (например, язвенный колит от умеренного до тяжелого или язвенный колит от легкого до умеренного), коллагеновый колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, диверсионный колит, синдром Бехчета, неопределенный колит, панкреатит, воспаление печени (например, гепатит), паучит, проктит и повреждения эпителиальных клеток.

В некоторых случаях аутоиммунное заболевание может включать системную красную волчанку (SLE), вульгарную пузырчатку, миастению гравис, гемолитическую анемию, тромбоцитопеническую пурпуру, болезнь Грейвса, болезнь Шегрена, дерматомиозит, болезнь Хашимото, полимиозит, рассеянный склероз, сахарный диабет, ревматоидный артрит и склеродермию.

В некоторых случаях рак может включать неходжкинские лимфомы (NHL), лимфому Ходжкина, хронический лимфоцитарный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, множественную миелому, карциномы мочевого пузыря, почек, яичников, шейки матки, груди, легкого или рак носоглотки, злокачественную меланому, резистентную к ритуксимабу NHL и лейкоз.

В некоторых случаях метаболическое расстройство может включать диабет, диабет как следствие ожирения, гипергликемию, дислипидемию, гипертриглицеридемию, синдром X, инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическую дислипидемию, гиперлипидемию, жировую болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, ожирение, нарушение толерантности к глюкозе, повышение уровня глюкозы натощак, инсулинорезистентность, секрецию альбумина с мочой, центральное ожирение, гипертонию, повышенный уровень триглицеридов, повышенный холестерин ЛПНП и/или пониженный холестерин ЛПВП, гипергликемию,

гиперинсулинемию, дислипидемию, кетоз, гипертриглицеридемию, синдром Х, инсулинорезистентность, нарушенную гликемию натощак, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическую дислипидемию, глюконеогенез, избыточный гликогенолиз, диабетический кетоацидоз, гипертриглицеридемию, гипертонию, диабетическую нефропатию, почечную недостаточность, отказ почек, гиперфагию, мышечное истощение, диабетическую невропатию, диабетическую ретинопатию, диабетическую кому, артериосклероз, ишемическую болезнь сердца, заболевание периферических артерий и гиперлипидемию.

В некоторых случаях, сердечно-сосудистые заболевания могут включать сосудистые заболевания, болезни сердца и инсульт.

Другие заболевания и состояния, которые можно лечить с помощью конструкции доставки по настоящему описанию, могут включать дефицит гормона роста (GHD), синдром Тернера (TS), синдром Нунана, синдром Прадера-Вилли, дефицит гена, содержащего гомеобокс карликовости (SHOX), хроническую почечную недостаточность, идиопатическую карликовость, синдром короткой кишки, аллергию, болезнь трансплантат против хозяина, анемию, нарушения гемопоэтических клеток и заболевания эндокринной системы или репродуктивной системы.

Кроме того, конструкция доставки может быть введена в виде фармацевтической композиции субъекту, нуждающемуся в этом. Конструкция доставки в настоящем документе может быть составлена в фармацевтическую композицию для повышения терапевтической эффективности. Например, конструкция доставки может быть составлена таким образом, чтобы она выделялась в определенных местах в желудочно-кишечном тракте субъекта или вокруг него. В некоторых случаях, конструкция доставки может быть составлена так, чтобы повысить ее биологическую активность по вовлечению иммунных клеток в различные части желудочно-кишечного тракта или вокруг него, такие как подвздошная кишка.

Конструкция доставки может вводиться различными способами введения. В некоторых случаях, введение включает пероральное введение конструкции доставки. В некоторых случаях, конструкцию доставки вводят перорально в виде таблетки или капсулы.

## **В. Экспериментальные способы**

В настоящем документе представлены способы тестирования транцитоза и оценки белков, взаимодействующих с Cholix носителем (например, TRIP).

### **1. Тестирование транцитоза**

Функция транцитоза выделенных конструкций доставки может быть тестирована как функция способности конструкций доставки проходить через эпителиальную мембрану (например, поляризованный эпителий кишечника) через транцитоз. Транцитозная активность конструкций доставки может быть тестирована любым способом, известным специалисту в данной области техники, без ограничений. В разных вариантах осуществления, транцитозная активность может быть тестирована через

оценку способности конструкции доставки проникать в неполяризованные клетки, с которыми она связана. В случаях полученного из Cholix носителя и без намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, в настоящем документе описано, что функция транцитоза, которая позволяет конструкции доставки проходить через поляризованную эпителиальную клетку, и функция входа в неполяризованные клетки может находиться в одном и том же домене или области, т.е., на аминокислотных остатках 1-266 из SEQ ID NO:1. Таким образом, способность конструкции доставки проникать в клетку может быть оценена, например, определением физического присутствия конструкции внутри клетки. Например, конструкция доставки может быть мечена, например, флуоресцентным маркером, и воздействием конструкции доставки на клетку. Затем клетки могут быть промыты, для удаления конструкции доставки, которая не проникла в клетку, и количество метки, оставшейся в клетке, может быть определено. Определение метки внутри этих клеток, например, с применением микроскопии, показывает, что конструкция доставки проникла в клетку.

Способность конструкции доставки к транцитозу может быть тестирована через оценку способности конструкции доставки проходить через поляризованную эпителиальную клетку. Например, конструкция доставки может быть мечена, например, флуоресцентным маркером (например, RFP) и подвергнута контакту с апикальными мембранами слоя эпителиальных клеток. В другом примере, конструкция доставки может быть определена с применением антител (например, моноклональных и/или поликлональных антител), направленных против конструкции доставки или ее части, такой как полученный из Cholix носитель или полезная нагрузка. Флуоресценция, определенная на базолатеральной стороне мембраны, образованной эпителиальными клетками (например, базолатеральной камере, как показана на **ФИГ.1** или lamina propria в *in vivo* экспериментах) показывает, что способность носителя к транцитозу остается не тронутой.

*In vivo* транцитоз может быть тестирован с применением самцов крыс Wistar. Самцов крыс Wistar размещают по 3-5 в клетке с 12/12 ч циклом свет/темнота, и они имеют вес 225-275 г (приблизительно возраст 6-8 недель) при поступлении на исследование. Эксперименты могут проводиться во время светлой фазы с применением протокола без восстановления, в котором применяют непрерывную анестезию изофлураном. Может быть сделан 4-5 см разрез в середине брюшины, который обнажает средние области тощей кишки. Исходные растворы  $3,86 \times 10^{-5}$  М тестируемых изделий могут быть приготовлены в физиологическом растворе с фосфатным буфером (ФРФБ), 50 мкл (на 250 г крысы) вводят интралюминальной инъекцией (ILI) с применением иглы 29 калибра. Затем брыжейку в месте инъекции отмечают перманентным маркером. По окончании исследования, область 3-5 мм, охватывающую отмеченный сегмент кишечника, выделяют и обрабатывают для микроскопической оценки. Эксперименты *in vivo* проводят в соответствии с U.K. Animals (Scientific Procedures) Act of 1986, the European Communities Council Directive of 1986 (86/609/EEC) и методиками этической

экспертизы University of Bath.

## **2. Оценка белков, взаимодействующих с Cholix носителем (т.е., TRIP)**

Для идентификации взаимодействующих партнеров Cholix (например, рецепторов, ферментов и т.д.) и установления везикулярных участков, где они взаимодействуют с Cholix полипептидами (например, остатками 1-266 Cholix последовательности или ее усеченной версии), проводят ряд анализов с соосаждением для идентификации потенциальных партнеров взаимодействия, после чего могут быть проведены *in silico* ассоциации с применением поверхностного плазмонного резонанса, *in vitro* исследований трансцитоза с применением поляризованных эпителиальных клеток кишечника человека Caco-2, в которых может быть достигнут генетический нокдаун определенных мишеней, и *in vivo* исследования трансцитоза, где элементы Cholix и специфические рецепторы могут быть колокализованы в установленных везикулярных структурах. Не будучи связанными какой-либо теорией, предполагают, что процесс трансцитоза может вовлекать элементы, которые обычно ограничены в определенных везикулярных элементах поляризованных эпителиальных клеток кишечника, но могут быть привлечены для того, чтобы быть «похищенными», например, полученными из Cholix носителями, для того, чтобы оставить позднюю эндосому и избежать лизосомного разложения после выделения из клетки в базолатеральную область (например, через механизмы апикальной рециркуляции, апикальный рецептор-опосредованный экзоцитоз и т.д.).

## **3. Измерение колокализации носителей с клеточными белками**

Колокализация носителя или комплекса носитель-полезная нагрузка, описанного в настоящем документе, с одним или несколькими клеточными белками может быть определена флуоресцентной микроскопией. Например, полученный из Cholix носитель может быть нанесен на апикальную мембрану поляризованных эпителиальных клеток (например, Caco-2) или на эпителиальную ткань кишечника. После рецептор-опосредованного эндоцитоза, обновление носителя в клетке может быть определено флуоресцентной микроскопией, например, с применением меченых антител против носителя Cholix или меченых красителем носителей или с применением антител против полезной нагрузки. Образцы или срезы тканей могут быть далее окрашены маркерами, специфическими для клеточных белков, таких как Rab7, Rab11, например, как описано в **ПРИМЕРЕ 7**. Разные методы анализа изображений затем могут применяться для определения относительного положения носителя в клеточном белке (см., например, **ПРИМЕР 6**).

### **ПРИМЕРЫ**

Следующие примеры просто иллюстрируют описание и не предназначены для ограничения описания каким-либо образом.

#### **ПРИМЕР 1**

##### **Получение полученных из Cholix конструкций доставки**

В этом примере описывается препарат конструкции доставки в виде одной аминокислотной последовательности, содержащей последовательность носителя Cholix,

последовательность спейсера и терапевтически полезную нагрузку.

Сначала ген конструкции доставки амплифицируют ПЦР, включая пары рестрикционных ферментов сайтов NdeI и EcoRI, PstI и PstI, AgeI и EcoRI или PstI и EcoRI на двух концах продуктов ПЦР. После расщепления рестриктазой, продукты ПЦР клонируют в подходящую плазмиду для клеточной экспрессии, которую расщепляют соответствующими парами рестриктаз. Полученная конструкция содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 147, и также помечена мотивом 6-His на N-конце белка для облегчения очистки. Конечные плазмиды подтверждают расщеплением рестриктазами и секвенированием ДНК.

Конструкции доставки экспрессируют следующим образом: E. coli BL21(DE3) pLysS компетентные клетки (Novagen, Madison, Wis.) трансформируют с применением стандартного способа теплового шока в присутствии подходящей плазмиды для создания клеток, экспрессирующих конструкцию доставки, выбранной на ампициллин-содержащей среде и выращенной в бульоне Лурия-Бертани (Difco; Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.) с антибиотиком, затем вызывают экспрессию белка добавлением 1 mM изопропил-D-тиогалактопиранозид (IPTG) при OD 0,6. Через два часа после индукции IPTG, клетки собирают центрифугированием при 5000 об./мин в течение 10 мин. Тельца включения выделяют после лизиса клеток, и белки солюбилизируют в буфере, содержащем 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM ЭДТК, 6 M гуанидина HCl и 65 mM дитиотреитола. Солюбилизованные конструкции доставки ренатурируют в присутствии 0,1 M Tris, pH=7,4, 500 mM L-аргинина, 0,9 mM GSSG, 2 mM ЭДТК. Ренатуритированный белок (SEQ ID NO: 147) очищают хроматографией Q sepharose Ion Exchange and Superdex 200 Gel Filtration (Amersham Biosciences, Inc., Sweden). Чистоту белков оценивают SDS-PAGE и аналитической ВЭЖХ (Agilent, Inc. Palo Alto, Calif.).

Конструкцию доставки оценивают для подтверждения правильного сворачивания в отношении прогнозируемого размера молекулы. После индукции, экспрессированный белок собирают из телец включения. Степень экспрессии конструкции доставки подтверждают вестерн-блоттингом и среднюю молекулярную массу сравнивают с расчетной массой.

Результаты демонстрируют стабильное и эффективное получение функциональной конструкции доставки с высоким выходом и чистотой.

## **ПРИМЕР 2**

### **In vitro модель оценки транспортировки через монослой эпителиальных клеток**

Этот пример демонстрирует in vitro модель, созданную для оценки транспортных свойств конструкций доставки, описанных в настоящем документе.

На **ФИГ. 1** схематически показана установка, содержащая апикальную камеру выше монослоя эпителиальных клеток и базальную камеру ниже такого монослоя эпителиальных клеток.

Для апикально-базолатеральной проницаемости, тестируемые изделия (например,

конструкции доставки, полезная нагрузка и т.д.) добавляют на апикальную (А) сторону, и количество проникновения определяют на базолатеральной (В) стороне. Для базолатерально-апикальной проницаемости, тестируемые изделия добавляют на базолатеральную (В) сторону и количество проникновения определяют на апикальной (А) стороне.

Данные выражают как проницаемость ( $P_{app}$ ) согласно следующему уравнению:  $P_{app} = (dQ/dt)/(C_0 \cdot A)$ .  $Q/dt$  является скоростью проникновения,  $C_0$  является исходной концентрации тестируемого изделия и  $A$  является площадью монослоя. Коэффициент эффлюксного транспорта ( $R_e$ ) может быть рассчитан согласно следующему уравнению:  $(R_e) = P_{app}(B-A)/P_{app}(A-B)$ .  $R_e > 2$  может означать потенциальный субстрат для Р-gr или других активных эффлюксных транспортеров.

Клетки SMI-100 или Caco-2 могут применяться для оценки транцитозной функции носителя или конструкции доставки *in vitro*.

Для клеток Caco-2 проводят анализ ELISA для оценки способности носителя или конструкции доставки двигаться через монослой клеток Caco-2 через транцитоз. Клетки Caco-2 (ATCC HTB-37™) выдерживают в 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в полной среде: среде Игла, модифицированной по Дульбекко F12 (DMEM F12) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 2,5 мМ глутамина, 100 Ед. пенициллина/мл и 100 мкг стрептомицина/мл (Gibco BRL, Grand Island, N.Y.). Клетки каждые 2-3 дня подпитывают этой средой (обозначенной как полная среда) и пересеивают каждые 5-7 дней. Для анализов, клетки высевают в 24- или 96-луночные планшеты и выращивают до конфлюэнтности.

Клетки Caco-2 выращивают в виде конфлюэнтных слоев на покрытых коллагеном поликарбонатных мембранных подложках трансвел с размером пор 0,4 мкм (Corning-Costar, Cambridge, MA) и используют 18-25 дней после достижения транс-эпителиального электрического сопротивления (TER)  $> 250 \Omega \cdot \text{cm}^2$  по данным вольтметра chopstick Millicell-ERS® (Millipore). Апикально-базолатеральную (А→В) транспортировку носителя или конструкции доставки через этот монослой определяют через измерение количества транспортированного белка в определенные моменты времени (например, 15, 30 и 45 минут) после, например, 4,7 нМ, 23,6 нМ и 236 нМ апикального нанесения конструкции доставки при 37°C. Измерения TER и степень 10 кДа флуоресцентного декстрана (измеренная с применением ВЭЖХ протокола с исключением по размеру) применяют для подтверждения барьерных свойств монослоя во время исследования. Степень транспортировки конструкции доставки определяют титрованием собранной среды в клеточном анализе цитотоксичности. Транспортированные конструкции доставки измеряют ферментным иммуносорбентным анализом (ELISA) с применением антитела (например, антитела против носителя или против полезной нагрузки, такого как анти-IL-22 антитело) для захвата и определения.

Конфлюэнтные слои тканей тонкого кишечника человека (SMI-100, MatTek Corporation; Ashland, MA, USA), сформированные на вставках для культивирования

клеток, стабилизируют в течение 24 ч при 37°C перед применением. Только вставки, имеющие транс-эпителиальное электрическое сопротивление (TEER)  $>400 \text{ } \Omega \cdot \text{см}^2$  считаются имеющими достаточную целостность монослоя для применения в исследованиях. Вторичное подтверждение целостности монослоя проводят через оценку подавления 70 кД транспорта декстрана. Камеры промывают один раз буфером транспортировки (ФРФБ). Тестируемые молекулы (например, конструкции доставки, полезные нагрузки и т.д.) готовят в концентрации 20 мкг/мл наносят на апикальную поверхность вставок в объемах 100 мкл. Базолатеральные объемы 500 мкл ФРФБ меняют в каждый момент времени для исследования транспортировки. Каждые условия эксперимента повторяют трижды.

### **ПРИМЕР 3**

#### **Носитель-опосредованная транспортировка IL-22 через поляризованные эпителиальные клетки кишечника**

Этот пример демонстрирует, что носитель SEQ ID NO: 134 может транспортировать IL-22 полезную нагрузку (SEQ ID NO: 142) через поляризованные эпителиальные клетки кишечника *in vitro*. Этот пример также демонстрирует, что носитель с SEQ ID NO: 134 может транспортировать биологически активную IL-22 полезную нагрузку через поляризованные эпителиальные клетки кишечника и в *lamina propria in vivo*.

Транспортировку конструкции доставки (SEQ ID NO: 147) через монослои клеток Caco-2 и ткань эпителия тонкого кишечника (также называемую в настоящем документе SMI-100) тестируют нанесением конструкции доставки на апикальную мембрану эпителиальных клеток, согласно **ПРИМЕРУ 2** и как показано на **ФИГ. 1** для апикально- (А) базальной (В) транспортировки. Эксперименты проводят трижды, и образцы из базолатеральной камеры собирают через 15, 30 и 45 минут после апикального нанесения для определения количества транспортированного белка. Количество транцитозированного белка измеряют с применением анализов ELISA.

Данные на **ФИГ. 2** и **ФИГ. 3** показывают, что носитель с SEQ ID NO: 134, будучи связанным с IL-22, транспортирует IL-22 полезную нагрузку (SEQ ID NO: 142) через монослои и Caco-2 (**ФИГ. 2**) и SMI-100 (**ФИГ. 3**) времязависимым образом, и что конструкция доставки обеспечивает примерно 2-3-кратное пересечение IL-22 эпителиальных клеток по сравнению с IL-22 (SEQ ID NO: 143), который не связан с носителем.

Для *in vivo* экспериментов, транцитоз тестируют с применением самцов крыс Wistar. Самцов крыс Wistar размещают по 3-5 в клетке с 12/12 ч циклом свет/темнота, и они имеют вес 225-275 г (приблизительно возраст 6-8 недель) при поступлении на исследование. Эксперименты могут проводиться во время светлой фазы с применением протокола без восстановления, в котором применяют непрерывную анестезию изофлураном. Может быть сделан 4-5 см разрез в середине брюшины, который обнажает средние области тощей кишки. Исходные растворы  $3,86 \times 10^{-5} \text{ М}$  тестируемых конструкций

доставки могут быть приготовлены в физиологическом растворе с фосфатным буфером (ФРФБ), 50 мкл (на 250 г крысы) вводят интралюминальной инъекцией (ILI) с применением иглы 29 калибра. Затем брыжейку в месте инъекции отмечают перманентным маркером. По окончании исследования, область 3-5 мм, охватывающую отмеченный сегмент кишечника, выделяют и обрабатывают для микроскопической оценки.

Результаты транцитозной активности конструкции доставки с SEQ ID NO: 147 показаны на **ФИГ. 4**, демонстрируя, что значительные количества IL-22 полезной нагрузки (SEQ ID NO: 142) пересекают интактный и поляризованный эпителий кишечника *in vivo*, если они представлены в виде конструкции доставки, которая включает носитель, полученный из Cholix. Это микроскопическое изображение показывает транспортировку IL-22 полезной нагрузки (SEQ ID NO: 142) с апикального сайта эпителия кишечника (обозначенного белой стрелкой #1) в базальный сайт эпителиальных клеток и в lamina propria (3) (сокращено как «l.p.») после люминального применения конструкции доставки с SEQ ID NO: 147 в тощую кишку крыс Wistar. Изображение также показывает, что IL-22 взаимодействует и связывается в значительной степени с IL-22 рецепторами, расположенными в lamina propria и на внешней базальной мембране поляризованного эпителия (обозначенной белыми стрелками #2), демонстрируя, что IL-22 полезная нагрузка является биологически активной после транспортировки. Локализация IL-22 показана белыми стрелками, и зеленая флуоресценция, синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI.

Кроме того, **ФИГ. 5** показывает, что конструкции доставки, состоящие из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 147 и SEQ ID NO: 148, определяются на базолатеральной области после транцитоза. Анализ вестерн-блоттингом подтверждает, что обе конструкции доставки были неизменными.

Последующие эксперименты также показывают, что транцитоз конструкций доставки, содержащих полученный из Cholix носитель, может зависеть от присутствия обоих GRP75 (**ФИГ. 6**) и специфического к базальной мембране гепарансульфатпротеогликанового корового белка (HSPG) (**ФИГ. 7**) (также называемого в настоящем документе «перлекан»). На **ФИГ. 6** и **ФИГ. 7** показано, что функция транцитоза была значительно снижена в клетках Caco-2, не имеющих GRP75 (**ФИГ. 6**, т.е., клетках Caco-2<sup>GRP75<sup>-</sup></sup>) и HSPG (**ФИГ. 7**, т.е., клетках Caco-2<sup>HSPG<sup>-</sup></sup>), соответственно. Это показывает, что оба, GRP75 и HSPG, являются TRIP, с которыми может взаимодействовать полученный из Cholix носитель во время апикально-базального транцитоза.

Вместе, эти данные демонстрируют, что полученные из Cholix носители, описанные в настоящем документе, эффективно (например, по меньшей мере, 5%, 10%, 20%, 25% или 50% продукта, нанесенного на апикальную поверхность) транспортирует терапевтическую полезную нагрузку, такую как IL-22, через поляризованные слои эпителия, со значительно повышенными скоростями транспортировки и общей

эффективностью транспортировки (например, по меньшей мере, примерно в 2-3 раза больше) по сравнению с только полезной нагрузкой.

#### **ПРИМЕР 4**

##### **Исследования *In vivo* транспортировки в поляризованные эпителиальные клетки с применением полученных из Cholix носителей**

Этот пример демонстрирует способность усеченных полученных из Cholix носителей транспортировать полезную нагрузку в поляризованные эпителиальные клетки.

На **ФИГ. 8** изображено определение флуоресцентным микроскопом конструкции доставки (SEQ ID NO: 154) в апикальных участках (обозначенных белой стрелкой #2) в эпителиальных клетках через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции с применением модели интралюминальной инъекции крысе (белая стрелка #1 показывает апикальную поверхность, белая стрелка #3 показывает базальную мембрану и белая стрелка #4 показывает lamina propria). Данные демонстрируют, что носитель, полученный из Cholix<sup>41-187</sup> (например, SEQ ID NO: 137) способен транспортировать полезную нагрузку в апикальные участки эпителиальных клеток, но не через эпителиальные клетки. Красная флуоресценция показывает локализацию носителя Cholix, зеленая флуоресценция показывает локализацию hGH (SEQ ID NO: 146) и синяя флуоресценция показывает Окрашивание DAPI.

На **ФИГ. 9** изображено определение флуоресцентным микроскопом конструкции доставки (SEQ ID NO: 156) в апикальные участки (обозначенные белой стрелкой #2) эпителиальных клеток через 15 мин после интралюминальной инъекции с применением модели интралюминальной инъекции крысе (белая стрелка #1 показывает апикальную поверхность, белая стрелка #3 показывает базальную мембрану и белая стрелка #4 показывает lamina propria). Данные демонстрируют, что носитель, полученный из Cholix<sup>40-205</sup> (SEQ ID NO: 138), способен транспортировать полезную нагрузку (например, hGH) в апикальные участки эпителиальных клеток, но не через эпителиальные клетки в lamina propria. Эти данные позволяют предположить, что остатки 1-40 из SEQ ID NO: 1 могут играть роль в транцитозе, но могут не потребоваться для эндоцитоза носителя Cholix. Красная флуоресценция показывает локализацию носителя Cholix, зеленая флуоресценция показывает локализацию hGH (SEQ ID NO: 146) и синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI.

На **ФИГ. 10A** изображено определение флуоресцентным микроскопом конструкции доставки (SEQ ID NO: 153) в апикальных участках внутри эпителиальных клеток через 5 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки в тощую кишку крысы. На **Фиг. 10A-10C**, красная флуоресценция показывает локализацию носителя Cholix, зеленая флуоресценция показывает локализацию hGH (SEQ ID NO: 146) и синяя флуоресценция означает окрашивание DAPI; белая стрелка #1 показывает апикальные участки и белая стрелка #2 показывает надъядерные участки.

На **ФИГ. 10B** изображено определение флуоресцентным микроскопом конструкции доставки (SEQ ID NO: 153) через 10 мин после интралюминальной

инъекции. Данные показывают, что носитель транспортирует hGH полезную нагрузку из апикальных участков в надъядерные и базальные участки с течением времени.

На **ФИГ. 10С** изображено определение флуоресцентным микроскопом конструкции доставки (SEQ ID NO: 153) через 15 мин после интравенузной инъекции. Данные показывают, что носитель транспортирует полезную нагрузку из апикальных участков в надъядерные и базальные участки с течением времени.

Эти данные показывают, что полученные из Cholix носители с С-концевыми усечениями в положении 187 или 205 из SEQ ID NO: 1 и N-концевым усечением в положениях 40 или 41 из SEQ ID NO: 1, соответственно, может транспортировать полезную нагрузку в поляризованные эпителиальные клетки. Эти данные также позволяют предположить, что N-концевые 39 аминокислоты носителя Cholix могут играть роль в транцитозе, но недостаточны для транспортировки в базолатеральные внутриклеточные везикулы, и что 1-187 не достаточны для транцитоза, но достаточны для транспортировки полезной нагрузки в эпителиальные клетки (например, в надъядерные и базальные участки).

#### **ПРИМЕР 5**

##### **In vitro функция транцитоза полученных из Cholix носителей**

Этот пример демонстрирует in vitro функцию апикально-базального транцитоза разных полученных из Cholix носителей, которые связаны с гормоном роста человека через спейсер с применением рекомбинантной экспрессии, как описано выше в **ПРИМЕРЕ 1**.

Следующие носители оценивают по их способности пересекать поляризованные монослои эпителиальных клеток тонкого кишечника человека (**ТАБЛИЦА 10**):

**ТАБЛИЦА 10 - Тестируемые конструкции доставки**

| <b>SEQ ID NO</b> | <b>Обозначение Cholix (относительно SEQ ID NO: 1)</b>            |
|------------------|------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 151   | M+Cholix <sup>1-134</sup> -(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> -hGH  |
| SEQ ID NO: 152   | M+Cholix <sup>1-151</sup> -(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> -hGH  |
| SEQ ID NO: 153   | M+Cholix <sup>1-187</sup> -(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> -hGH  |
| SEQ ID NO: 154   | M+Chx <sup>41-187</sup> -(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> -hGH    |
| SEQ ID NO: 155   | M+Cholix <sup>1-206</sup> -(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> -hGH  |
| SEQ ID NO: 156   | M+Cholix <sup>40-205</sup> -(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> -hGH |
| SEQ ID NO: 157   | M+Cholix <sup>1-245</sup> -(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> -hGH  |
| SEQ ID NO: 158   | M+Cholix <sup>1-251</sup> -(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> -hGH  |
| SEQ ID NO: 159   | M+Cholix <sup>1-266</sup> -(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> -hGH  |

На **Фиг. 11А-11В** изображена апикально-базальная транспортировка гормона роста человека (hGH, SEQ ID NO: 190) отдельно, по сравнению с применением hGH, связанного с носителями. Длины носителей показаны С-концевым усечением относительно эталонной SEQ ID NO: 1 (т.е., «134» показывает носитель, имеющий остатки 1-134 из SEQ

ID NO: 1). Все носители дополнительно включают N-концевой метионин. Вестерн-блоттинг hGH качественно оценивает способность этих белков к апикально-базальной транспортировке через поляризованные монослои первичных эпителиальных клеток тонкого кишечника человека *in vitro* через 2 ч. Количества нанесенных апикально продуктов эквивалентно, на молярной основе, содержанию hGH, и базальные коллекции концентрируют ~10-кратно до анализа.

На **ФИГ. 11А** показано сравнение апикально-базальной транспортировки hGH (SEQ ID NO: 190) отдельно по сравнению с той, которую измеряют для конструкций доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 151 - SEQ ID NO: 154 и SEQ ID NO: 159 с С-концевыми усечениями в положениях 134, 151, 187, 41-187 и 266, соответственно, SEQ ID NO: 1. Данные показывают, что носитель Cholix с С-концевыми усечениями в положениях 134, 151, 187 SEQ ID NO: 1 или N-концевым усечением на 41 и С-концевым усечением на 187 SEQ ID NO: 1 демонстрирует значительно более низкую апикально-базальную транспортировку соединенного hGH по сравнению с конструкцией с носителем Cholix (SEQ ID NO: 159) с С-концевым усечением на 266 из SEQ ID NO: 1.

На **ФИГ. 11В** показано, что конструкции доставки с SEQ ID NO: 155 и SEQ ID NO: 157 - SEQ ID NO: 159, включая носители Cholix с С-концевыми усечениями в положениях 206 (SEQ ID NO: 131), 245 (SEQ ID NO: 132), 251 (SEQ ID NO: 133) и 266 (SEQ ID NO: 134), соответственно, из SEQ ID NO: 1 демонстрируют эффективную апикально-базальную транспортировку соединенных hGH (SEQ ID NO: 146). В то время как носители с Cholix С-концевыми усечениями в положениях 245 и 251 демонстрируют апикально-базальную транспортировку hGH (SEQ ID NO: 146) сравнимую с таковой для носителя с С-концевым усечением в положении 266, носитель Cholix С-концевым усечением в положении 206 показал значительное улучшение апикально-базальной транспортировки hGH по сравнению с носителями с С-концевыми усечениями в положениях 245, 251 и 266.

Эти результаты позволяют предположить, что остатки 1-266 Cholix являются достаточными для апикально-базальной транспортировки, и что он может функционировать как транцитозный элемент для доставки разных гетерологичных полезных нагрузок через эпителиальные клетки. Дополнительно, было продемонстрировано, что элементы в первых 206 аминокислотных остатках последовательности, составляющей Cholix полипептид, указанной в SEQ ID NO: 1 являются достаточными для функции транцитоза, и поэтому могут применяться для эффективного (например, по меньшей мере, 5%, 10%, 20%, 25% или 50% продукта, нанесенного на апикальную поверхность) перемещения молекул гетерологичной полезной нагрузки, такой как терапевтическая и/или диагностическая полезная нагрузка через слой эпителиальных клеток (например, эпителий кишечника), тем самым позволяя пероральное введение полезной нагрузки, которая в других случаях может вводиться только парентеральными путями введения (например, внутривенно или подкожно).

#### **ПРИМЕР 6**

### **In vivo функция транцитоза полученных из Cholix носителей**

Этот пример демонстрирует in vivo функцию апикально-базального транцитоза разных полученных из Cholix носителей, которые связаны с гормоном роста человека через спейсер с применением рекомбинантной экспрессии, как описано выше в **ПРИМЕРЕ 1**.

Выбранные носители Cholix, показанные в **ТАБЛИЦЕ 10** из **ПРИМЕРА 5** проверяют на способность к транцитозу in vivo после ILI в тощую кишку крысы.

Данные, полученные в этих экспериментах, показывают степень апикально-базальной транспортировки через поляризованные эпителиальные клетки кишечника в тощей кишке крысы для шести конструкций доставки, каждая из которых включает разные носители Cholix. Локализация носителя Cholix (красная флуоресценция) и hGH (зеленая флуоресценция) продемонстрирована (**Фиг. 12А-12F**) иммунофлуоресцентной микроскопией с применением поликлональных анти-Cholix и моноклональных анти-hGH антител, соответственно. Белые стрелки показывают апикальную мембрану, «l-p» относится к lamina propria, «GC» относится к бокаловидным клеткам и полые стрелки показывают конструкции доставки, присутствующие в lamina propria.

На **ФИГ. 12А** показана степень апикально-базальной транспортировки через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 151), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 140), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146). На **ФИГ. 12А** показано, что носитель не позволяет конструкции доставки проникать в эпителиальные клетки, позволяя предположить фрагмент функциональной последовательности, имеющий аминокислотные остатки 134-151 из SEQ ID NO: 1 может играть роль в эндоцитозе в поляризованные эпителиальные клетки (наоборот, на **ФИГ. 12В** показано, что носитель с SEQ ID NO: 139 позволяет клеточный вход соответствующей конструкции доставки через эндоцитоз).

На **ФИГ. 12В** показана степень апикально-базальной транспортировки через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 152), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 139), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146), продемонстрированная иммунофлуоресцентной микроскопией. На **ФИГ. 12В** показано, что эта конструкция не проникает в эпителиальные клетки (в отличие от конструкции с SEQ ID NO: 151, описанной на **ФИГ. 12А**), но в основном остается в апикальной и, до некоторой степени, в базальных везикулярных пулах, но не проникает в lamina propria, тем самым позволяя доставку полезной нагрузки в апикальные и базальные участки эпителиальной клетки.

На **ФИГ. 12С** показана степень апикально-базальной транспортировки через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 153), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 136), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) продемонстрированная иммунофлуоресцентной микроскопией. На **ФИГ. 12С** показано, что эта конструкция проникает в эпителиальные клетки, достигает апикальных и базальных участков, а также достигает надъядерной области клетки, все еще оставаясь

внутри эпителиальной клетки, позволяя предположить, что фрагмент последовательности, состоящий из аминокислотных остатков 152-187 из SEQ ID NO: 1, может позволять доступ и доставку в надъядерные области, а также позволяет локализацию в базальный участках.

На **ФИГ. 12D** показана степень апикально-базальной транспортировки через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 154), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 137), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) продемонстрированная иммунофлуоресцентной микроскопией. На **ФИГ. 12D** показано, что эта конструкция проникает в эпителиальные клетки, но остается в апикальных участках и, по-видимому, не достигает базальных или надъядерных участков.

На **ФИГ. 12E** показана степень апикально-базальной транспортировки через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 155), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 131), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) продемонстрированная иммунофлуоресцентной микроскопией. На **ФИГ. 12E** показано, что эта конструкция завершает процесс транцитоза, на что указывает достижение конструкцией доставки lamina propria (см. полную стрелку), позволяя предположить, что фрагмент последовательности, состоящий из аминокислотных остатков 188-206 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, может позволить носителю (и конструкциям, содержащим такие носители) участвовать в процессах базальной рециркуляции, которые позволяют выделять носитель или соответствующую конструкцию из эпителиальной клетки в базолатеральную область (например, lamina propria).

На **ФИГ. 12F** показана транспортировка через эпителиальные монослои тощей кишки крысы in vivo через 15 мин после интралюминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146), продемонстрированная иммунофлуоресцентной микроскопией. На **ФИГ. 12F** показано, что конструкция завершает процесс транцитоза, на что указывает достижение конструкцией доставки lamina propria (см. полную стрелку).

Таким образом, эти результаты согласуются с данными, полученными в экспериментах in vitro транцитоза, описанных в **ПРИМЕРЕ 5** и показывают, что носители с С-концевым усечением на любом из остатков 206-266 Cholix последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, могут быстро (например, по меньшей мере,  $10^{-6}$  см/сек,  $10^{-5}$  см/сек) и эффективно (например, по меньшей мере, 5%, 10%, 20%, 25% или 50% продукта, нанесенного на апикальную поверхность) транспортировать молекулы полезной нагрузки (например, терапевтические белки) через эпителиальные клетки (например, через поляризованные эпителиальные клетки кишечника субъекта). Кроме того, эти результаты показывают, что носители с С-концевым усечением на любом из остатков 151-187 Cholix последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, и/или N-концевым усечением на любом из остатков 1-40 из SEQ ID NO: 1 могут применяться для доставки разных гетерологичных полезных нагрузок в эпителиальные клетки.

На основе этих данных были идентифицированы следующие функциональные фрагменты Cholix последовательности для носителей, полученных из Cholix полипептида с SEQ ID NO: 1.

**ТАБЛИЦА 11 - Типовые фрагменты Cholix последовательности и их функция в Cholix полипептиде с SEQ ID NO: 1**

| SEQ ID NO      | Последовательность                                                      | Функция                             |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| SEQ ID NO: 165 | <sup>135</sup> DQQRNIIIEVPKLYSIDL <sub>151</sub>                        | Эндоцитоз                           |
| SEQ ID NO: 166 | <sup>1</sup> VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSK<br>LSIPSDVVLDEG <sub>40</sub> | Апикально-базальная<br>транслокация |
| SEQ ID NO: 167 | <sup>151</sup> LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN<br>IAISWPSVSYKA <sub>187</sub> | Надъядерная<br>локализация          |
| SEQ ID NO: 168 | <sup>188</sup> AQKEGSRHKRWANWHTGLA <sub>206</sub>                       | Базальное выделение                 |

#### **ПРИМЕР 7**

##### **Полученные из Cholix носители колокализуются с Rab11a**

Этот пример демонстрирует, что полученные из Cholix носители колокализуются с Ras-связанным белком Rab11a (Rab11a или Rab11). Колокализация носителя с Rab11a может происходить на апикальной стороне или базальной стороне эпителиальной клетки. Было показано, что колокализации носителя с Rab11a на апикальной стороне эпителиальной клетки может направлять носитель на апикальные рециркулирующие эндосомы и/или в просвет кишечника. Колокализация носителя с Rab11a на базальной стороне эпителиальной клетки указывает на то, что носитель может использовать базальные механизмы рециркуляции для его высвобождения из базальной клеточной мембраны в базолатеральные области (например, lamina propria).

Колокализацию четырех конструкций доставки с Rab11a тестируют с применением интралюминальной инъекции (ILI) 50 мкл  $3,86 \times 10^{-5}$  М растворов в ФРФБ четырех разных конструкций доставки. Такие конструкции доставки состоят из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 152-154 и SEQ ID NO: 159.

На **ФИГ. 13А**, **ФИГ. 13В** и **ФИГ. 13С** показано, что конструкции доставки с SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 153, соответственно, колокализуются с Rab11a на апикальной стороне эпителиальных клеток. Данные также показывают, что конструкции с SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 154 не значительно локализуются на базальной стороне, но остаются в основном на апикальной стороне. Конструкция с SEQ ID NO: 153 локализуется на обеих, апикальной и базальной стороне, однако колокализуется только с Rab11a на апикальной стороне и не на базальной стороне (см. также суб-изображения 3a и 3b с **ФИГ. 13С**, показывающие повышенную локализацию в апикальном сайте по сравнению с базальным сайтом). Вместе, эти результаты позволяют предположить, что носители, которые не способны к апикально-базальному транцитозу, могут проникать в апикальную систему рециркулирования в эпителиальных клетках, что показано колокализацией с Rab11a на апикальном сайте. Измерения проводят через 15

мин после интралюминальной инъекции. Зеленая флуоресценция показывает локализацию hGH, красная флуоресценция показывает локализацию Rab11a (или Rab11) и синяя флуоресценция означает окрашивание DAPI (описание эксперимента идентично для **ФИГ. 13D**).

На **ФИГ. 13D** показано, что конструкция доставки с SEQ ID NO: 159 колокализуется с Rab11a на базальной стороне, но не значительно на апикальной стороне поляризованных эпителиальных клеток. Это позволяет предположить, что эти носители, способные к транцитозу, могут применять базальную систему рециркулирования для их выделения из эпителиальной клетки в lamina propria (см. также суб-изображения 4a и 4b с **ФИГ. 13D**, показывающие повышенную локализацию на апикальном сайте по сравнению с базальным сайтом).

Эти данные демонстрируют, что функциональный фрагмент Cholix, который позволяет базальную колокализацию с Rab11a для доступа к базальной системе рециркулирования, может находиться, по меньшей мере, в аминокислотных остатках 187-266 из SEQ ID NO: 1.

Более того, эти данные позволяют рационально сконструировать носители, которые могут транспортировать полезные нагрузки в разные локации внутри эпителиальной клетки или через такую эпителиальную клетку. Например, полученные из Cholix носители, содержащие или состоящие из аминокислотных остатков 1-151, 1-187, 41-187, 41-187, 40-205 или 41-205 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, могут применяться для доставки полезной нагрузки внутрь эпителия, тогда как полученные из Cholix носители, содержащие аминокислотные остатки 1-266 из SEQ ID NO: 1, могут применяться для транспортировки полезной нагрузки через такой барьер из эпителиальных клеток и в lamina propria.

#### **ПРИМЕР 8**

##### **Специфические маркерные белки участков клеток для оценки типа и локации партнеров взаимодействия Cholix носителя (TRIP)**

Этот пример описывает специфические маркерные белки участков эпителиальных клеток, которые используют для определения белков, которые взаимодействуют с полученными из Cholix носителями во время эндоцитоза и/или транцитоза.

В следующей **ТАБЛИЦЕ 12** ниже показаны типовые специфические маркерные белки участков клеток, применяемые в настоящем документе. Например, полученные из Cholix конструкции доставки, содержащие IL-10 в качестве гетерологичной полезной нагрузки, наблюдают во время экспериментов с применением либо моноклонального антитела (mAb) против IL-10 и/или поликлонального антитела (pAb) против носителя Cholix (например, такого, который содержит остатки 1-266 или 1-386 из SEQ ID NO: 1).

**ТАБЛИЦА 12- Специфические маркерные белки участков клеток**

| Мишень | pAb/mAb | Реакцион<br>ная | Хозяин | Разведения<br>для ИНС | Примечан<br>ие | Хране<br>ние | Кат.№ |
|--------|---------|-----------------|--------|-----------------------|----------------|--------------|-------|
|--------|---------|-----------------|--------|-----------------------|----------------|--------------|-------|

|                      |          | <b>способно<br/>сть вида</b>                     |               | <b>(P)</b> |                                 |       |                   |
|----------------------|----------|--------------------------------------------------|---------------|------------|---------------------------------|-------|-------------------|
| носитель<br>Cholix   | pAb      |                                                  | Кролик        | 1/500      | Цельная<br>антисыво<br>ротка    | -20°C | -                 |
| IL-10                | mAb; pAb | Человек                                          | Мышь,<br>Коза | 1/25       |                                 | -20°C | -                 |
| EEA1                 | pAb      | Мышь,<br>крыса,<br>человек                       | Кролик        | 1/200      | Ранняя<br>эндосома              | -20°C | Ab2900            |
| Rab7                 | mAb      | Мышь,<br>крыса,<br>человек                       | Кролик        | 1/100      | Поздняя<br>эндосома             | -20°C | Ab12677<br>12     |
| Rab11a               | pAb      | Мышь,<br>крыса,<br>человек,<br>кролик,<br>собака | Кролик        | 1/500      | Рециркули<br>рующая<br>эндосома | -20°C | Fisher71-<br>5300 |
| LAMP1                | pAb      | Мышь,<br>крыса,<br>человек                       | Кролик        | 1/500      | Маркер<br>лизосомы              | -20°C | Ab24170           |
| GM130                | pAb      | Мышь,<br>крыса,<br>человек                       | Кролик        | 1/500      | Цис-<br>Гольджи                 | -20°C | -                 |
| Гиантин              | mAb      | Крыса,<br>человек                                | Мышь          | 1/20       | Гольджи                         | -20°C | Ab37266           |
| 58K белок<br>Гольджи | mAb      | Мышь,<br>крыса,<br>человек                       | Мышь          | 1/100      | Гольджи                         | -20°C | Nb600-<br>4512    |
| TGN38                | mAb      | Мышь,<br>крыса,<br>человек                       | Мышь          | 1/1000     | Транс-<br>Гольджи               | -20°C | Nb300-<br>575     |
| Кальнекси<br>н       | pAb      | Мышь,<br>крыса,                                  | Кролик        | 1/500      | Эндоплазм<br>атический          | -20°C | Ab22595           |

|         |     |                            |      |       |                                             |       |        |
|---------|-----|----------------------------|------|-------|---------------------------------------------|-------|--------|
|         |     | человек                    |      |       | ретикулум                                   |       |        |
| Клатрин | mAb | Мышь,<br>крыса,<br>человек | Мышь | 1/500 | Клатрин-<br>опосредова<br>нный<br>эндоцитоз | -20°C | Ab2731 |

### ПРИМЕР 9

**Исследования транцитоза *in vitro* выявляют партнеры взаимодействия рецепторов транспортировки (TRIP) для полученных из Cholix носителей**

Этот пример демонстрирует определение TRIP, с которыми полученные из Cholix носители взаимодействуют во время транцитоза через поляризованную эпителиальную клетку. Этот пример дополнительно демонстрирует критическое взаимодействие партнеров, которые могут играть роль в транцитозе Cholix.

На **Фиг. 14A-14D** показано действие нокаута K8, HSPG (перлекан) и GRP75, соответственно, на функцию транцитоза конструкции доставки с SEQ ID NO: 150, которая включает полученный из Cholix носитель с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 134, связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) через спейсер с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 177. Стабильные клеточные линии клеток Caco-2, без экспрессии специфических кандидатных белков K8 (Caco-2<sup>K8</sup>), HSPG (Caco-2<sup>HSPG</sup>) и GRP75 (Caco-2<sup>GRP75</sup>) применяют в качестве монослоев *in vitro* для подтверждения их вовлечения в транцитоз носителя (например, носителей Cholix) через активный и селективный механизмы эндогенной транспортировки.

Клетки Caco-2, исходные или с нокаутом K8, HSPG (перлекан) или GRP74 (KO) стабильные клетки высевает в количестве  $1,5 \times 10^5$  клеток/мл на каждый трансвел. На 18 день 100 мкл ФРФБ, содержащего конструкцию доставки (SEQ ID NO: 150) в количестве 20 мкг/мл или равное молярное количество контрольного hGH (SEQ ID NO: 190) добавляют на апикальную сторону, и 500 мкл ФРФБ в базальную камеру. Количество белков в базальном растворе через 1 ч при 37°C анализируют вестерн-блоттингом. Блот испытывают анти-hGH mAb.

На **ФИГ. 14А** показано, что K8 нокаут значительно не снижает функцию транцитоза конструкции доставки (SEQ ID NO: 150).

На **ФИГ. 14В** показано, что нокаут HSPG (перлекан) значительно снижает функцию транцитоза конструкции доставки (SEQ ID NO: 150).

На **ФИГ. 14С** показано, что нокаут GRP75 значительно снижает функцию транцитоза конструкции доставки (SEQ ID NO: 150).

Затем оценивают pH-зависимость взаимодействия между белком Cholix и GRP75. На **ФИГ. 15А** показаны взаимодействия связывания Biacore™ (например, поверхностный плазмонный резонанс), применяемые для проверки такой pH-зависимости взаимодействий носителя Cholix-GRP75. Для этого, биотин сопрягают с С-концом полноразмерного белка Cholix, последовательность которого указана в SEQ ID NO: 1, и затем присоединяют к

поверхности (например, поверхности чипа, пластикового 96-луночного планшета и т.д.) с применением биоконъюгирования биотин-стрептавидин, и инкубируют с очищенным GRP75 белком в буферных растворах при pH 5,5, 6,5 и 7,5, соответственно. Наивысшая аффинность связывания для этого взаимодействия была измерена при pH 6,5. На **ФИГ. 15A** показано, что аффинность Cholix белка для GPR75 в примерно 20-25-раз выше при pH 6,5 по сравнению с pH 7,5 или pH 5,5.

Более того, на **ФИГ. 15B** показана pH-зависимость взаимодействия полученного из Cholix носителя (SEQ ID NO: 189) с апикальным рецептором (например, TMEM132), рецепторами лизосомного избегания (например, GRP75), рецептором миграции (например, ERGIC-53) и базальным рецептором (например, перлеканом). Такая pH зависимость рецепторного взаимодействия показывает, что полученный из Cholix носитель может последовательно и зависимо от его локации взаимодействовать с определенными рецепторами. Например, эти данные показывают, что полученный из Cholix носитель имеет значительно более высокую аффинность к эндоцитозу и ранним рецепторам миграции, таким как апикальный входной рецептор и рецептор лизосомного избегания при pH 7,5. Как только pH падает до примерно 5,5, аффинность носителя Cholix для таких ранних рецепторов миграции снижается, в то время как его аффинность для апикально-базального рецептора миграции ERGIC-53 и белка базальной секреции перлекана значительно повышается при этом pH, позволяя «перебросить» носитель Cholix на рецепторы миграции и базального выделения во время процесса везикулярного транцитоза.

На **ФИГ. 16** показаны значимые и последовательные взаимодействия связывания Biacore™ полноразмерного белка Cholix, последовательность которого указана в SEQ ID NO: 1, с перлеканом и GRP75, демонстрируя, что Cholix взаимодействует с обоими белками. Для эксперимента по связыванию, 20 мкл белка cholix-биотин при 50 нМ фиксируют на поверхности чипа Biacore SA. 60 мкл белка перлекан (HSPG) человека при 200 нМ вводят через поверхность чипа со скоростью 30 мкл/мин. Затем через поверхность чипа вводят 60 мкл белка GRP75 человека при 100 нМ со скоростью 30 мкл/мин. Поверхность чипа регенерируют инъекцией 50 мкл 10 mM глицина при pH 1,5 для удаления всех связанных белков.

На **ФИГ. 17** показаны значимые и последовательные взаимодействия связывания Biacore™ полноразмерного белка Cholix, последовательность которого указана в SEQ ID NO: 1, с GRP75, перлеканом и TMEM132A, демонстрируя, что Cholix взаимодействует со всеми тремя белками. Для эксперимента по связыванию, 20 мкл белка cholix-биотин при 50 нМ фиксируют на поверхности чипа Biacore SA. 30 мкл белка GRP75 при 100 нМ вводят через поверхность чипа со скоростью 30 мкл/мин. 60 мкл белка перлекана человека при 200 нМ затем вводят через поверхность чипа со скоростью 30 мкл/мин, затем 30 мкл TMEM132A белка человека при 200 нМ. Поверхность чипа регенерируют инъекцией 50 мкл 10 mM глицина при pH 1,5 для удаления всех связанных белков.

Эти данные показывают, что GRP75 и перлекан могут играть роль в функции

транскитоza полученных из Cholix носителей, и что Cholix белки связывают GRP75, перлекан, TМЕМ132 белки.

#### **ПРИМЕР 10**

**Полученные из Cholix носители, которые транскитозируют через поляризованные эпителиальные клетки, могут не колокализироваться с LAMP1<sup>+</sup> или Rab7<sup>+</sup> и могут быть направлены от лизосом во время апиально-базального транскитоza**

Этот пример демонстрирует, что носители, полученные из полипептида Cholix, направляются от лизосом во время транскитоza и, таким образом, не взаимодействуют с путем рециклинга лизосом, что позволяет носителю транскитозировать неизменным и полностью функциональным через поляризованные эпителиальные клетки.

На **ФИГ. 18А-18D** показана судьба гормона роста человека (hGH, SEQ ID NO: 190), который вводят интравенозной инъекцией (IVI, люминальная поверхность обозначена белой стрелкой на **ФИГ. 18А - ФИГ. 18F**) в тощую кишку крысы *in vivo*, которую оценивают сначала как потенциальный контрольный эксперимент, ожидая транспортировку hGH к лизосомам после поглощения клеткой.

На **ФИГ. 18А** показано, что локализация hGH (SEQ ID NO: 190) через 15 минут после инъекции (IVI) ограничена малой популяцией везикул в апиальной области эпителиальных клеток, что показано определением зеленой иммунофлуоресценции.

На **ФИГ. 18В, ФИГ. 18С и ФИГ. 18D** показано, что через 15 мин после IVI, hGH (SEQ ID NO: 190) колокализуется с лизосома-ассоциированным мембранным белком 1 (LAMP1, красная флуоресценция) (**ФИГ. 18В**) и Ras-родственным белком (Rab7, пурпурная флуоресценция) (**ФИГ. 18С**) с примерно одинаковой частотой и характеристиками резидентных LAMP1<sup>+</sup>, Rab7<sup>+</sup> лизосом (**ФИГ. 18D**), показывая, что hGH был направлен на путь разрушения лизосом (например, рециркулирование) сразу же после поглощения в эпителиальные клетки.

На **ФИГ. 18Е и ФИГ. 18F** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 159), которая включает полученный из Cholix носитель (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) через спейсер (SEQ ID NO: 175), была направлена от лизосомного пути и, следовательно, не показывает колокализацию с либо LAMP1 (**ФИГ. 18Е**), либо Rab7 (**ФИГ. 18F**), тем самым позволяя транскитоз функциональной полезной нагрузки через поляризованные эпителиальные клетки в *lamina propria*.

На **ФИГ. 19А** показано, что распределение оболочечного белка I (COPI, красная флуоресценция) ограничено люминальной апиальной мембраной и апиальным везикулярным участком эпителиальных клеток до люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), которая включает полученный из Cholix носитель (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) через спейсер (SEQ ID NO: 175). Для сравнения, на **ФИГ. 19В** показано, что апиальная интравенозная инъекция (IVI, люминальная поверхность обозначена белой стрелкой на **ФИГ. 19А - ФИГ. 19D**) конструкции доставки (SEQ ID NO: 159) вызывает перераспределение COPI в

надъядерную локацию, показывая на колокализацию везикул, содержащих и конструкцию доставки с SEQ ID NO: 159, и COPI. Синяя флуоресценция означает окрашивание DAPI. Измерения на **Фиг. 19А - 19D** проводят через 15 минут после ILI.

На **ФИГ. 19С** показано, что LMAN1 (зеленая флуоресценция) колокализуется с COPI (красная флуоресценция) в апикальной области (обозначенной белой стрелкой) поляризованных эпителиальных клеток до инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 159).

На **ФИГ. 19D** показано, что после апикальной ILI (обозначенной белой стрелкой) конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), LMAN1 взаимодействует и распределяется с конструкцией доставки в базальную область эпителиальной клетки, соседнюю к *lamina propria* (обозначенной «l-p»). Таким образом, перераспределение LMAN1 вероятно используется носителями Cholix для движения с апикальной стороны эпителиальной клетки в базальный участок.

Последующий эксперимент показал, что полученные из Cholix носители могут использовать белки ERGIC (например, ERGIC-53) для передачи от апикальных к базальным участкам после эндоцитоза.

На **Фиг. 19Е - 19Н** показана миграция носителя Cholix (SEQ ID NO: 134) из апикального (показанного белой стрелкой #1) в базальный (показанный белой стрелкой #2) участки в эпителиальных клетках через 5 (**ФИГ. 19F**), 10 (**ФИГ. 19G**) и 15 мин (**ФИГ. 19H**) после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), содержащей полученный из Cholix носитель (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) в тощую кишку крысы. Локализация носителя Cholix показана зеленой флуоресценцией, локализация ERGIC рецептора показана красной флуоресценцией и локализация комплекса ER-Гольджи с белком миграции показана пурпурной флуоресценцией; таким образом, взаимодействие носителя Cholix и ERGIC рецептора показано желтой флуоресценцией, взаимодействие носителя Cholix и комплекса ER-Гольджи с белком миграции показано розовой флуоресценцией и взаимодействие и/или колокализация носителя Cholix, ERGIC рецептора и комплекса ER-Гольджи с белком миграции показана белыми пятнами (наложение зеленой, красной и пурпурной флуоресценции). Окрашивание DAPI показано синей флуоресценцией.

На **ФИГ. 19Е** показаны необработанные поляризованные эпителиальные клетки кишечника.

На **ФИГ. 19F** показана локализация и взаимодействие носителя Cholix (SEQ ID NO: 134) с комплексом ER-Гольджи с белком миграции через 5 минут после люминальной инъекции в апикальный участок, как показано сигналом розовой флуоресценции в апикальных участках.

На **ФИГ. 19G** показана миграция носителя Cholix (SEQ ID NO: 134) в ассоциации с ERGIC-53 в базальную мембрану через 10 минут после люминальной инъекции с последующим базальным выделением носителя (и конструкции) в *lamina propria* (золотая стрелка). Эти данные демонстрируют, что полученный из Cholix носитель может

использовать специфические взаимодействия с ERGIC белками для «похищения» везикулярной миграции от апикального к базальному участкам поляризованной эпителиальной клетки.

На **ФИГ. 19H** показаны количества носителя Cholix (SEQ ID NO: 134), присутствующего в lamina propria через 15 минут после люминальной инъекции.

На **Фиг. 19I-19K** показано, что носитель Cholix (SEQ ID NO: 134) применяет механизмы секреции базального белка для миграции через поляризованную эпителиальную клетку в lamina propria. Изображения флуоресцентного микроскопа получают через 15 мин после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 159), содержащей полученный из Cholix носитель (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146) в тощую кишку крысы, и они показывают, что базальные везикулы (обозначенные белыми кругами и цифрами «1-3» в разных эпителиальных клетках) могут содержать носитель Cholix и ERGIC-53 рецептор, носитель Cholix и белок базальной секреции или все три из носителя Cholix, ERGIC рецептора и белка базальной секреции. Локализация носителя Cholix показана зеленой флуоресценцией (с применением антитела против носителя Cholix), локализация ERGIC-53 рецептора показана красной флуоресценцией, и локализация белка базальной секреции показана пурпурной флуоресценцией; таким образом, взаимодействие носителя Cholix и ERGIC-53 рецептора показано желтой флуоресценцией, взаимодействие носителя Cholix и белка базальной секреции показано розовой флуоресценцией, и взаимодействие и/или колокализация носителя Cholix, ERGIC-53 рецептора и белка базальной секреции показано белыми пятнами (наложение зеленой, красной и пурпурной флуоресценции). Окрашивание DAPI показано синей флуоресценцией.

На **ФИГ. 19I** показано, что базальный участок везикул содержит носитель Cholix (SEQ ID NO: 134) и ERGIC-53 рецептор, как показано желтой флуоресценцией.

На **ФИГ. 19J** показано, что базальный участок везикул содержит носитель Cholix (SEQ ID NO: 134) и белок базальной секреции, как показано розовой флуоресценцией.

На **ФИГ. 19K** показано, что базальный участок везикул содержит носитель Cholix (SEQ ID NO: 134), ERGIC-53 рецептор и белок базальной секреции, как показано белыми пятнами (например, наложением зелено, красной и пурпурной флуоресценции).

На **ФИГ. 20A** показано распределение другого эндоплазматического элемента ретикулум-Гольджи-промежуточный участок (ERGIC), SEC22b, при отсутствии конструкции доставки (SEQ ID NO: 159). В необработанных (т.е., без инъекции конструкции доставки) тканях, SEC22b и LMAN1 обширно колокализуются в апикальном участке, а только LMAN1 отдельно наблюдается рядом с апикальной мембраной плазмы. На **Фиг. 20A-20D**, красная флуоресценция показывает локализацию LMAN1, пурпурная флуоресценция показывает локализацию SEC22b, зеленая флуоресценция показывает локализацию hGH, белая стрелка показывает апикальную поверхность и «G» означает Бокаловидные клетки.

На **ФИГ. 20B** показано, что через 5 минут после ILI конструкции доставки (SEQ ID

NO: 159), включающей носитель Cholix (SEQ ID NO: 134), связанный с hGH (SEQ ID NO: 146), LMAN1, SEC22b и hGH колокализуются в апикальном участке, но не значительно в базальных участках эпителиальных клеток.

На **ФИГ. 20С** показано, что через 10 мин после ILI, наблюдается, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 159) и LMAN1 колокализуются в базальном участке эпителиальных клеток без SEC22b, подтверждая, что LMAN1 взаимодействует и движется с конструкцией доставки внутри везикулы из апикального в базальный везикулярный участок эпителиальных клеток.

На **ФИГ. 20D** показано, что степень колокализации конструкции доставки (SEQ ID NO: 159) и LMAN1 в базальном участке через 15 мин после ILI повышается, при повышении количества hGH, достигающего lamina propria с течением времени.

На **ФИГ. 20Е - ФИГ. 20Н** показаны те же срезы тканей, как описаны выше и показаны на **ФИГ. 20А - ФИГ. 20D**, но демонстрирующие только LMAN1 и SEC22b сигналы (без hGH сигнала). Это демонстрирует значительное перераспределение LMAN1 в базальный участок без перераспределения SEC22b в ответ на апикальное применение доставки (SEQ ID NO: 159). Эти данные демонстрируют, что конструкции доставки, содержащие полученный из Cholix носитель, могут использовать эндогенные пути миграции Cholix, которые позволяют быструю и эффективную транспортировку полезной нагрузки через эпителий кишечника через связывание такой полезной нагрузки с носителем.

Вместе, эти данные показывают, что полученные из Cholix носители используют механизмы эндогенной бактериальной миграции для достижения апикально-базального транцитоза, позволяя таким носителям и конструкциям доставки, содержащим такие носители, мигрировать из просвета кишечника в lamina propria без нарушения барьерной функции эпителия кишечника и без ферментативной или химической модификации во время такой транспортировки. Эти трансэпителиальные механизмы транспортировки могут позволить пероральное введение терапевтической конструкции доставки, включающей полученный из Cholix носитель, связанный с терапевтически полезной нагрузкой, и транспортировку терапевтической полезной нагрузки через интактные и поляризованные эпителиальные мембраны.

## **ПРИМЕР 11**

### **Поверхностная модель полученного из Cholix носителя**

Этот пример показывает элементы структурной последовательности Cholix полипептида с SEQ ID NO: 178.

На **Фиг. 21А - 21Е** показана типовая поверхностная модель полученного из Cholix носителя, состоящего из SEQ ID NO: 178 (включает аминокислотные остатки 1-265 из SEQ ID NO: 1 и N-концевой метионин), который применяют для подчеркивания выбранных областей, представляющих интерес, которые могут играть роль в определенных функциональностях, связанных с апикально-базальным транцитозом, а также их относительное положение и близость на поверхности белка. Области

аминокислот, расположенные в пределах остатков V<sup>1</sup> и E<sup>39</sup> являются соседними к доступным на поверхности аминокислотам D<sup>150</sup>-K<sup>186</sup> и K<sup>186</sup>-L<sup>205</sup>. Более конкретно, L<sup>17</sup>-I<sup>25</sup> (область X1, SEQ ID NO: 160) и T<sup>170</sup>-I<sup>176</sup> (область X2, SEQ ID NO: 161) координируются с образованием кармана, окруженного несколькими отрицательными зарядами. Аналогично, K<sup>186</sup>-H<sup>202</sup> (область X3, SEQ ID NO: 162) координируется с I<sup>31</sup>-E<sup>39</sup> (область X4, SEQ ID NO: 163) с образованием непрерывной гребневой структурой. Кроме того, поверхностная модель показывает остатки D<sup>135</sup>-N<sup>139</sup> (область X5, SEQ ID NO: 164) и аспарагиновые остатки (например, потенциальные сайты гликозилирования), выделенные пурпурным.

На **ФИГ. 21А** показана аминокислотная последовательность Cholix полипептида с SEQ ID NO: 178. На **ФИГ. 21В** показано расположение областей X1, X3 и X4. На **ФИГ. 21С** показано расположение областей X1 и X2, а также X3 и X4. На **ФИГ. 21D** показано расположение областей X1, X2, X4 и X5.

Эти структурные данные показывают, что функциональные фрагменты последовательности в Cholix последовательности SEQ ID NO: 1 могут иметь непосредственную близость друг к другу, например области X3 и X4 и области X1 и X2.

#### **ПРИМЕР 12**

**Полученные из Cholix конструкции доставки взаимодействуют и/или колокализуются с разными маркерными белками во время транцитоза с применением разных участков**

Этот пример демонстрирует, что полученные из Cholix носители могут применять разные участки для миграции в и через (например, через транцитоз) эпителиальные клетки с применением разных маркерных белков (см., например, **ПРИМЕР 8**). Эти данные показывают, что конструкции полученного из Cholix носителя могут применять или «захватывать» специфические и эндогенные пути миграции Cholix (**ФИГ. 24**). Исследование, описанное в этом примере, проводят с применением полученной из Cholix конструкции доставки, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO: 149, которая включает носитель (SEQ ID NO: 135), связанный с IL-10 (SEQ ID NO: 145) через спейсер с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 176.

На **Фиг. 22А - 22L** показан анализ пути миграции для полученной конструкции доставки (SEQ ID NO: 149). На **Фиг. 22А - 22L** белая стрелка #1 показывает апикальную поверхность, белая стрелка #2 показывает базальную поверхность и белая стрелка #3 показывает lamina propria.

На **ФИГ. 22А** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) сильно колокализована с EEA1 антигеном в клеточных локациях, согласующихся с миграцией на обоих, апикальном и базальном участках эпителиальных клеток, позволяя предположить присутствие полученной из Cholix конструкции доставки в ранних эндосомальных участках. Красная флуоресценция показывает локализацию EEA1 антигена и зеленая флуоресценция показывает локализацию IL-10.

На **ФИГ. 22В** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) сильно

колокализована с Rab7 (наверху слева) преимущественно в апикальном участке эпителиальных клеток, но только с ограниченной колокализацией в клетках в *lamina propria*, позволяя предположить присутствие полученной из CholiX конструкции доставки в поздних эндосомальных участках (снизу слева показано изображение белого света и снизу справа показано слившееся окрашивание DAPI, показанное голубым, красная флуоресценция показывает локализацию EEA1 антигена и зеленая флуоресценция показывает локализацию IL-10).

На **ФИГ. 22С** показано, что LAMP1 идентифицирован в больших, специфических везикулах, согласующихся со зрелыми лизосомами, которые лишены конструкции доставки (SEQ ID NO: 149) (белые стрелки, красная флуоресценция показывает локализацию EEA1 антигена и зеленая флуоресценция показывает локализацию IL-10). Конструкция доставки (SEQ ID NO: 149), однако, колокализована с LAMP1 антигеном в клеточных локациях, отличных от лизосомоподобных структур, согласуясь с миграцией везикул на обоих, апикальном и базальном участках эпителиальных клеток, позволяя предположить присутствие полученной из CholiX конструкции доставки в поздних эндосомальных участках.

На **ФИГ. 22D** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) также сильно колокализована с покрытыми клатрином везикулами, особенно в областях, соседних к ядру, и с Rab11a преимущественно в базальном участке эпителиальных клеток, а также в выбранных клетках в *lamina propria*. Окрашивание DAPI показано синим, красная флуоресценция показывает локализацию IL-10 антигена, и зеленая флуоресценция показывает локализацию клатрина.

На **ФИГ. 22Е** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) колокализована с эндоплазматическим ретикулумом, что показано кальнексином (красная флуоресценция показывает локализацию кальнексина, и зеленая флуоресценция показывает локализацию IL-10) в шаблоне, соседнем к ядру в эпителиальных клетках, и большой доле клеток в *lamina propria*. Более конкретно, конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) сильно колокализована с эндоплазматическим элементом ретикулум-Гольджи-промежуточный участок (ERGIC) и LMAN1 антигеном, вероятно перераспределенным в ответ на эндоцитоз и транцитоз носителя, как показано через 5 (**ФИГ. 22F**), 10 (**ФИГ. 22G**) и 15 минут после инъекции (**ФИГ. 22H**).

На **ФИГ. 22F** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) сильно колокализована с эндоплазматическим элементом ретикулум-Гольджи-промежуточный участок 53 (ERGIC-53) и LMAN1 антигеном (красная флуоресценция показывает локализацию ERGIC-53 и LMAN1 и зеленая флуоресценция показывает локализацию IL-10, синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI), вероятно перераспределенным в ответ на эндоцитоз и транцитоз носителя, как показано через 5 минут после инъекции.

На **ФИГ. 22G** показана конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) колокализованная с LMAN1 антигеном через 10 минут после инъекции. Данные показывают значительную локализацию конструкции доставки (SEQ ID NO: 149) в *lamina propria*.

На **ФИГ. 22H** показана конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) колокализованная с LMAN1 антигеном через 15 минут после инъекции. Данные показывают значительную локализацию конструкции доставки (SEQ ID NO: 149) в *lamina propria*.

На **ФИГ. 22I** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) не колокализуется с низкими уровнями гиантина, присутствующего в эпителиальных клетках (красная флуоресценция показывает локализацию IL-10 и зеленая флуоресценция показывает локализацию гиантина, синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI). Некоторое количество гиантина, колокализованного с конструкцией в подмножестве клеток, присутствующих в *lamina propria*, позволяет предположить, что полученный из CholiX носитель не локализуется с участком Гольджи.

На **ФИГ. 22J** показано, что 58K антиген локализован в эпителиальных клетках на сайте, апиальном к ядру, и конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) показала некоторую колокализацию (красная флуоресценция показывает локализацию IL-10 и зеленая флуоресценция показывает локализацию антигена 58K Гольджи, синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI) с этим белком так, что можно предположить краткое движение через этот участок. 58K антиген не наблюдается в клетках в *lamina propria*.

На **ФИГ. 22K** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149, сверху слева, IL-10 локализация) показала некоторый уровень колокализации с TGN38 антигеном (сверху справа), которая показала клеточное распределение, которое ограничено апиальной стороной ядра в эпителиальных клетках, и является соседним к ядру в некоторых клетках в *lamina propria*. Изображение слева снизу показывает изображение белого света, показывающее слияние (наложение) с сигналом IL-10 (красный), TGN38 (зеленый) и DAPI (синяя флуоресценция).

На **ФИГ. 22L** показано, что конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) (IL-10 локализация показана зеленой флуоресценцией, сверху справа) сильно колокализована с Rab11a (сверху слева, локализация показана красной флуоресценцией) преимущественно в базальном участке эпителиальных клеток и в выбранных клетках в *lamina propria*. Изображение слева снизу показывает изображение белого света, и снизу справа показывает слияние (наложение) с сигналом IL-10 (зеленый), Rab11a (красный) и DAPI (синяя флуоресценция).

На **Фиг. 23A - 23C** показаны микроскопические изображения, показывающие транцитоз IL-10 через поляризованные эпителиальные клетки кишечника у крыс Wistar в разные моменты времени после люминального применения конструкции доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 149, в тощую кишку крысы. Конструкция доставки (SEQ ID NO: 149) включает носитель с SEQ ID NO: 135, связанный с IL-10 полезной нагрузкой, имеющей аминокислоту, указанную в SEQ ID NO: 145, через спейсер, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 176. Зеленая флуоресценция показывает присутствие IL-10 (через окрашивание анти-IL-10 антителом). Синяя флуоресценция показывает окрашивание DAPI, которое метит ДНК, и красная флуоресценция показывает присутствие CK-8 (цитокератина-8) с которым

полученный из Cholix носитель может колокализироваться (например, в надъядерной области эпителиальной клетки) во время транцитоза. Белые стрелки #1 показывают апикальную мембрану эпителиальных клеток, и белые стрелки #2 показывают базальную мембрану эпителиальных клеток.

На **ФИГ. 23А** показана степень транцитоза IL-10 через одну минуту после люминального применения конструкции доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 149, в тощую кишку крысы. Данные показывают, что транспортировка IL-10 полезной нагрузки из апикального в базальный сайт и в lamina propria происходит не позже 1 минуты после применения конструкции доставки. Белая стрелка #3 показывает присутствие IL-10 в lamina propria.

На **ФИГ. 23В** показана степень транцитоза IL-10 через пять минут после люминального применения конструкции доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 149, в тощую кишку крысы. Данные показывают повышенное количество транспортированной IL-10 полезной нагрузки, которая присутствует в lamina propria (см., например, белые стрелки #3) через 5 минут после люминального применения конструкции доставки.

На **ФИГ. 23С** показана степень транцитоза IL-10 через десять минут после люминального применения конструкции доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 149 в тощую кишку крысы. Данные показывают даже большее количество транспортированной IL-10 полезной нагрузки, которая присутствует в lamina propria (см., например, белые стрелки #3) через 10 минут после люминального применения конструкции доставки.

Дополнительные эксперименты с миграцией с использованием флуоресцентной микроскопии проводят, чтобы пролить свет на механизм транцитоза носителя Cholix с SEQ ID NO: 135, который включен в конструкцию доставки с SEQ ID NO: 149.

На **Фиг. 23D - 23F** показан апикальный эндоцитоз и ранняя миграция носителя Cholix с SEQ ID NO: 135 в эпителиальных клетках через 1 мин после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 149), содержащей носитель Cholix с SEQ ID NO: 135, связанный с IL-10 (SEQ ID NO: 145) в тощей кишке крысы. Данные показывают, что полученные из Cholix носители не избегают пути лизосомного разрушения через взаимодействие с рецепторами лизосомного избегания. Локализация носителя Cholix показана зеленой флуоресценцией, локализация апикального входного рецептора (например, TMEM132) показана красной флуоресценцией; и локализация рецепторов лизосомного избегания показана пурпурной флуоресценцией; тем самым, взаимодействие носителя Cholix и апикального входного рецептора показано желтой флуоресценцией, взаимодействие носителя Cholix и рецептора лизосомного избегания показано розовой флуоресценцией, и взаимодействие и/или колокализация носителя Cholix, апикального входного рецептора и рецептора лизосомного избегания показана белыми пятнами (наложение зеленой, красной и пурпурной флуоресценции). Окрашивание DAPI показано синей флуоресценцией.

На **ФИГ. 23D** показана локализация носителя Cholix (SEQ ID NO: 135) на апикальной мембране (показанной белой стрелкой #1) поляризованной эпителиальной клетки. Базальная мембрана показана белой стрелкой #2 и lamina propria показана белой стрелкой #3.

На **ФИГ. 23E** показано взаимодействие носителя Cholix (SEQ ID NO: 135) с апикальным входным рецептором (например, TMEM132), как показано желтой флуоресценцией на и вокруг апикальной мембраны.

На **ФИГ. 23F** показано, что носитель Cholix (SEQ ID NO: 135), апикальный входной рецептор и рецептор лизосомного избегания находятся в непосредственной близости от апикальной мембраны, как показано белыми пятнами (например, наложением зеленой, красной и пурпурной флуоресценции), показанной белой стрелкой. Предполагают, что рецептор лизосомного избегания может сближать комплекс носитель Cholix-апикальный входной рецептор с последующей диссоциацией носителя Cholix с апикальным входным рецептором и ассоциацией носителя Cholix с рецептором лизосомного избегания из-за изменений в pH среде и pH-зависимости этого взаимодействия носитель Cholix-рецептор, как показано, например, на **ФИГ. 15B**.

На **Фиг. 23G - 23H** показана миграция носителя Cholix (SEQ ID NO: 135) из апикального в надъядерный участки в эпителиальных клетках через 5 и 15 мин после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 149), содержащей полученный из Cholix носитель (SEQ ID NO: 135), связанный с IL-10 (SEQ ID NO: 145) в тощей кишке крысы. Локализация носителя Cholix показана зеленой флуоресценцией, локализация ERGIC рецептора показана красной флуоресценцией, локализация апикального входного рецептора (например, TMEM132) показана оранжевой флуоресценцией; и локализация рецептора лизосомного избегания показана пурпурной флуоресценцией; таким образом, взаимодействие носителя Cholix и ERGIC рецептора показано желтой флуоресценцией, взаимодействие носителя Cholix и рецептора лизосомного избегания показано розовой флуоресценцией, и взаимодействие и/или колокализация носителя Cholix, апикального входного рецептора и рецептора лизосомного избегания показана белыми пятнами (наложение зеленой, красной и пурпурной флуоресценции). Окрашивание DAPI показано синей флуоресценцией.

На **ФИГ. 23G** показана локализация носителя Cholix (SEQ ID NO: 135) в поляризованных эпителиальных клетках кишечника через 5 минут после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 149). Данные показывают, что после опосредованного апикальным рецептором эндоцитоза, носитель Cholix образует комплексы с рецептором лизосомного избегания и апикальным входным рецептором близко к апикальной мембране (показанной белыми пятнами (наложение зеленой, красной и пурпурной флуоресценции) и обозначенной белой стрелкой) и также начинает взаимодействие с ERGIC рецептором, что показано желтой флуоресценцией (и желтой стрелкой) незначительно ближе к надъядерным областям в клетке.

На **ФИГ. 23H** показана локализация носителя Cholix (SEQ ID NO: 135) в

поляризованных эпителиальных клетках кишечника через 15 минут после люминальной инъекции конструкции доставки (SEQ ID NO: 149). Данные показывают, что носитель движется из апикального в надъядерные участки при ассоциации с ERGIC (см. желтую стрелку), где интенсивность желтой флуоресценции повышается по сравнению с 5 минутами после инъекции, показывая движение носителя Cholix из апикальной в надъядерные области с течением времени. Данные также показывают локализацию носителя Cholix на базальной мембране и в lamina propria (золотые стрелки).

Вместе эти данные показывают, что полученные из Cholix носители могут использовать эндогенные пути миграции Cholix для транцитоза через поляризованные эпителиальные клетки и, таким образом, может использоваться для быстрой и эффективной транспортировки полезных нагрузок (например, терапевтических белков, таких как интерлейкины) через эпителиальные клеточные барьеры без нарушения биологической активности такой полезной нагрузки.

### **ПРИМЕР 13**

#### **Транспортировка анти-TNF $\alpha$ агентов через слои эпителиальных клеток**

Этот пример показывает, что полученный из Cholix полипептида носитель может транспортировать анти-TNF $\alpha$  агенты через интактные слои эпителиальных клеток.

Тестируют транспортировку конструкциями доставки через эпителий кишечника следующим образом: диких крыс (Sprague Dawley®, ~200-250 граммов, возраст ~6 недель, куплены у Charles River) не кормят в течение ночи для опорожнения кишечника; готовят микроцентрифужные пробирки, содержащие 4% формальдегида, пробирки для консервации тканей, микроцентрифужные пробирки для сбора крови, микроцентрифужные пробирки для сбора сыворотки, ФРФБ и тестируемое изделие; Животных готовят для эксперимента (анестезируют животных Изофлураном и бреют живот); готовят инъекции для каждого животного (каждое животное получает 4 инъекции (2 x тощую кишку и 2 x толстую кишку); открывают брюшную полость, устанавливают и отмечают места инъекции разными цветами; медленно вводят тестируемое изделие в просвет (инъекция занимает 10 минут в толстую кишку и 40 минут в тощую кишку) и животные получают 35 мкг белка на инъекцию в концентрации 1 мкг/мл; животных умерщвляют через 50 минут; посмертную кровь собирают сердечной пункцией; вынимают тощую кишку и толстую кишку и помещают на пластиковую линованную рабочую поверхность; промывают содержимое тощей кишки и толстой кишки ФРФБ и выбрасывают; иссекают 1 см кишечника из места инъекции; разрезают иссеченную ткань напополам и помещают 1 срез в 4% формальдегид. Оставшуюся ткань затем продольно разрезают и сразу же помещают в микроцентрифужную пробирку и замораживают. Этот процесс повторяют для всех мест инъекции. Удаляют печень (~1 см<sup>3</sup>) и делят на 2 куса. Помещают 1 часть печени в формальдегид и вторую сразу же замораживают для хранения. Образцы кишечника, печени и сыворотки крови собирают через 40 мин после окончания. Центрифугируют образцы крови и переносят сыворотку в контейнеры для хранения. Образцы переносят на сухой лед и хранят при -80°C. Схема дозирования

следующая: Chx<sup>386</sup>-анти-TNF $\alpha$  100 мкл, 490 пмоль/98 мкг (4,9 мкМ); Chx<sup>415</sup>-анти-TNF $\alpha$  100 мкл, 490 пмоль/99,5 мкг (4,9 мкМ); анти-TNF $\alpha$  100 мкл, 490 пмоль/76 мкг (4,9 мкМ).

Биоаналитический анализ транспортировки через эпителий кишечника Cholix-антиTNF- $\alpha$  конструкций проводят с применением набора для IgG1 мыши ELISA (abcam®, Cat# ab133045) следующим образом: образцы ткани получают от Brains On-line; 300 мкл аналитического буфера 1X добавляют в каждую пробирку, содержащую образец ткани; ткань вынимают из аналитического буфера и помещают на стерильную, чистую крышку планшета для культивирования; образцы кишечника осторожно соскребают скребком для клеток, будучи осторожным, чтобы избежать сбора брыжейки; образцы печени обрабатывают таким же образом с дополнительной мацерацией и гомогенизацией; полученный клеточный гомогенат переносят обратно в исходную пробирку; оставшиеся образцы тканей и рабочую область промывают 100 мкл буфера (2х); раствор клеточного гомогената центрифугируют с максимальной силой в течение 5 минут; супернатант наносят на пластину ELISA согласно инструкции производителя. Оставшийся супернатант хранят при -20°C для дальнейшего использования.

На **ФИГ. 25** показано, что оба полученных из Cholix<sup>386</sup> носителя (например, SEQ ID NOs: 135 или 180) и полученного из Cholix<sup>415</sup> носителя (например, содержащего остатки 1-415 из SEQ ID NO: 1) транспортируют анти-TNF $\alpha$  агент (например, анти-TNF $\alpha$  антитело или его функциональный фрагмент) через эпителиальные клетки кишечника через 10 минут и 40 минут. Более того, Cholix<sup>386</sup>-анти-TNF $\alpha$  конструкция транспортирует со скоростью примерно 12х от скорости только анти-TNF- $\alpha$  и Cholix<sup>415</sup>-анти-TNF $\alpha$  транспортирует со скоростью ~7х от скорости только анти-TNF- $\alpha$ .

Эти данные демонстрируют, что полученные из Cholix носители способны транспортировать различные полезные молекулы, такие как анти-TNF $\alpha$  агент, через интактные и поляризованные эпителиальные клеточные слои.

#### **ПРИМЕР 14**

##### **Получение конструкций доставки, содержащих Экзенатид**

Экзенатид (SEQ ID NO: 195) является пептидом, имеющим GLP-1-подобную биологическую активность, который стабилизирован С-концевым амином и N-концевым Н. В этом примере, две не существующих в природе выделенных конструкции, содержащие: 1) носитель, имеющие SEQ ID NO: 194, обработанный до носителя, имеющего SEQ ID NO: 192 и поперечно-сшитый с SEQ ID NO: 195, и 2) носитель, имеющий SEQ ID NO: 191, обработанный до носителя, имеющего SEQ ID NO: 193 и поперечно-сшитый с SEQ ID NO: 195 готовят и тестируют для транспортировки через эпителий кишечника *in vivo*. Носители, имеющие SEQ ID NO: 191 и SEQ ID NO: 192 готовят, как описано в настоящем документе, и Экзенатид (SEQ ID NO: 195) (Cat# HOR-246) покупают у ProSpec-Tany Technogene Ltd. PO Box 6591, East Brunswick, NJ 08816. Набор Pierce<sup>TM</sup> Controlled Protein-Protein Crosslinking Kit (Cat# 23456), содержащий поперечно-сшивающий агент Sulfo-SMCC покупают у ThermoFisher.

##### **Активация и поперечное сшивание полезной нагрузки и носителя**

Экзенатид (10 мг) растворяют в 5 мл H<sub>2</sub>O с получением 2 мг/мл раствор. Sulfo-SMCC (2 мг) растворяют в 2 мл ФРФБ. Сразу же после, 0,088 мл (~5-кратный молярный избыток) раствора Sulfo-SMCC добавляют к 1,0 мл раствора Экзенатида и инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре. Не прореагировавший Sulfo-SMCC удаляют добавлением 1,0 мл реакционной смеси малеимид-Экзенатид в обессоливающую колонку, уравновешенную ФРФБ, элюируя ФРФБ, и собирают 0,5 мл фракции. Абсорбцию при 280 нм каждой фракции измеряют для определения пика белка. Пиковые фракции, содержащие большую часть белка, объединяют. Концентрацию объединенного активированного Экзенатида определяют сравнением его абсорбции при 280 нм с абсорбцией исходного раствора белка.

Носители, имеющие SEQ ID NO: 193 и SEQ ID NO: 194 имеют С-концевое удлинение, содержащее сайт расщепления TEV, окруженный двумя цистеиновыми остатками, которые образуют дисульфидную связь и С-концевую His<sub>6</sub> метку. Носители, имеющие SEQ ID NO: 193 и SEQ ID NO: 194 очищают на колонке HisTrap с применением стандартных способов. 2 мг белка (200 мкл 10 мг/мл) в ФРФБ при pH 7,4 активируют обработкой 2 мкл 0,1М дитиотреитол и 5 мкл TEV протеазы в течение двух часов при 30°C. Отщепленный и восстановленный белок наносят на 1-мл колонку HisTrap, уравновешенную PBS. С-концевой фрагмент, связанный с колонкой, и активированный N-концевой SEQ ID NO: 191 или SEQ ID NO: 192 продукт со свободным цистеином рядом с его С-концом собирают в потоке.

Малеимид-активированный Экзенатид и носители (сульфгидрил-SEQ ID NO: 191 белок или сульфгидрил-SEQ ID NO: 192 белок) смешивают в равных молярных количествах и затем инкубируют в течение 60 минут при комнатной температуре. Чистоту SMCC-поперечно-сшитого комплекса SEQ ID NO: 192 - Экзенатид оценивают на окрашенном Coomassie SDS гелем. Комплекс имеет приблизительно правильную молекулярную массу и имеет >90% чистоту (ФИГ.26). Поперечно-сшитые конструкции доставки затем хранят при 4°C.

### **ПРИМЕР 15**

#### **In vivo транцитоз конструкций доставки Экзенатида**

Тестируют транспортировку конструкциями доставки через эпителий кишечника следующим образом: диких крыс (Sprague Dawley®, ~200-250 граммов, возраст ~6 недель, куплены у Charles River) не кормят в течение ночи для опорожнения кишечника. Готовят следующие материалы: микроцентрифужные пробирки, содержащие 4% формальдегида, пробирки для консервации тканей, микроцентрифужные пробирки для сбора крови, микроцентрифужные пробирки для сбора сыворотки, ФРФБ и тестируемое изделие. Животных готовят для эксперимента, анестезируя их Изофлураном и выбривая их животы. Готовят четыре инъекции для каждого животного (2 x тощую кишку и 2 x толстую кишку). Открывают брюшную полость. Устанавливают и отмечают места инъекции разными цветами. Медленно вводят тестируемое изделие в просвет в течение 10 минут в толстую кишку и 40 минут в тощую кишку. Животные получают 35 мкг белка на

инъекцию в концентрации 1 мкг/мл. Животных умерщвляют через 50 минут. Посмертную кровь собирают сердечной пункцией. Вынимают тощую кишку и толстую кишку и помещают на пластиковую линованную рабочую поверхность. Промывают содержимое тощей кишки и толстой кишки ФРФБ и выбрасывают. Иссекают 1 см кишечника из места инъекции. Разрезают иссеченную ткань напополам. Один срез помещают в 4% формальдегид. Оставшуюся ткань затем продольно разрезают и сразу же помещают в микроцентрифужную пробирку и замораживают. Этот процесс повторяют для всех мест инъекции. Удаляют печень (~1 см<sup>3</sup>) и делят на 2 куса. Для хранения, одну часть помещают печени в формальдегид и вторую сразу же замораживают. Образцы кишечника, печени и сыворотки крови собирают через 40 мин после окончания. Центрифугируют образцы крови и переносят полученную сыворотку в контейнеры для хранения. Образцы переносят на сухой лед и хранят при -80°C. Схема дозирования следующая: SEQ ID NO: 192-Экзенатид 100 мкл, 490 пмоль/29,4 мкг (4,9 мкМ); SEQ ID NO: 191-Экзенатид 100 мкл, 490 пмоль/30,9 мкг (4,9 мкМ); SEQ ID NO: 195, 100 мкл, 490 пмоль/2 мкг (4,9 мкМ).

Биоаналитический анализ транспортировки через эпителий кишечника SEQ ID NO: 192-Экзенатида, SEQ ID NO: 191-Экзенатида и SEQ ID NO: 195 (Экзенатид) проводят с применением набора Exendin-4 ELISA (Phoenix Pharma, Cat# EK-070-94) следующим образом: образцы ткани получают от Brains On-line; 300 мкл аналитического буфера (1X) добавляют в каждую пробирку, содержащую образец ткани; ткань вынимают из аналитического буфера и помещают на стерильную, чистую крышку планшета для культивирования; образцы кишечника осторожно соскребают скребком для клеток, будучи осторожным, чтобы избежать сбора брыжейки; образцы печени обрабатывают таким же образом с дополнительной мацерацией и гомогенизацией; полученный клеточный гомогенат переносят обратно в исходную пробирку; оставшиеся образцы тканей и рабочую область промывают 100 мкл буфера (2x); раствор клеточного гомогената центрифугируют с максимальной силой в течение 5 минут; супернатант наносят на пластину ELISA согласно инструкции производителя. Оставшийся супернатант хранят при -20°C для дальнейшего использования.

Как изображено на **ФИГ. 27**, транспортировка обоих SEQ ID NO: 192-Экзенатида и SEQ ID NO: 191-Экзенатида через эпителиальные клетки кишечника наблюдают через 10 минут и через 40 минут. Кроме того, оба, SEQ ID NO: 192-Экзенатид и SEQ ID NO: 191-Экзенатид были транспортированы с более высокой скоростью, чем только SEQ ID NO: 195 (Экзенатид), особенно через 40 минут.

#### **ПРИМЕР 16**

**Длина спейсера и связывание полезной нагрузки с N- или C-концом носителя не влияет значительно на биологическую активность полезной нагрузки**

Этот пример показывает, что аминокислотные линкеры различной длины и связывание гетерологичной полезной нагрузки с N-концом носителя не оказывает значительного влияния на способность полезной нагрузки связывать свою мишень при включении в конструкцию доставки.

Анализ димеризации рецептора IL-22 проводят посевом клеток DiscoverX HEK293 и инкубированием клеток в течение 16 часов (5000 клеток на лунку) с использованием показанных концентраций агониста (конструкции доставки, содержащей полезную нагрузку IL-22). Конечную люминесценцию считывают на планшетном ридере с использованием анализа димеризации PathHunter® eXpress IL22RA1/IL10RB.

На **ФИГ. 28А** показано, что длина аминокислотных спейсеров с SEQ ID NOs: 175, 196 и 197 не влияет на способность IL-22 (SEQ ID NO: 142) при включении в конструкции доставки с SEQ ID NOs: 147, 198 и 199 для того чтобы вызвать димеризацию IL-22 рецептора. Индукция димеризации рецептора контрольным рекомбинантным IL-22 человека (rhIL-22, SEQ ID NO: 143) показана черной кривой.

На **ФИГ. 28В** показано, что сочетание IL-22 полезной нагрузки (SEQ ID NO: 142) с N- или C-концом носителя, содержащего аминокислотные остатки 1-266 из SEQ ID NO: 1 через спейсер с SEQ ID NO: 196 значительно не меняет способность конструкций доставки с SEQ ID NOs: 198, 200 и 201 вызывать димеризацию IL-22 рецептора. Индукция димеризации рецептора контрольным рекомбинантным IL-22 человека (rhIL-22) показана черной кривой.

На **ФИГ. 28С** показано, что длина аминокислотных спейсеров с SEQ ID NOs: 175, 196 и 197 не влияет на способность IL-22 (SEQ ID NO: 142) при включении в конструкции доставки с SEQ ID NOs: 147, 198 и 199, вызывать активацию pSTAT3. Активация pSTAT3 контрольным рекомбинантным IL-22 человека (rhIL-22, SEQ ID NO: 143) показана черной кривой.

Анализ активации pSTAT3 проводят с использованием клеток Colo205, инкубированных с 10 мкл агониста (соответствующей конструкции доставки или контроля IL-22), имеющего различные концентрации в течение 15 мин. Затем измеряют степень активации pSTAT3 с использованием планшетов MSD STAT3 (кат. № N450SMA-1).

На **ФИГ. 28D** показано, что сочетание IL-22 полезной нагрузки (SEQ ID NO: 142) с N- или C-концом носителя, содержащего аминокислотные остатки 1-266 из SEQ ID NO: 1 через спейсер с SEQ ID NO: 196 не изменяет значительно способность конструкций доставки с SEQ ID NOs: 198, 200 и 201 вызывать активацию pSTAT3. Активация pSTAT3 контрольным рекомбинантным IL-22 человека (rhIL-22) показана черной кривой.

Все изделия и способы, раскрытые и заявленные в настоящем документе, могут быть выполнены и проведены без излишних экспериментов в свете настоящего описания. Хотя изделия и способы по настоящему описанию были описаны в терминах вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидно, что к изделиям и способам могут быть применены вариации, не выходящие за рамки сути и объема описания. Все такие вариации и эквиваленты, очевидные для специалистов в данной области техники, существующие в настоящее время или разработанные позже, считаются находящимися в пределах сути и объема описания, определенного прилагаемой формулой изобретения. Все патенты, заявки на патенты и публикации, упомянутые в описании,

указывают на уровень специалистов в области техники, к которой относится описание. Все патенты, заявки на патенты и публикации включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей и в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была специально и индивидуально указана как включенная в качестве ссылки полностью для любых и всех целей. Раскрытие, иллюстративно описанное в настоящем документе, подходящим образом может быть осуществлено на практике в отсутствие каких-либо элементов, не описанных специально в настоящем документе. Используемые термины и выражения используются как термины описания, а не ограничения, и нет намерения, чтобы при использовании таких терминов и выражений исключались какие-либо эквиваленты показанных и описанных признаков или их частей, но признается, что в объеме заявленного описания возможны различные модификации. Таким образом, следует понимать, что, хотя настоящее описание было конкретно описано посредством вариантов осуществления и дополнительных функций, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к модификации и изменению концепций, раскрытых в настоящем документе, и что такие модификации и вариации рассматриваются как входящие в объем настоящего описания, как определено прилагаемой формулой изобретения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий носитель, способный эндоцитозироваться в поляризованные эпителиальные клетки и аккумулироваться в области клетки, где полезная нагрузка является гетерологичной к носителю.
2. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 1, где областью является апикальный участок, надъядерный участок или базальный участок.
3. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 1, где носитель удерживается в области в течение, по меньшей мере, 5 мин, 10 мин или 15 минут в области.
4. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 1, где носителем является полученный из Cholix полипептид.
5. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 4, где носителем является полипептид, имеющий последовательность Cholix с С-концом на любом из положений 150-195.
6. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 5, где носителем является полипептид, имеющий последовательность Cholix с N-концом на любом из положений 1-41.
7. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 4, где носителем является полипептид, имеющий последовательность Cholix с N-концевым усечением на любом из положений 35-40.
8. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 7, где носителем является полипептид, имеющий последовательность Cholix с С-концом на любом из положений 150-205.
9. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 4, где носитель состоит из аминокислотных остатков от N-концевого положения 40 до любого из С-концевых положений 150-205 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130.
10. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 4, где носитель имеет С-конец в положениях 150 или 187 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130.
11. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 4, где носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 137.
12. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 4, где носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 137-139.
13. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 5-8, где нумерация положений основана на выравнивании Cholix полипептида с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 130, где положения пронумерованы от N-конца к С-концу, начиная с положения 1 на N-конце.
14. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-13, где носитель способен оставаться ассоциированным с апикальным входным рецептором дольше после эндоцитоза носителя в поляризованную эпителиальную клетку, чем носитель, способный транцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку.
15. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 14, где апикальным входным

рецептором является TMEM132 рецептор.

16. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-15, где поляризованная эпителиальная клетка содержит желудочно-кишечную поляризованную эпителиальную клетку.

17. Комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий

а) носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего С-конец на любом из положений 195-347 и способный трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку, связанный с

б) гетерологичной полезной нагрузкой.

18. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где нумерация положений основана на выравнивании Cholix полипептида с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 130, где положения пронумерованы от N-конца к С-концу, начиная с положения 1 на N-конце.

19. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где С-конец находится на любом из положений 195-266.

20. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где С-конец находится на одном из положений 195-266 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

21. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где С-конец находится на любом из положений 206, 245, 251 или 266 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130.

22. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где С-конец находится на любом из положений 206, 245, 251 или 266 из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

23. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 22, где С-конец находится в положении 206 любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

24. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 131 или 184.

25. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где С-конец находится в положении 245 любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

26. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 132 или 183.

27. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где С-конец находится в положении 251 из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

28. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 133 или 182.

29. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где С-конец находится в положении 266 из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

30. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 17, где носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 134 или 181.

31. Комплекс носитель-полезная нагрузка 17, где носитель состоит из

последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78 с усечением в любом из положений 195-347, и имеет не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных вариаций на любом из положений 1-40, 133-151, 152-187 или 188-206 из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

32. Комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий

а) носитель полученный из Cholix полипептида, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или его фрагмент способный эндоцитозировать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать поляризованную эпителиальную клетку, связанный с

б) гетерологичной полезной нагрузкой.

33. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 32, где носитель содержит глутаминовую кислоту в положении 3 и аланин в положении 4.

34. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 32-33, где носитель является не токсичным.

35. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 32-34, где носитель способен трансцитозировать гетерологичную полезную нагрузку чрез поляризованную эпителиальную клетку.

36. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 32, где носитель содержит фрагмент, способный трансцитозировать поляризованную эпителиальную клетку, где носитель имеет С-конец на любом из положений от 195 до С-концевого остатка последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

37. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 36, где С-конец находится на одном из положений 195-386 последовательности, указанной в любой из SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

38. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 37, где С-конец находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

39. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 38, где С-конец находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2.

40. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 39, где носитель состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 135.

41. Комплекс носитель-полезная нагрузка, содержащий

а) носитель полученный из Cholix полипептида, который не содержит SEQ ID NO: 179 и не состоит из SEQ ID NO: 126, в комплексе с

б) гетерологичной полезной нагрузкой,

где носитель способен

i) трансцитозировать гетерологичную полезную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку; или

ii) транспортировать гетерологичную полезную нагрузку в поляризованную эпителиальную клетку.

42. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 41, где носитель имеет, по меньшей мере, 75% идентичность последовательности к последовательности, указанной в SEQ ID

NO: 130 или ее фрагменту.

43. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 42, где носитель имеет, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к Cholix варианту, указанному в SEQ ID NO: 130 или его фрагменту.

44. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 41, где Cholix полипептидом является последовательность, указанная в SEQ ID NO: 130 или ее фрагмент.

45. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 41-44, где носитель содержит глутаминовую кислоту в положении 3 и аланин в положении 4.

46. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 41-45, где носитель является не токсичным.

47. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 41-46, где носитель способен трансцитозировать гетерологичную полезную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку.

48. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 47, где носитель имеет С-концевое усечение на любом из положений 195-633 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130.

49. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 48, где С-концевое усечение находится на одном из положений 195-386 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130.

50. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 49, где носитель имеет С-концевое усечение на любом из положений 195-386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

51. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 50, где С-концевое усечение находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2 или 4-78.

52. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 51, где С-концевое усечение находится в положении 386 любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 1-2.

53. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-52, где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит N-концевой метионин.

54. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-53, где носитель синтетически конъюгирован с гетерологичной полезной нагрузкой.

55. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-53, где носитель генетически слит с гетерологичной полезной нагрузкой.

56. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-55, где гетерологичной полезной нагрузкой является терапевтическая полезная нагрузка.

57. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 56, где терапевтической полезной нагрузкой является цитокин, антитело, гормон или нуклеиновая кислота.

58. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 57, где терапевтической полезной нагрузкой является цитокин.

59. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 58, где цитокином является

интерлейкин.

60. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 59, где интерлейкином является IL-10.

61. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 60, где IL-10 содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 145.

62. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 59, где интерлейкином является IL-22.

63. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 62, где IL-22 содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 142.

64. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 57, где терапевтической полезной нагрузкой является антитело.

65. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 64, где антителом является анти-TNF антитело.

66. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 57, где терапевтической полезной нагрузкой является гормон.

67. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 66, где терапевтической полезной нагрузкой является гормон роста человека.

68. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-67, где гетерологичная полезная нагрузка ковалентно связана с носителем.

69. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-68, где гетерологичная полезная нагрузка связана с С-концом носителя.

70. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-68, где гетерологичная полезная нагрузка связана с N-концом носителя.

71. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-68, где носитель связан с гетерологичной полезной нагрузкой через спейсер.

72. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 71, где спейсером является не расщепляемый спейсер.

73. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 71-72, где спейсер содержит от 1 до 100 аминокислотных остатков.

74. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 73, где спейсер содержит вплоть до 15 повторов GS, GGS, GGGS, GGGGS, GGGGGS или их комбинацию.

75. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 71, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 175.

76. Комплекс носитель-полезная нагрузка по п. 71, где спейсер состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 176.

77. Комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-67, где гетерологичная полезная нагрузка не ковалентно связана с носителем.

78. Комплекс носителя по п. 1-67, где гетерологичная полезная нагрузка образует

комплекс с носителем через наночастицу.

79. Полинуклеотид, кодирующий комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 1-77.

80. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 79.

81. Способ транцитоза гетерологичной полезной нагрузки через поляризованную эпителиальную клетку, включающий:

(a) контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка; и

(b) транцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку,

где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или его фрагмента, способный транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

82. Способ по п. 81, где контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка включает взаимодействие носителя с апикальным входным рецептором TMEM132.

83. Способ по п. 81, где взаимодействие носителя с мембранным белком TMEM132 дает рецептор-опосредованный эндоцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка.

84. Способ по любому из пп. 81-83, где носитель, который взаимодействует с TMEM132, содержит аминокислотные остатки 135-151 из SEQ ID NO: 130 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней.

85. Способ по любому из пп. 81-84, где транцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку включает взаимодействие носителя с любым одним или несколькими из GRP75, ERGIC-53 и перлекана.

86. Способ по любому из пп.81-85, где транцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка через поляризованную эпителиальную клетку дополнительно включает колокализацию комплекса носитель-полезная нагрузка с любым одним или несколькими из COPI, EEA1 и Rab7 на апикальной стороне, и с Rab11a на базальной стороне эпителиальной клетки.

87. Способ по любому из пп. 81-86, где носитель, который взаимодействует с GRP7 или ERGIC-53, содержит аминокислотные остатки 1-40 и 152-187 из SEQ ID NO: 130, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней.

88. Способ по любому из пп. 81-87, где носитель, который взаимодействует с перлеканом, содержит аминокислотные остатки 188-205 из SEQ ID NO: 130, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней.

89. Способ по п.81, дополнительно включающий, после (b), доставку комплекса носитель-полезная нагрузка в *lamina propria*.

90. Способ по любому из пп.81-89, где поляризованными эпителиальными клетками являются поляризованные эпителиальные клетки кишечника.

91. Способ пероральной доставки гетерологичной полезной нагрузки субъекту, включающий:

92. пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым доставляя гетерологичную полезную нагрузку субъекту, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или его фрагмента, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

93. Комплекс носитель-полезная нагрузка для пероральной доставки гетерологичной полезной нагрузки субъекту способом, включающим:

пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или его фрагмента, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

94. Применение комплекса носитель-полезная нагрузка для пероральной доставки гетерологичной полезной нагрузки субъекту способом, включающим:

пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту; где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или его фрагмента, способный трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

95. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий:

пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен трансцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из

SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или его фрагмента, способный транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

96. Комплекс носитель-полезная нагрузка для применения в лечении заболевания у субъекта способом, включающим:

пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или его фрагмента, способный транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

97. Применение комплекса носитель-полезная нагрузка в производстве лекарственного средства для лечения заболевания у субъекта способом, включающим:

пероральное введение комплекса носитель-полезная нагрузка субъекту, где носитель способен транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через поляризованный эпителий, тем самым обеспечивая лечение заболевания у субъекта, и где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129, или его фрагмента, способный транцитозировать комплекс носитель-полезная нагрузка через эпителий, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.

98. Способ по любому из пп. 91-97, дополнительно включающий связывание гетерологичной полезной нагрузки с рецептором в *lamina propria*.

99. Способ по любому из пп. 91-97, дополнительно включающий доставку гетерологичной полезной нагрузки в системный кровоток.

100. Способ по любому из пп. 91-99, где носитель получен из Cholix полипептида.

101. Способ по п. 99, где носитель содержит аминокислотные остатки 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 или 1-386 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130.

102. Способ по п. 101, где носитель содержит аминокислотные остатки 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 или 1-386 последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 1-2.

103. Способ по п. 102, где носитель содержит любую из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 131-135 или 180-184.

104. Способ по любому из пп. 91-102, где поляризованным эпителием является поляризованный эпителий кишечника.

105. Способ по любому из пп. 91-103, где заболеванием является язвенный колит, паучит, проктит, болезнь Крона, рассеянный склероз (MS), системная красная волчанка (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит или псориаз.

106. Способ по п. 104, где заболеванием является язвенный колит.
107. Способ по п. 105, где язвенный колит имеет степень от слабого до умеренного или от умеренного до тяжелого.
108. Способ по п. 104, где заболеванием является болезнь Крона.
109. Способ по п. 107, где болезнью Крона является фистулизирующая болезнь Крона.
110. Способ по любому из пп. 91-108, где полезной нагрузкой является интерлейкин.
111. Способ по п. 109, где интерлейкин содержит аминокислотную последовательность по SEQ ID NOs: 142 или 145.
112. Способ транспортировки гетерологичной полезной нагрузки в поляризованную эпителиальную клетку, включающий:
- (a) контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка; и
  - (b) транспорт комплекса носитель-полезная нагрузка в поляризованную эпителиальную клетку,
- где комплекс носитель-полезная нагрузка содержит носитель, полученный из Cholix полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOs: 1-2, 4-125 или 127-129 или его фрагмента, способный транспортировать комплекс носитель-полезная нагрузка в эпителиальную клетку, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой.
113. Способ по п. 111, где контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка включает взаимодействие носителя с апикальным входным рецептором TMEM132.
114. Способ по п. 111, где взаимодействие носителя с апикальным входным рецептором TMEM132 дает рецептор-опосредованный эндоцитоз комплекса носитель-полезная нагрузка.
115. Способ по любому из пп. 111-113, дополнительно включающий транспорт гетерологичной полезной нагрузки в апикальный участок или базальный участок.
116. Способ по любому из пп. 111-134, где носитель комплекса носитель-полезная нагрузка остается ассоциированным с TMEM132 после эндоцитоза.
117. Способ по любому из пп. 111-115, где носитель, который взаимодействует с TMEM132, содержит аминокислотные остатки 135-151 из SEQ ID NO: 130 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности к ней.
118. Способ по любому из пп. 111-116, где носитель получен из Cholix полипептида.
119. Способ по п. 117, где носитель состоит из аминокислотных остатков 1-151, 1-187, 41-187 или 40-205 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 130.
120. Способ по п. 117, где носитель состоит из аминокислотных остатков 1-151, 1-

187, 41-187 или 40-205 последовательности, указанной в SEQ ID NOs: 1-2.

121. Способ по п. 117, где носитель состоит из любой из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NOs: 136-139.

122. Способ по п.111-120, где носитель не ковалентно связан с гетерологичной полезной нагрузкой через наночастицу.

123. Способ по п. 121, где отношение гетерологичной полезной нагрузки к носителю на наночастице составляет, по меньшей мере, 15000:1.

124. Способ по любому из пп. 121-122, где гетерологичной полезной нагрузкой является агент, снижающий глюкозу.

125. Способ по п. 123, где агент, снижающий глюкозу, не ковалентно ассоциирован с наночастицей.

126. Способ по любому из пп. 121-122, где гетерологичной полезной нагрузкой является миРНК.

127. Способ по п. 125, где миРНК не ковалентно ассоциирована с наночастицей.

128. Способ по любому из пп. 121-126, где носитель ковалентно связан с наночастицей или высушен распылением на наночастице.

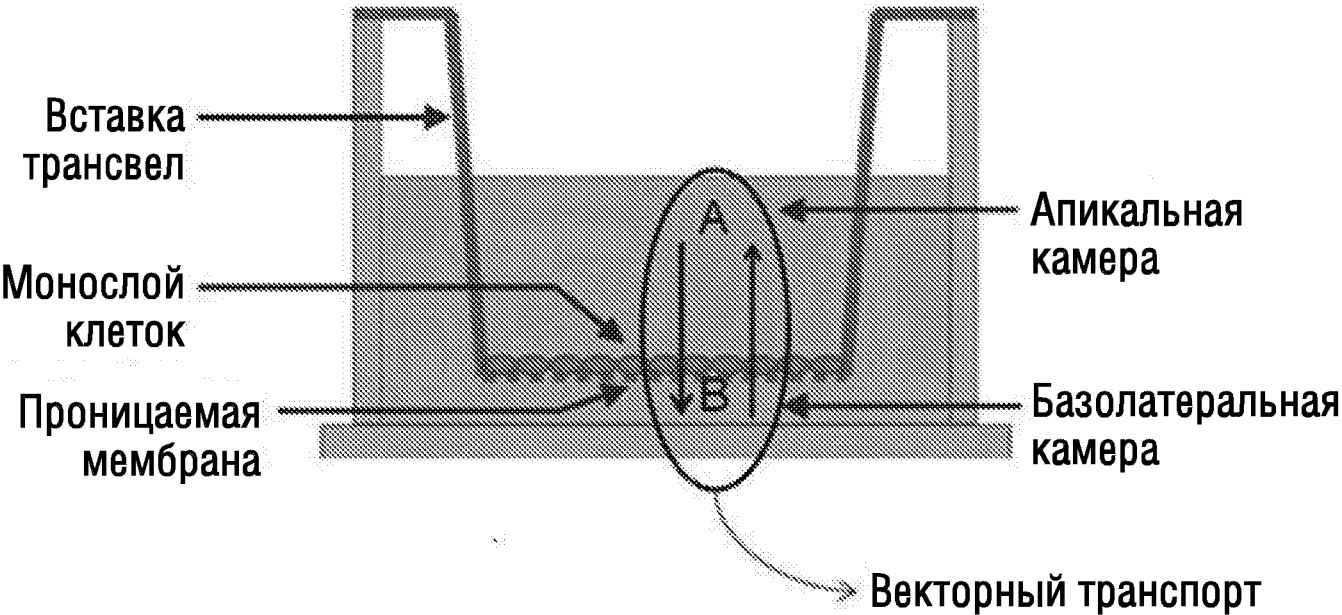
129. Способ, включающий транспорт гетерологичной полезной нагрузки в поляризованную эпителиальную клетку, включающий:

(a) контакт апикальной мембраны поляризованной эпителиальной клетки с комплексом носитель-полезная нагрузка; и

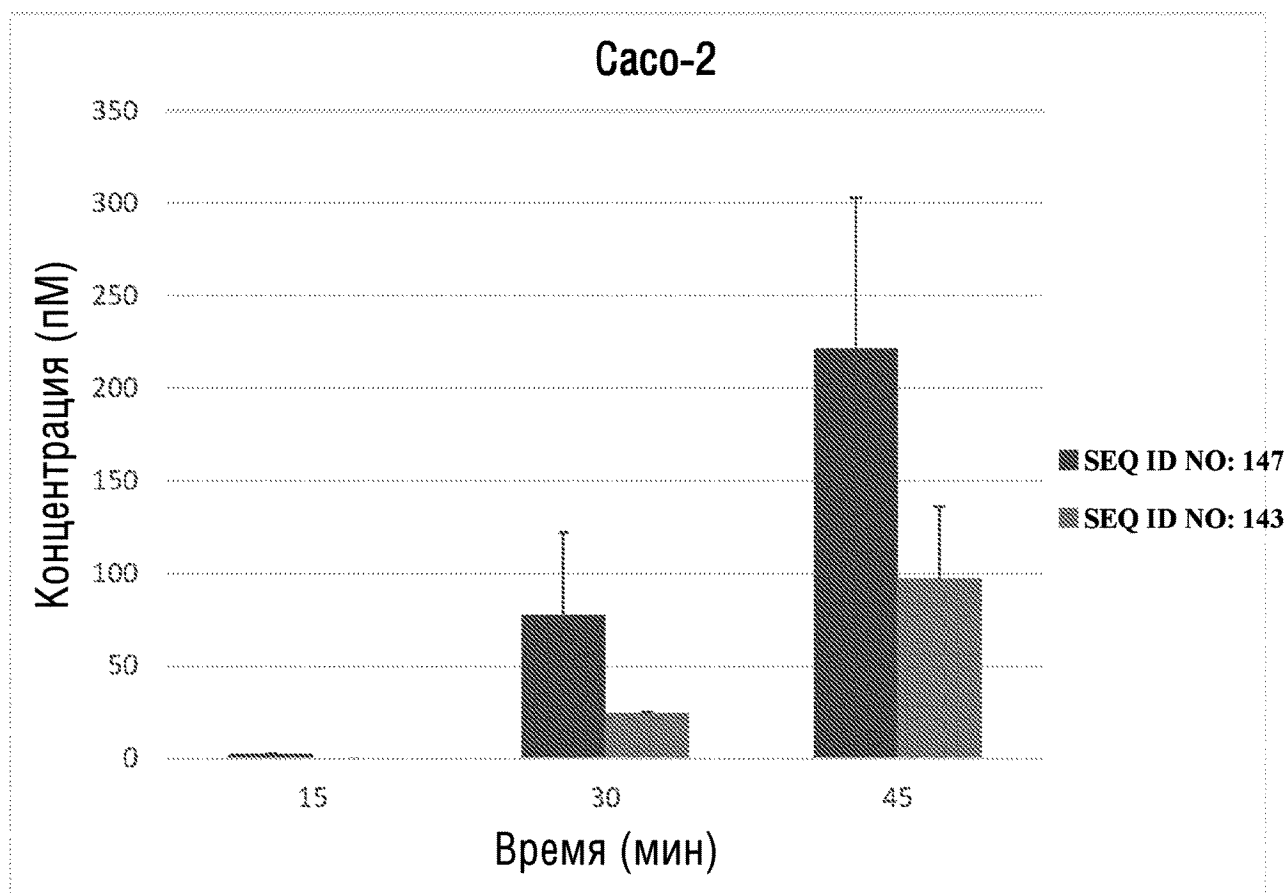
(b) транспорт комплекса носитель-полезная нагрузка в поляризованную эпителиальную клетку,

где комплексом носитель-полезная нагрузка является комплекс носитель-полезная нагрузка по любому из пп. 17-31.

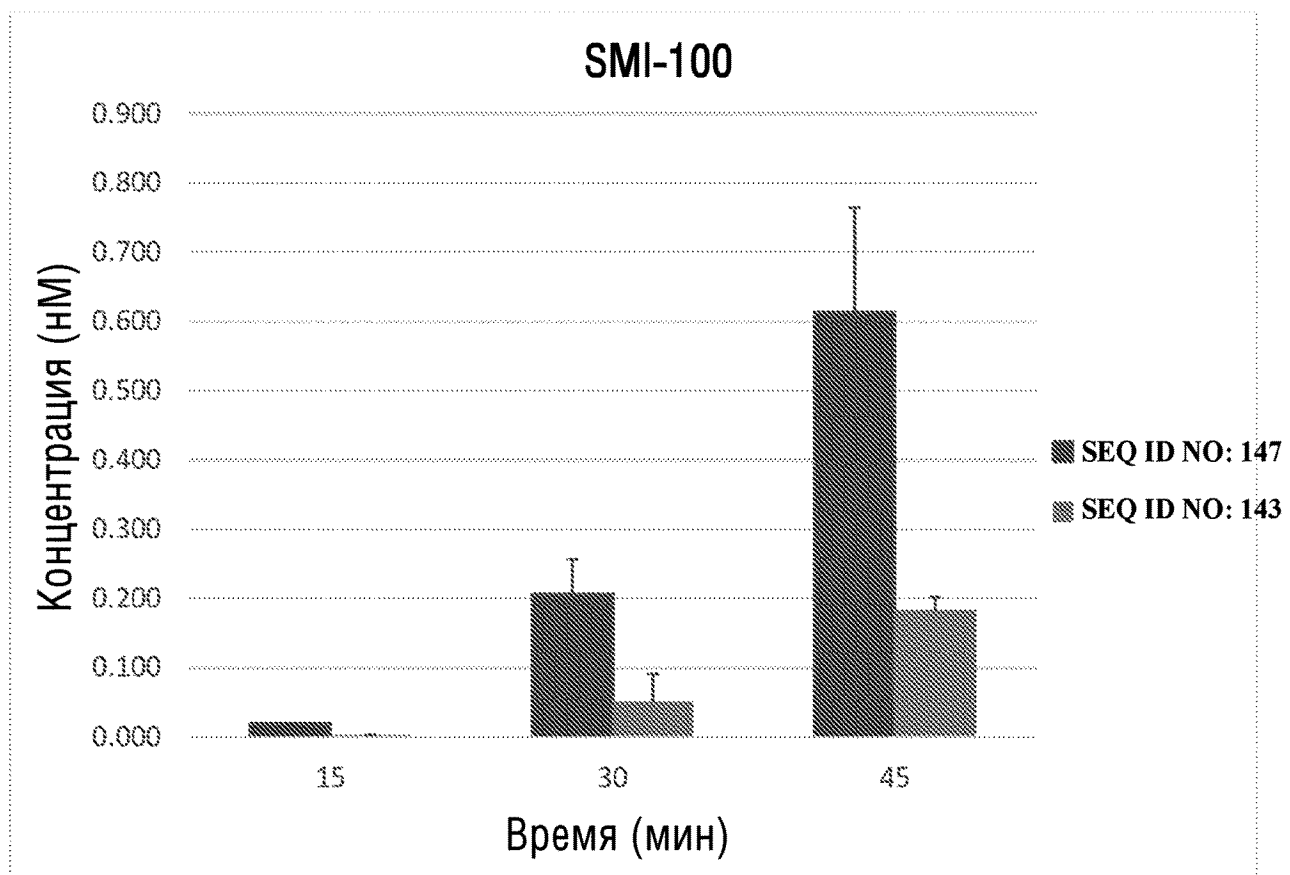
ФИГ.1



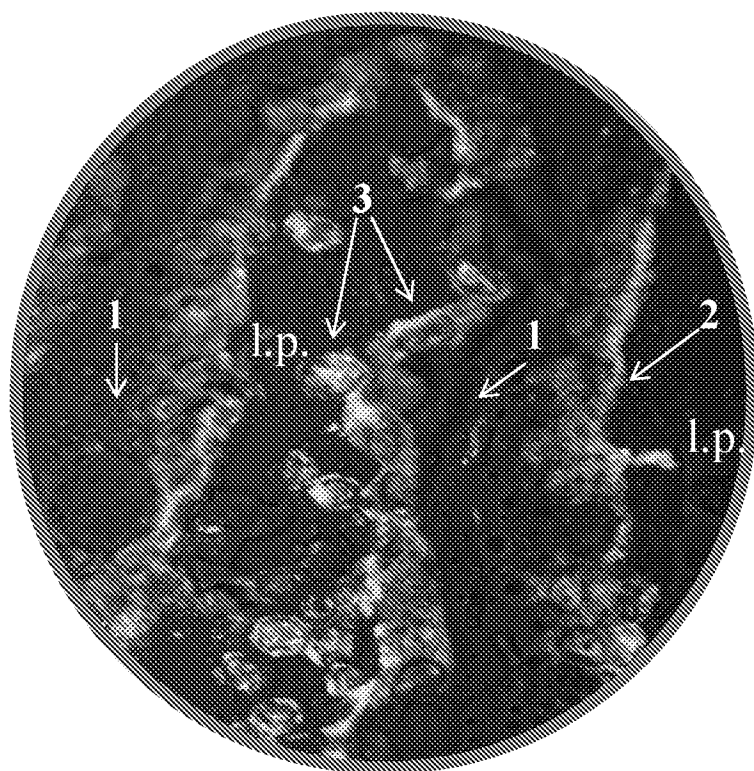
ФИГ.2



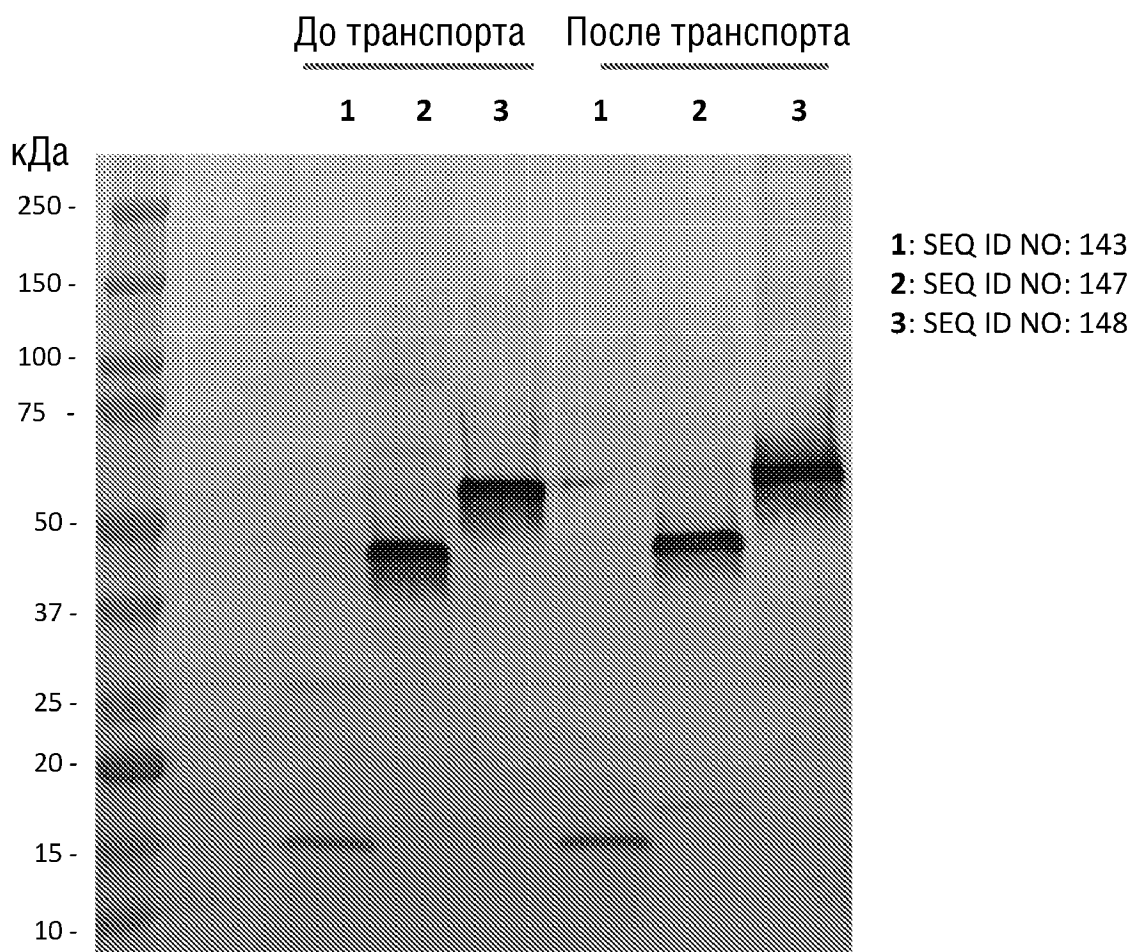
ФИГ.3



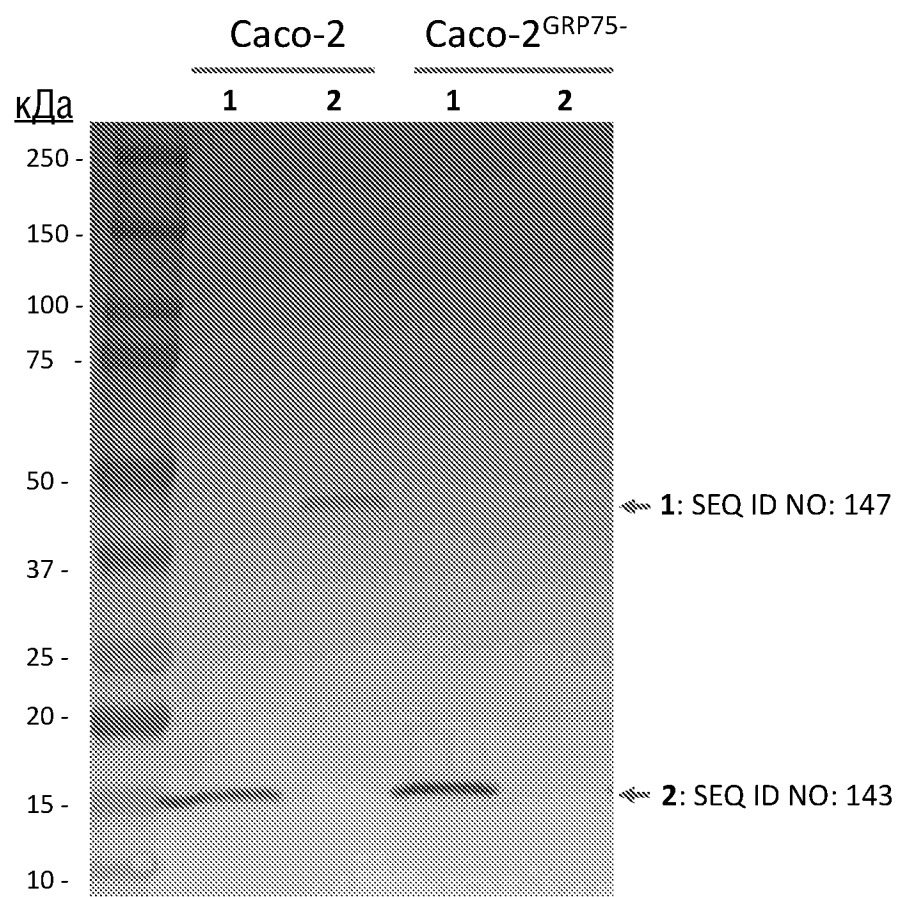
ФИГ.4



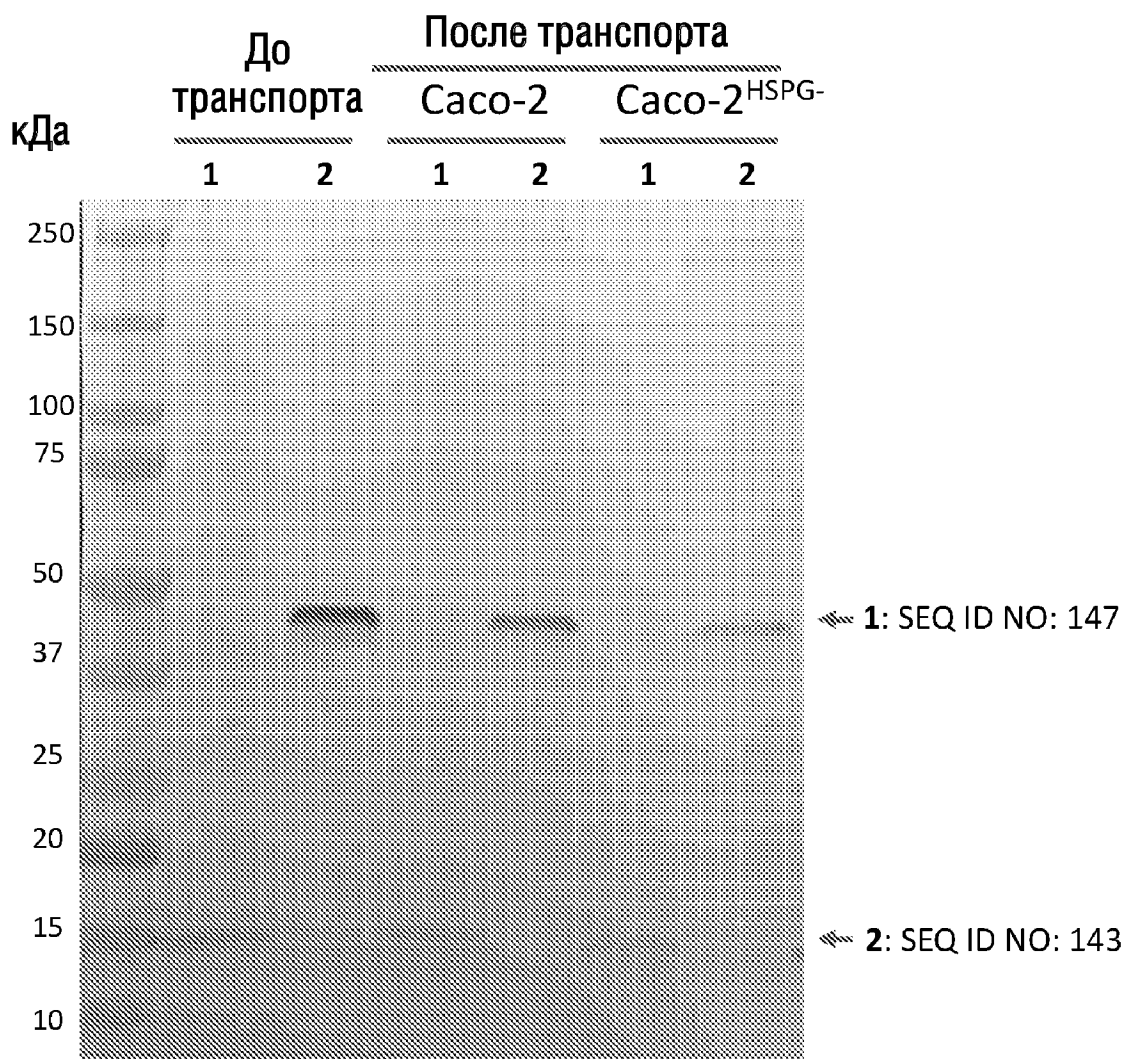
ФИГ.5



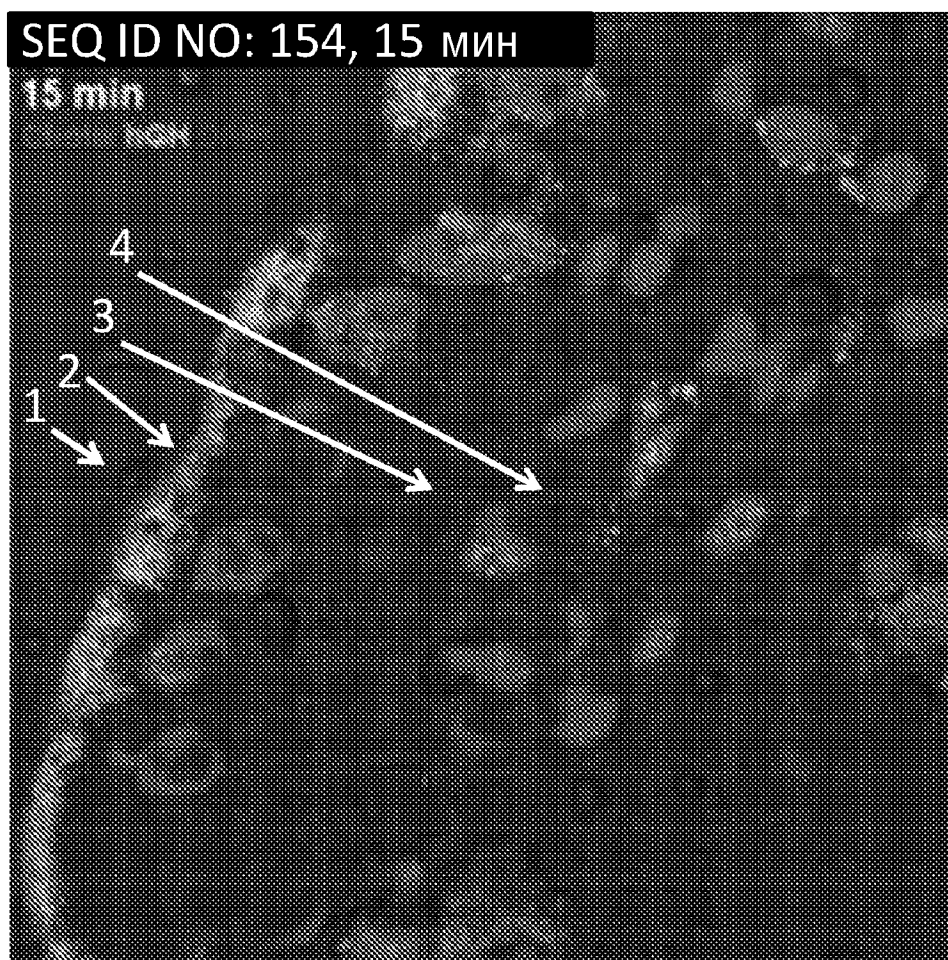
ФИГ.6



ФИГ.7



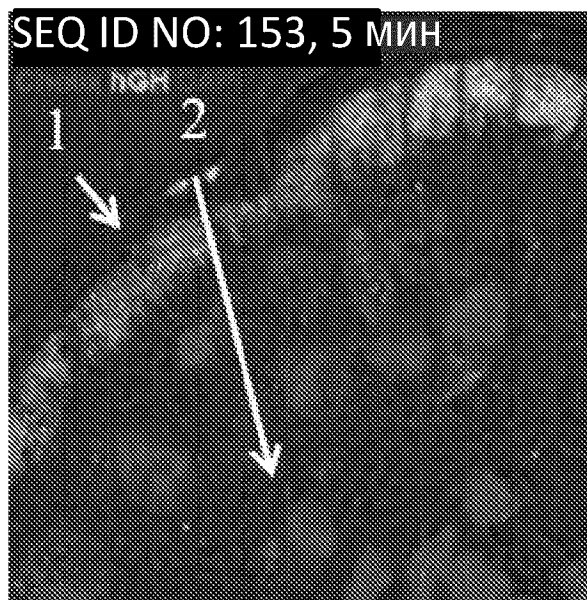
ФИГ.8



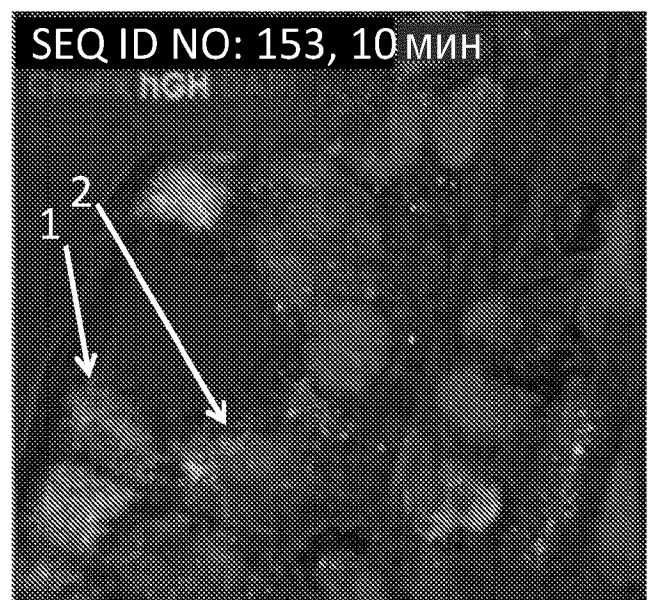
ФИГ.9



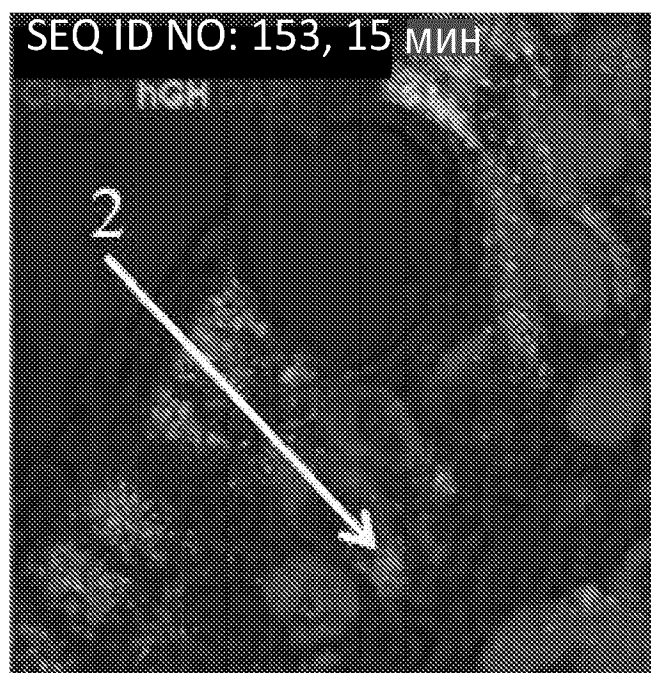
ФИГ.10А



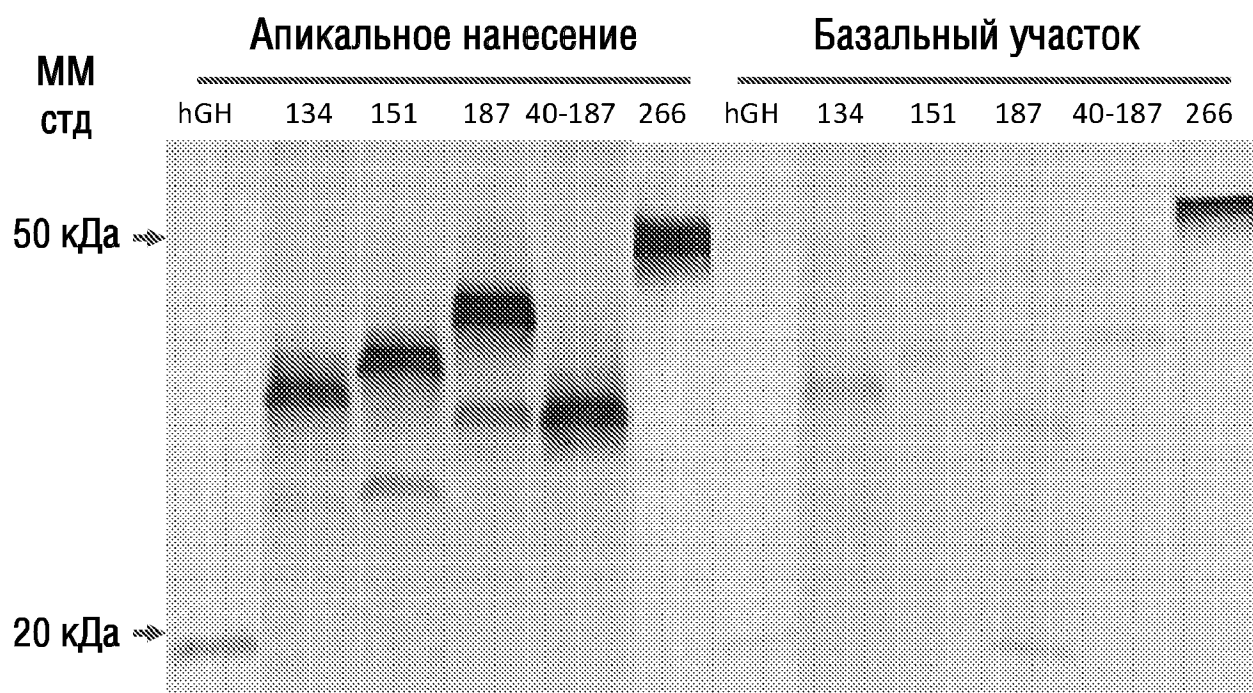
ФИГ.10В



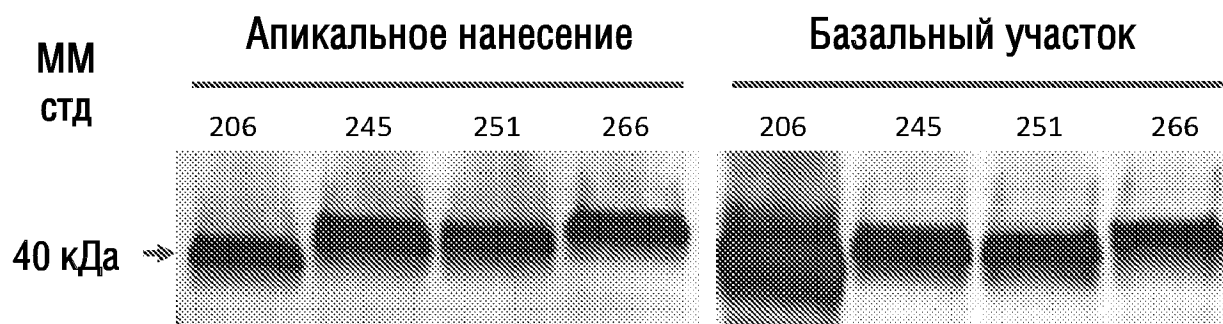
ФИГ.10С



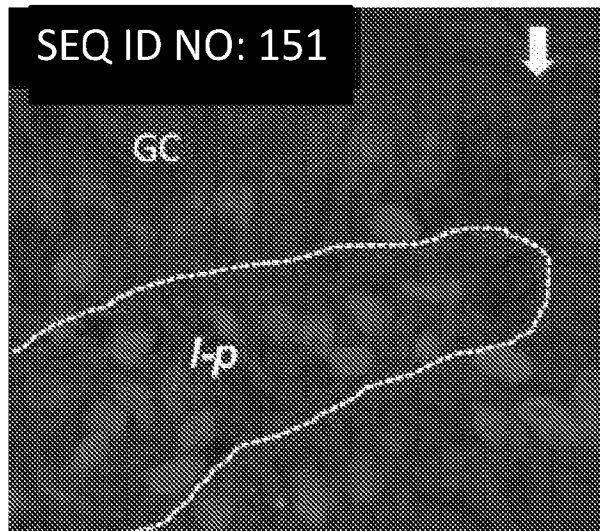
ФИГ.11А



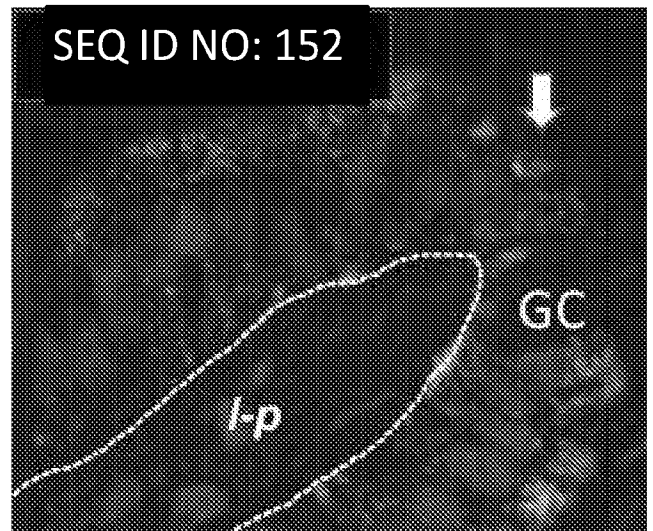
ФИГ.11В



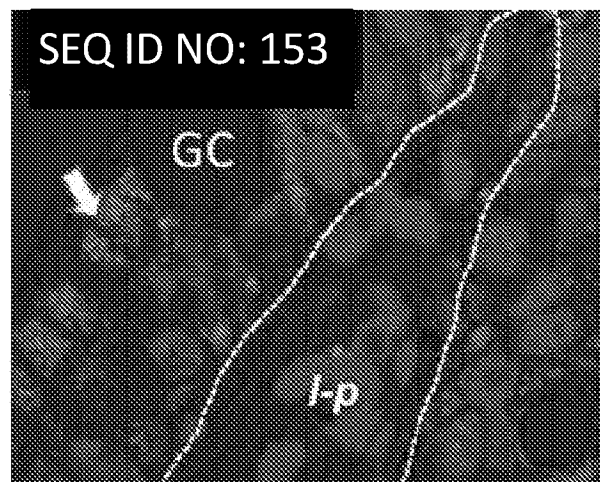
ФИГ.12А



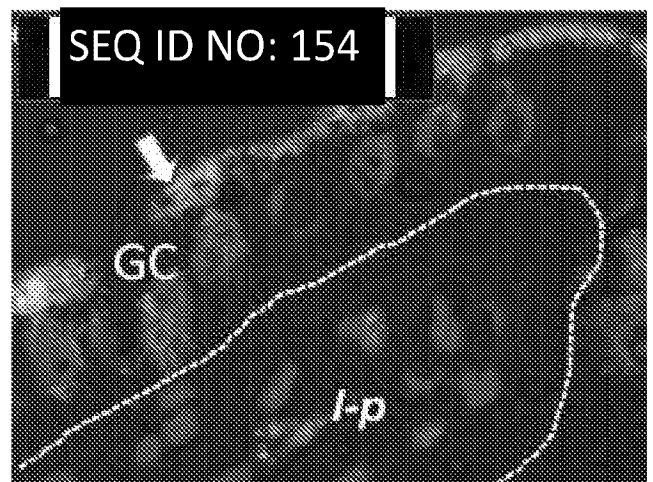
ФИГ.12В



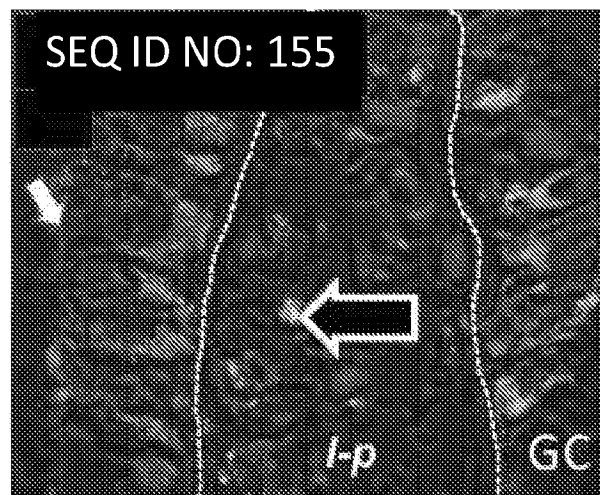
ФИГ.12С



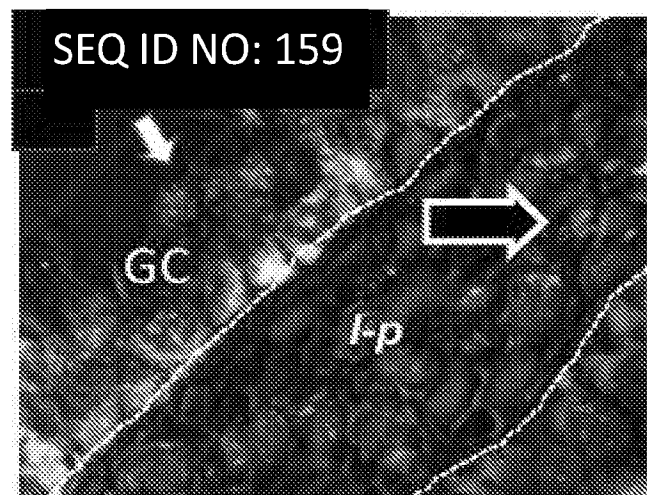
ФИГ.12D



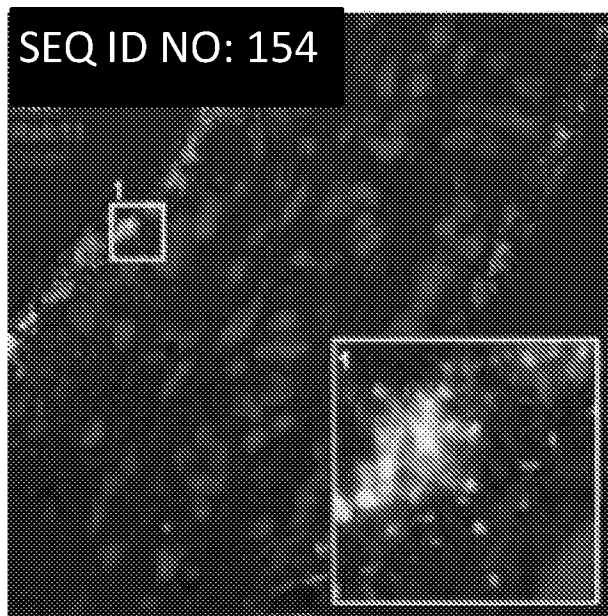
ФИГ.12Е



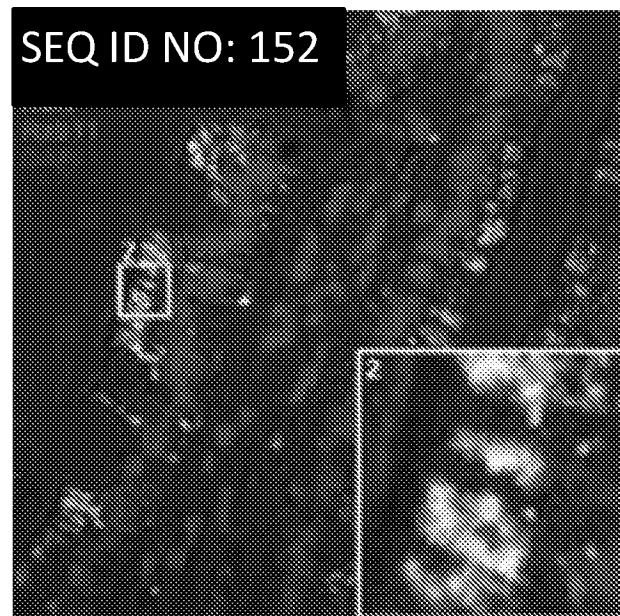
ФИГ.12F



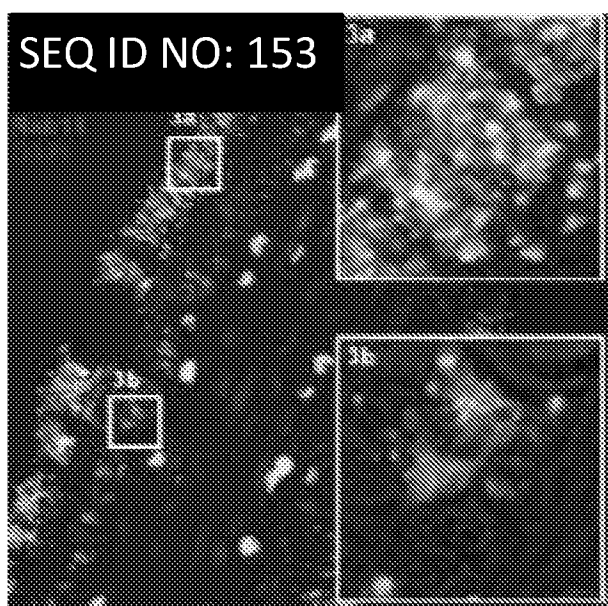
ФИГ.13А



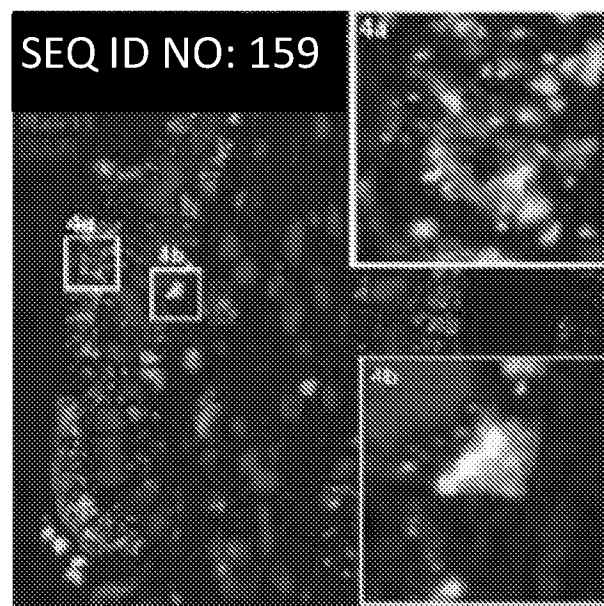
ФИГ.13В



ФИГ.13С



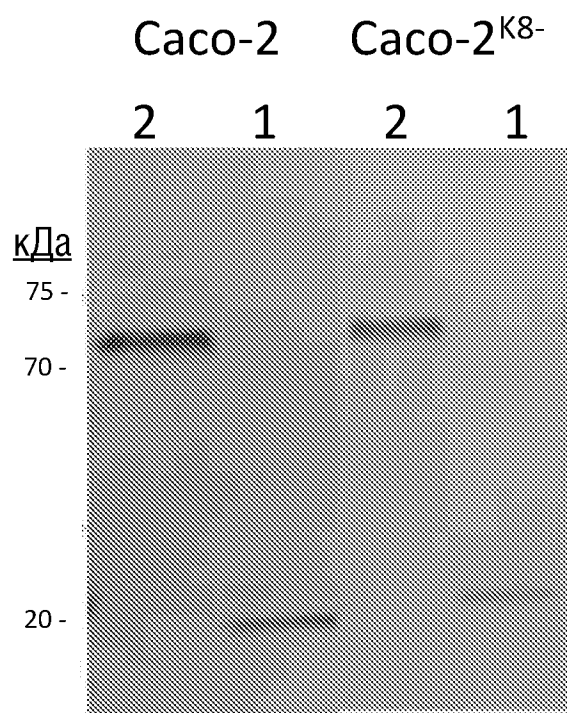
ФИГ.13D



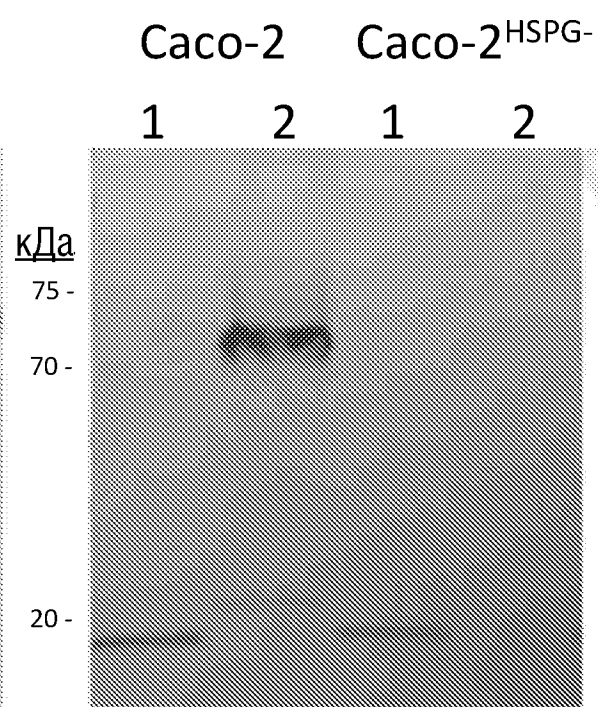
ФИГ.14А

1: SEQ ID NO: 190

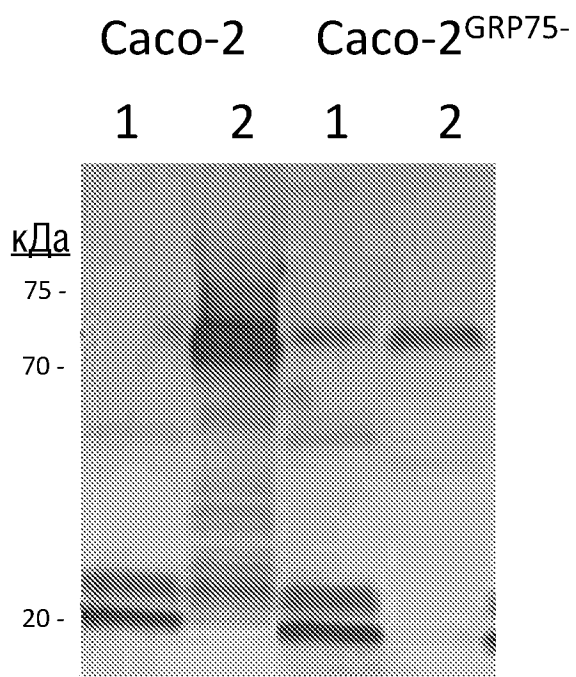
2: SEQ ID NO: 150



ФИГ.14В

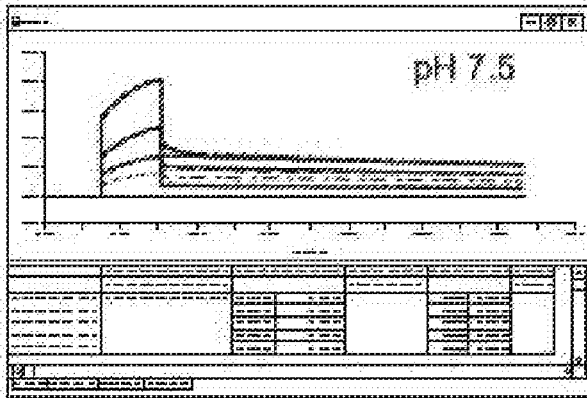
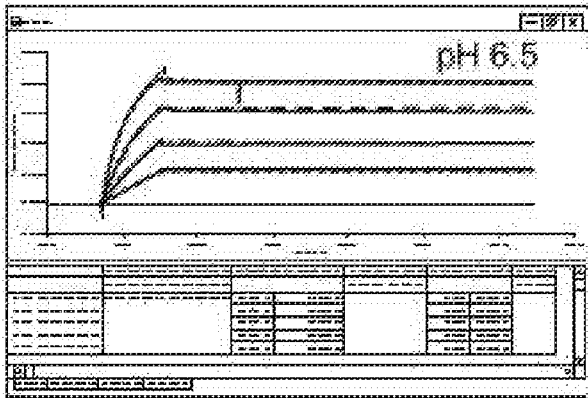
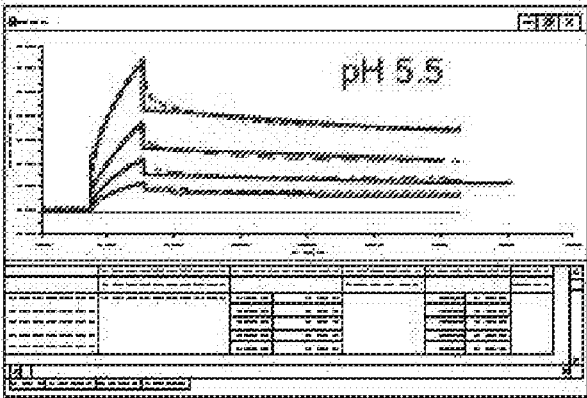


ФИГ.14С

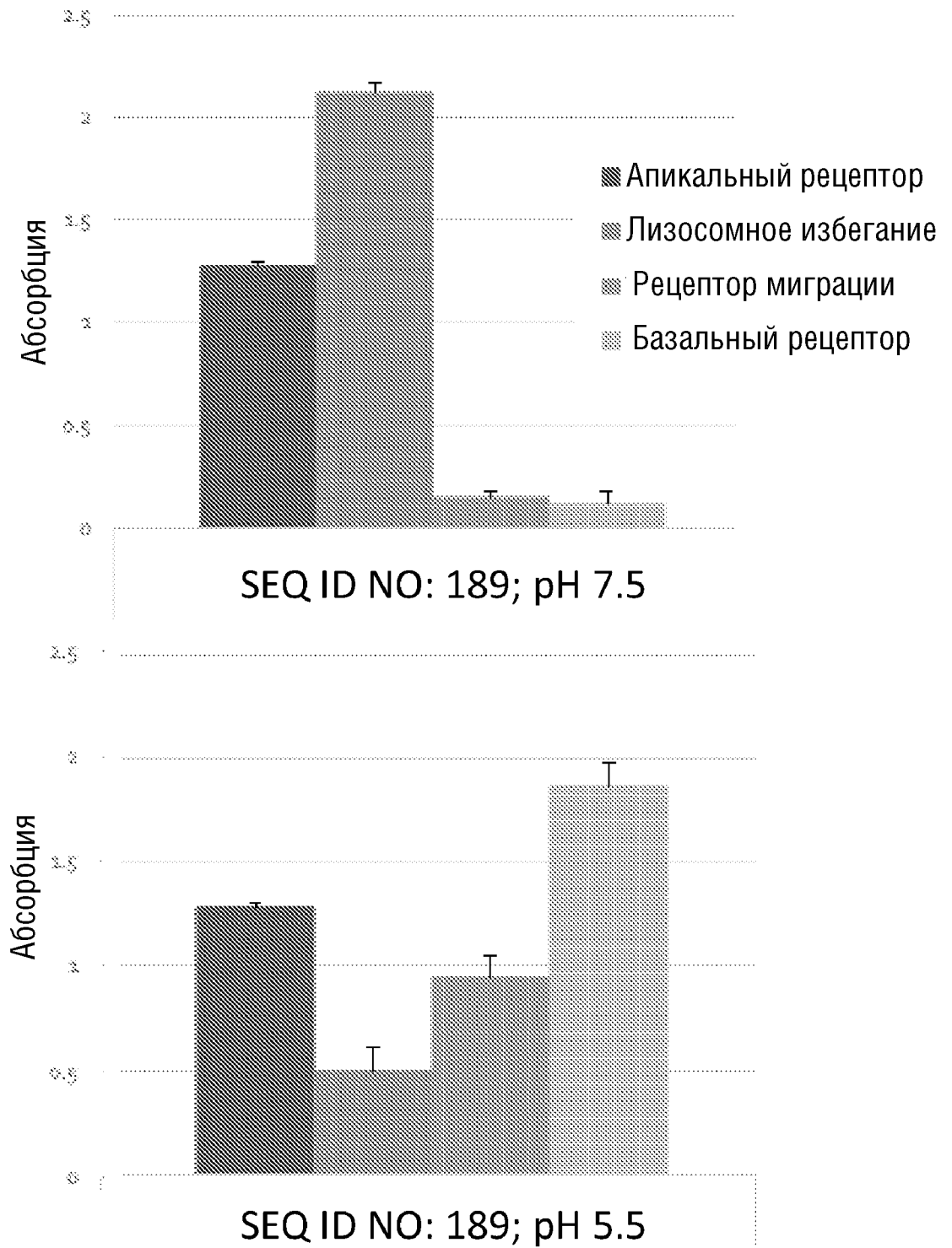


ФИГ.15А

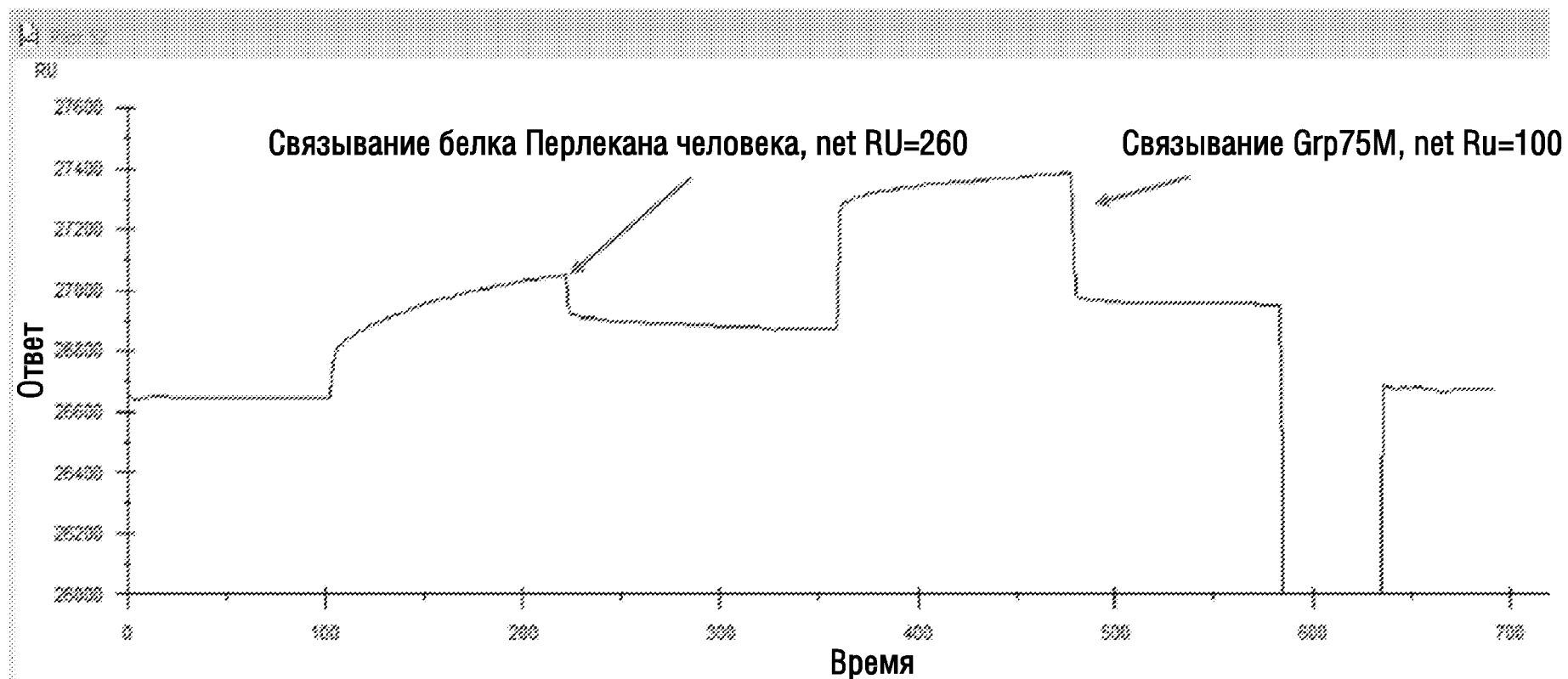
| Тестируемый белок | Покрытый белок | Тестируемый буфер | ka (1/Mc) | ka (1/c) | kd (1/c) | Аффинность |
|-------------------|----------------|-------------------|-----------|----------|----------|------------|
| Grp75             | Chx-Biotin     | 1xTBS,pH5.5       | 1.64E+04  | 2.68E-04 | 1.63E-08 | 16.3 нМ    |
| Grp75             | Chx-Biotin     | 1xTBS,pH6.5       | 3.77E+04  | 2.33E-05 | 6.17E-10 | 0.617 нМ   |
| Grp75             | Chx-Biotin     | 1xTBS,pH7.5       | 2.87E+04  | 3.53E-04 | 1.23E-08 | 12.3 нМ    |



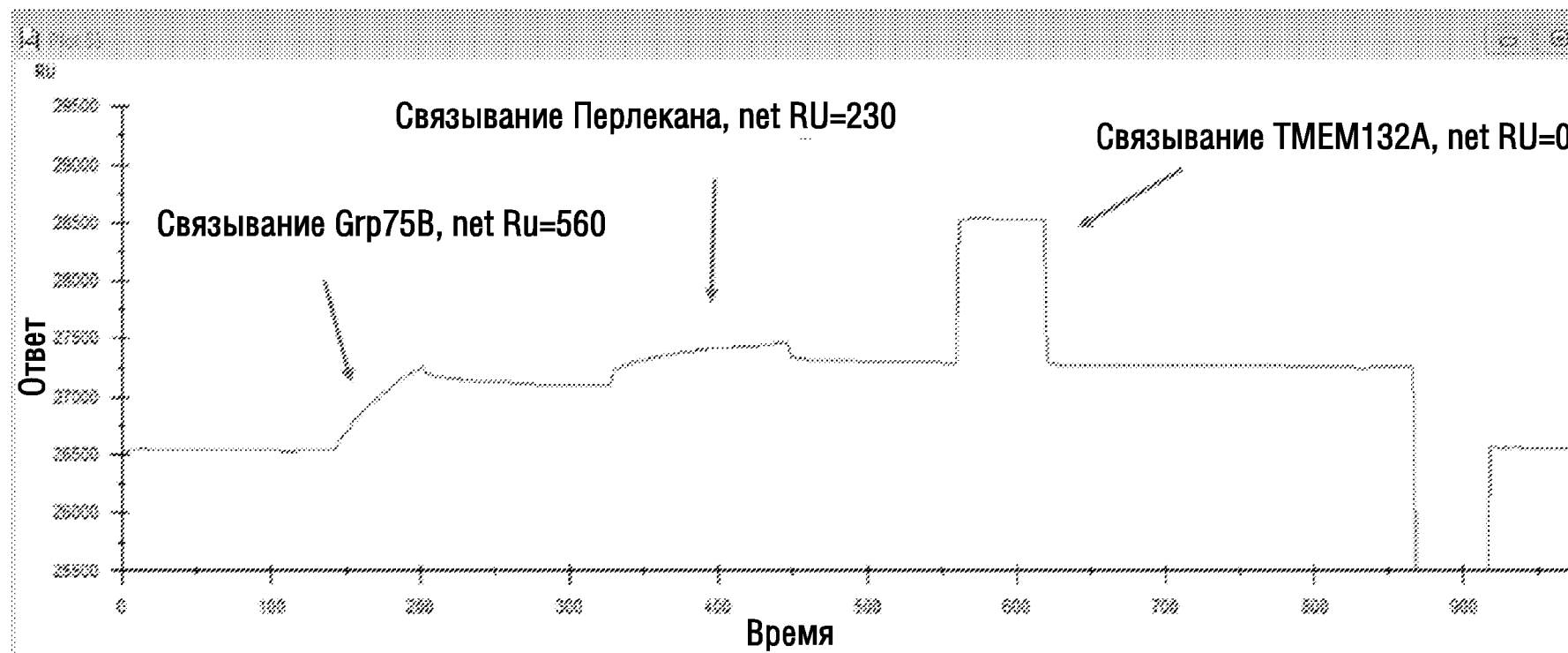
ФИГ.15В



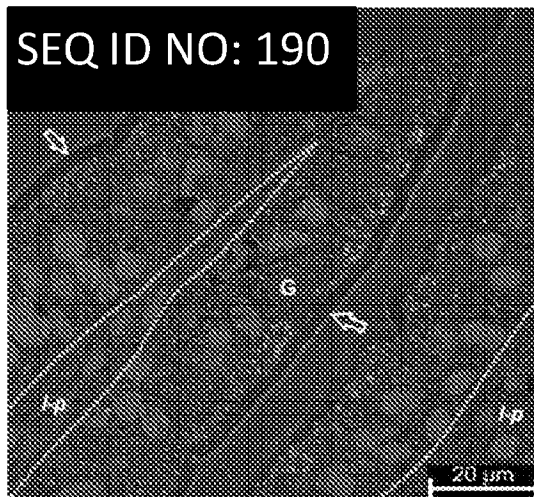
ФИГ.16



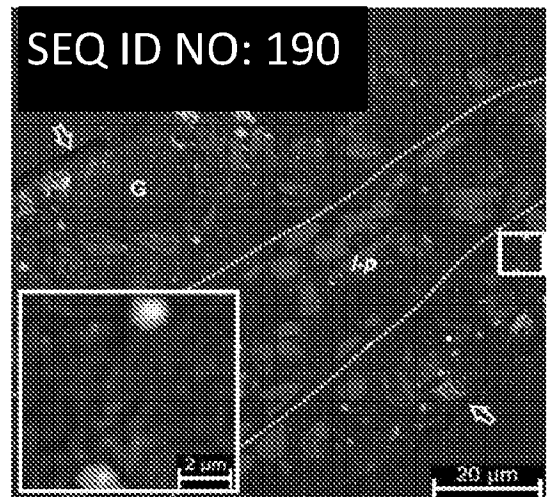
ФИГ.17



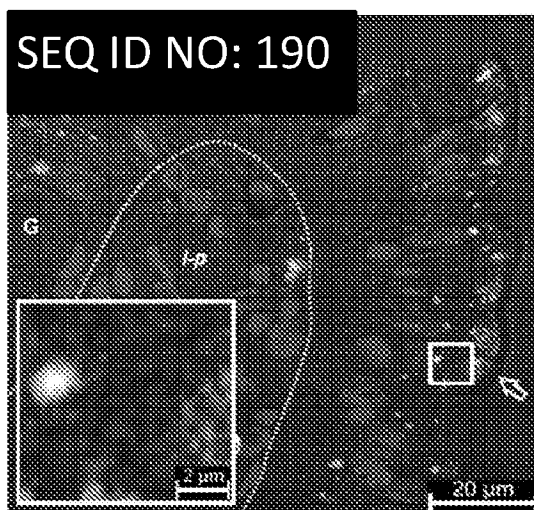
ФИГ.18А



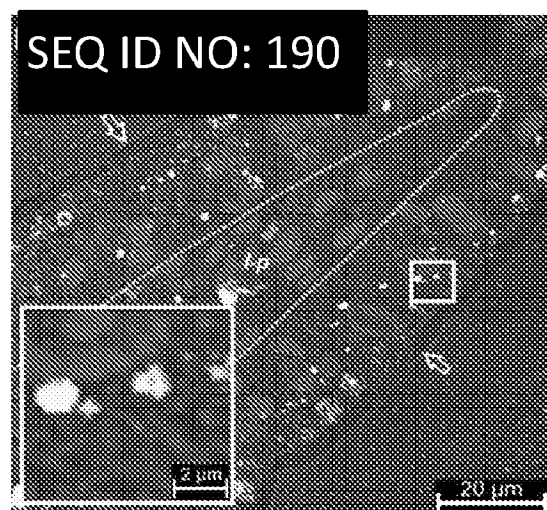
ФИГ.18В



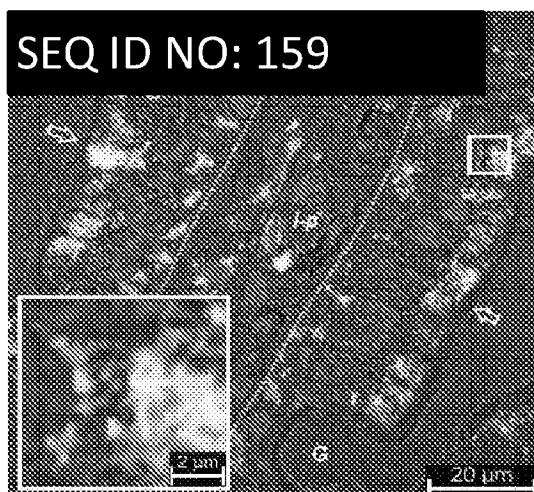
ФИГ.18С



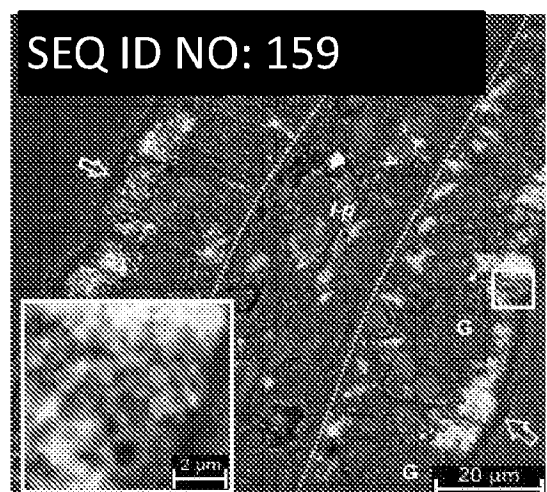
ФИГ.18D



ФИГ.18Е



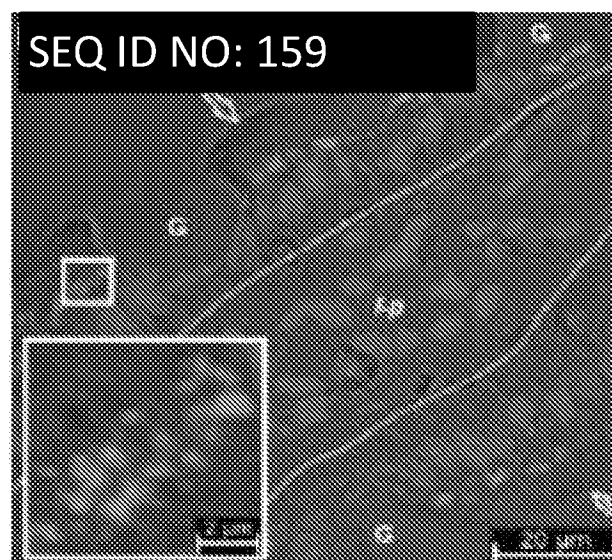
ФИГ.18F



ФИГ.19А



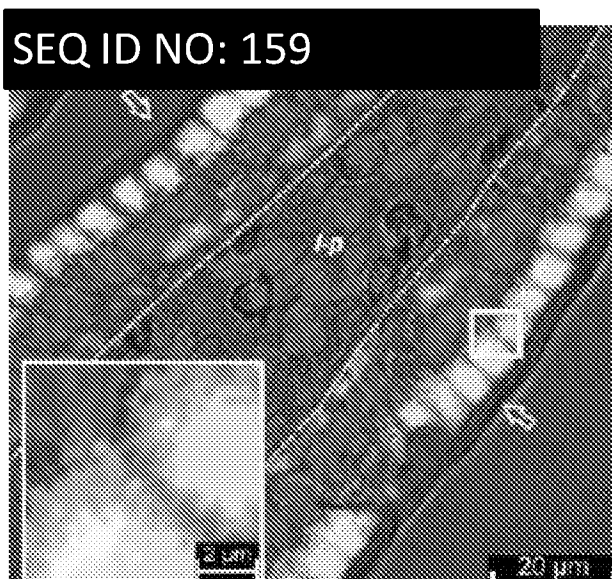
ФИГ.19В



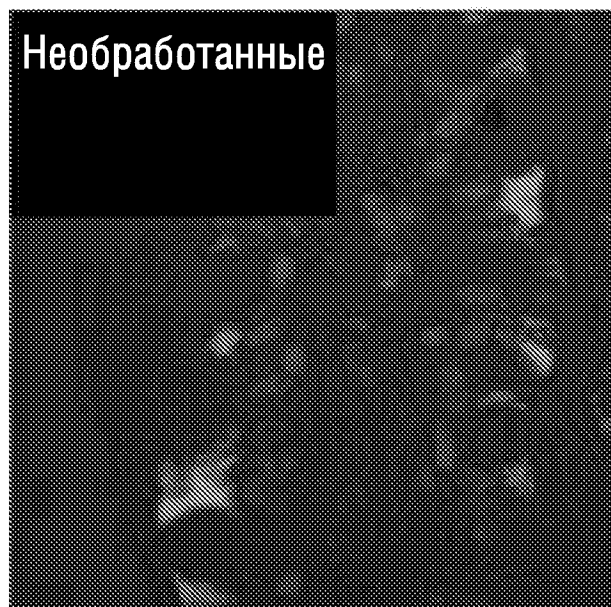
ФИГ.19С



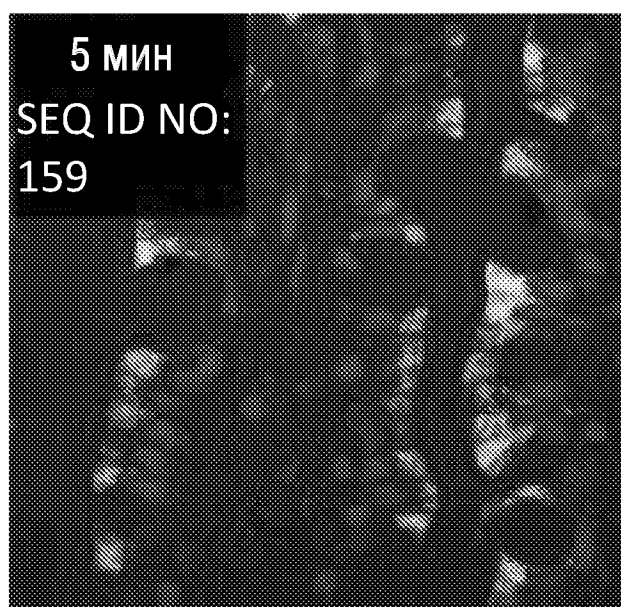
ФИГ.19D



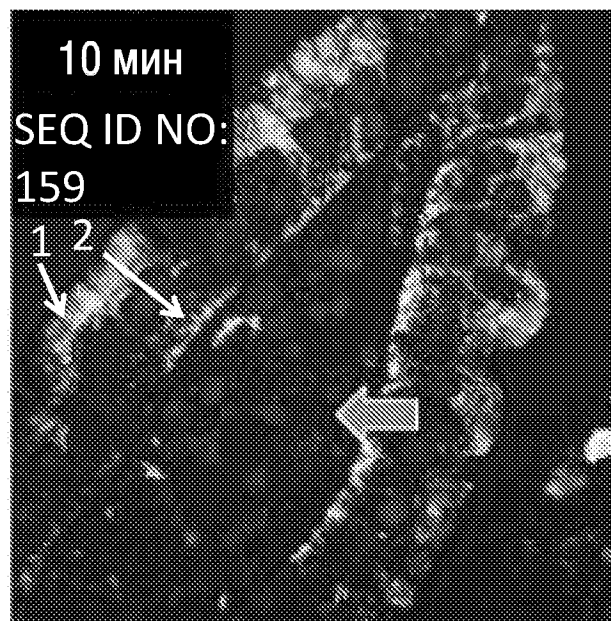
ФИГ.19Е



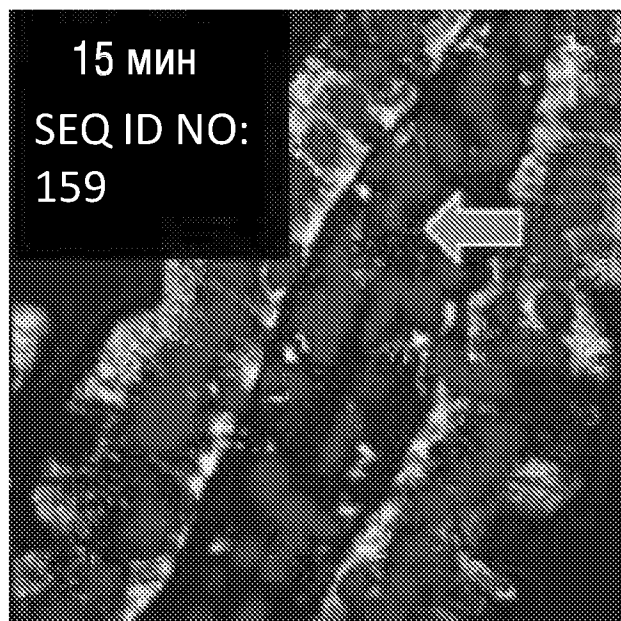
ФИГ.19F



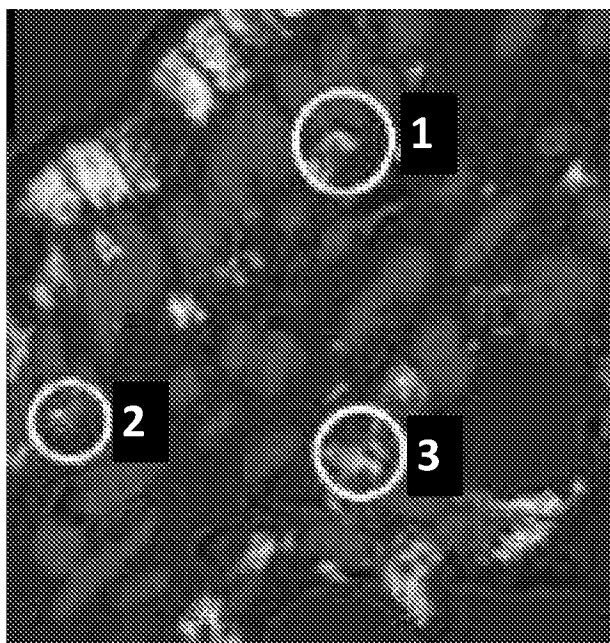
ФИГ.19G



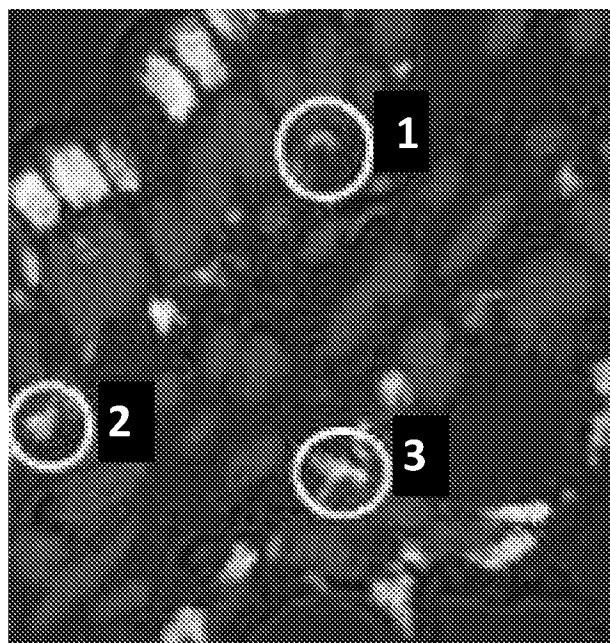
ФИГ.19H



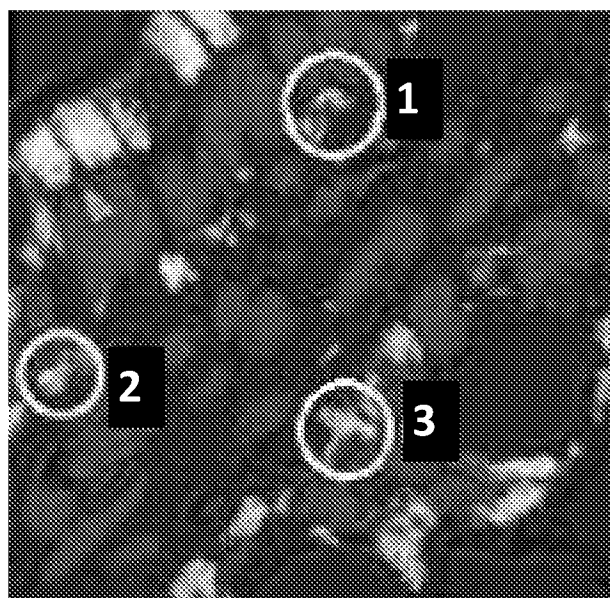
ФИГ.19I



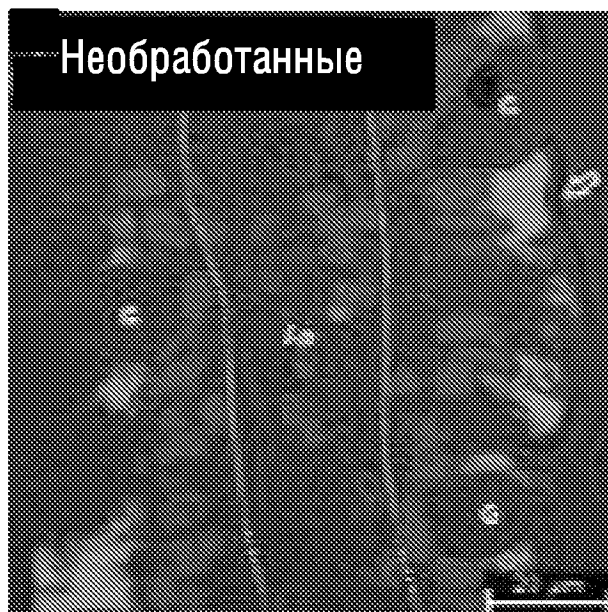
ФИГ.19J



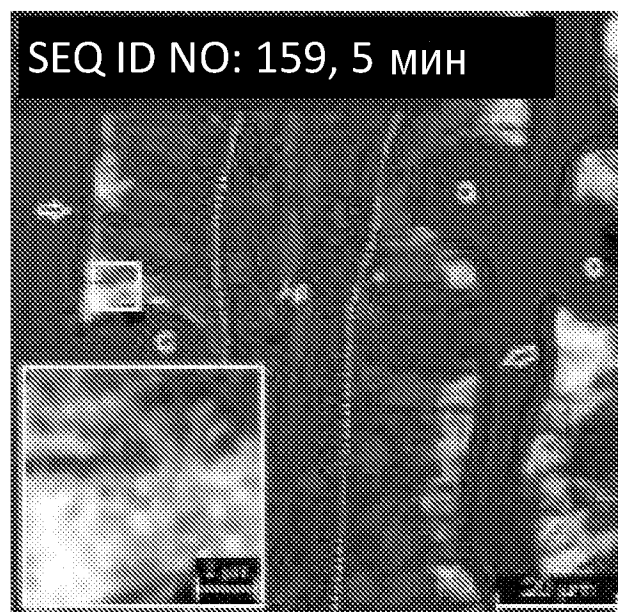
ФИГ.19K



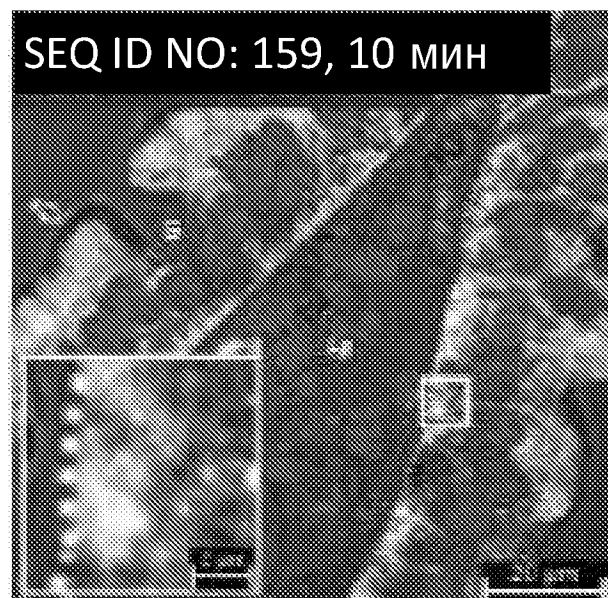
ФИГ.20А



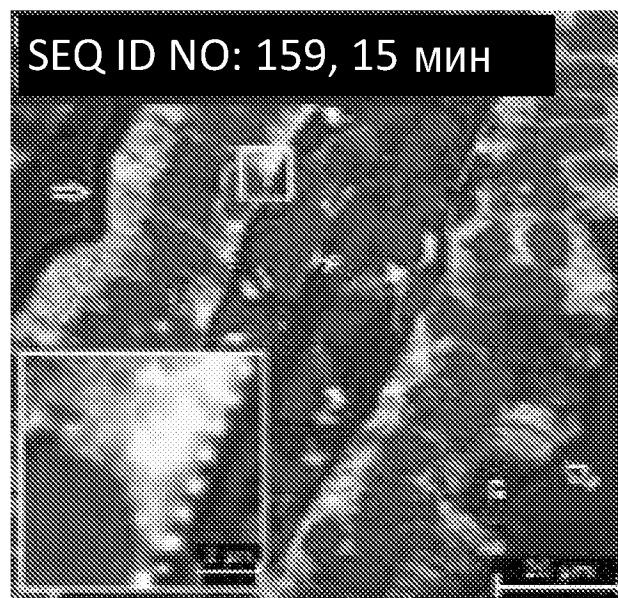
ФИГ.20В



ФИГ.20С



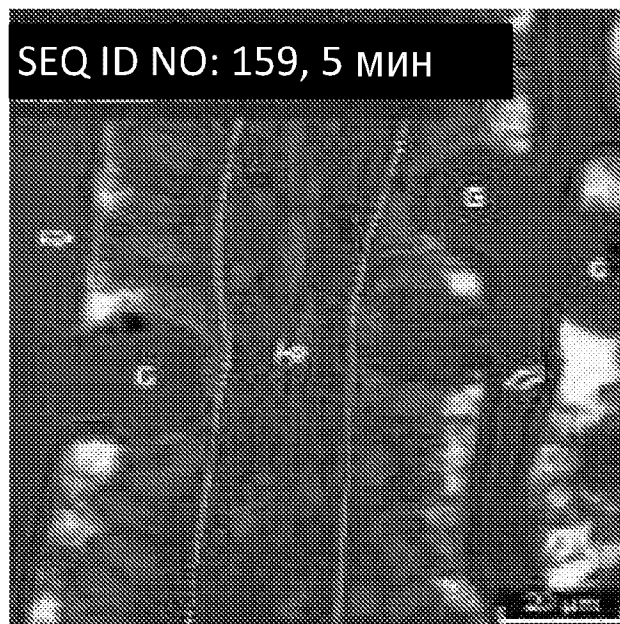
ФИГ.20D



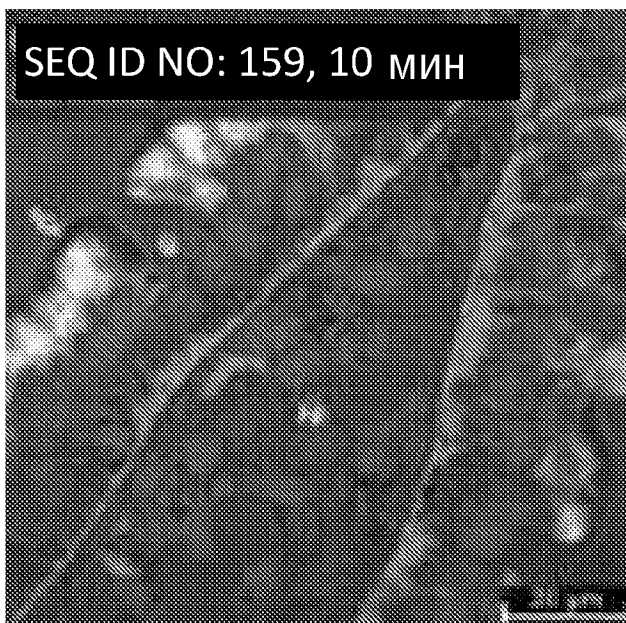
ФИГ.20Е



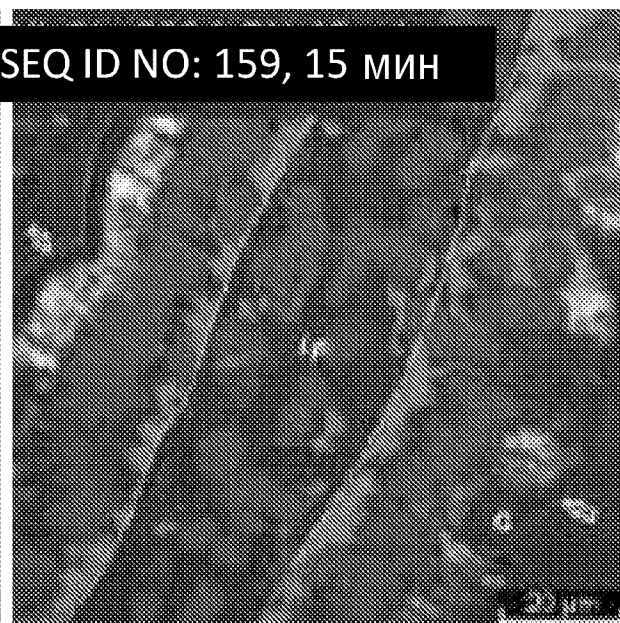
ФИГ.20F



ФИГ.20G



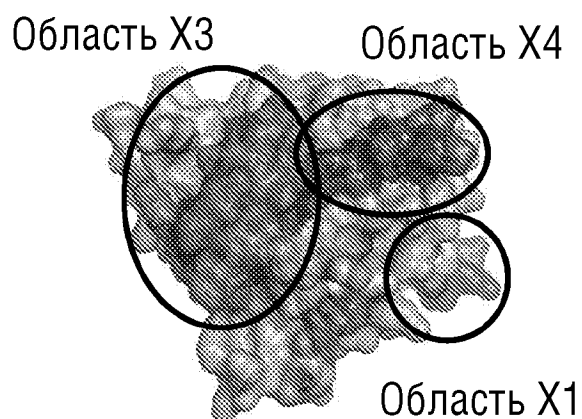
ФИГ.20H



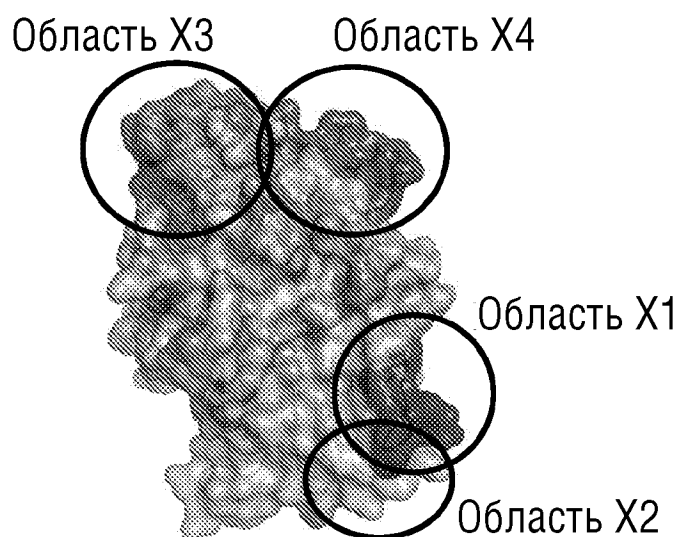
## ФИГ.21А

MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDED  
 KGESIITIGEFATVRATRHYVNDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVP  
 GEDSPASIKISVDEL**DQQRN**IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSV**TRPEHNI**AI  
 WPSVSYKAAQKEGSRHKFWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETV  
 AGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSK (SEQ ID NO: 178)

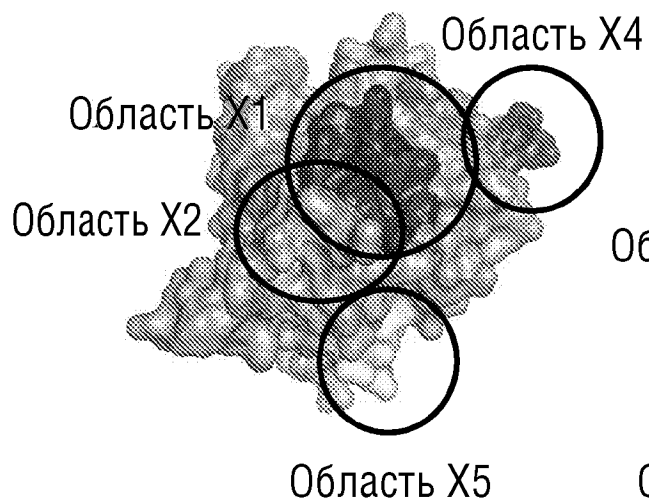
## ФИГ.21А



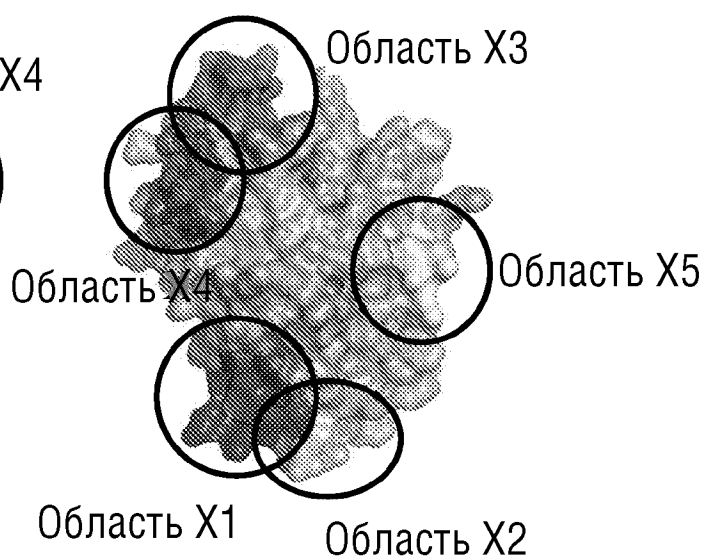
## ФИГ.21В



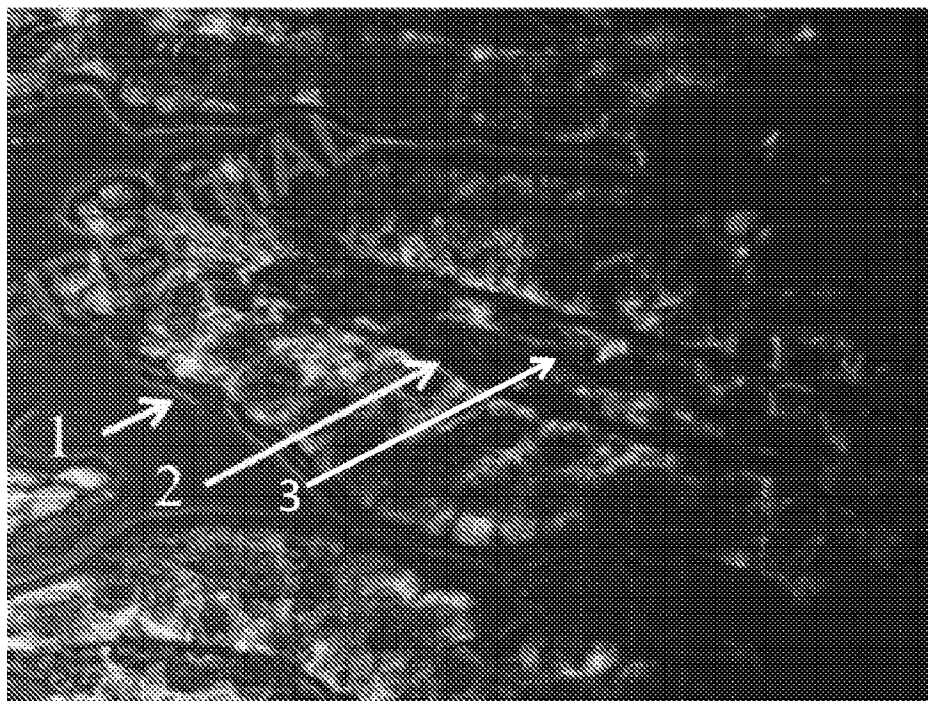
## ФИГ.21D



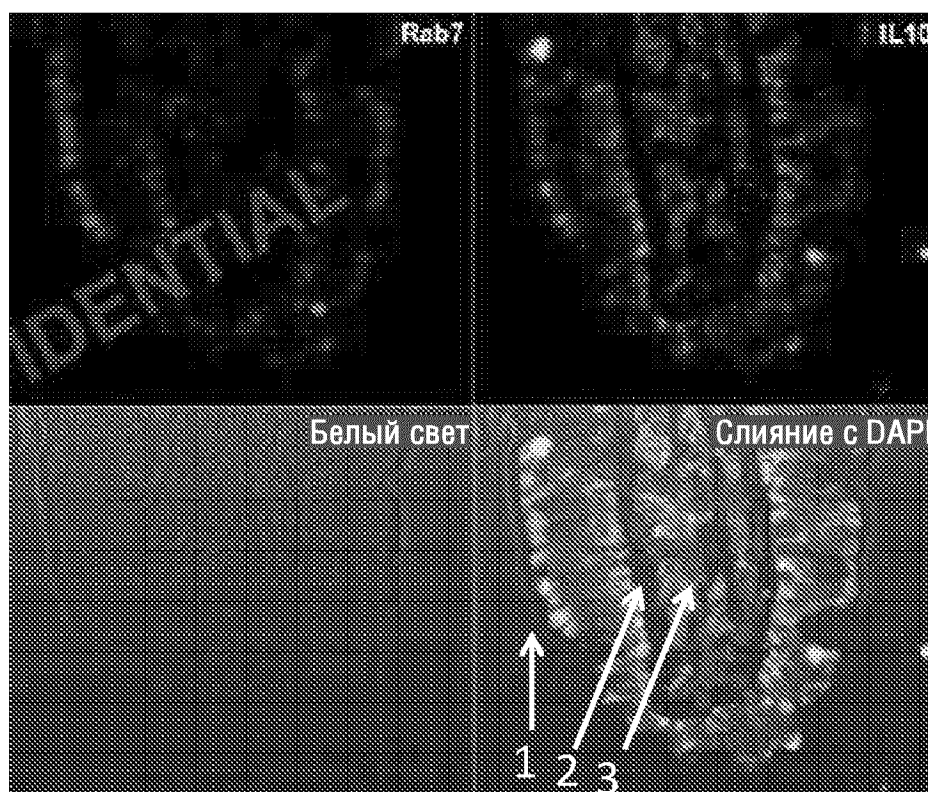
## ФИГ.21Е



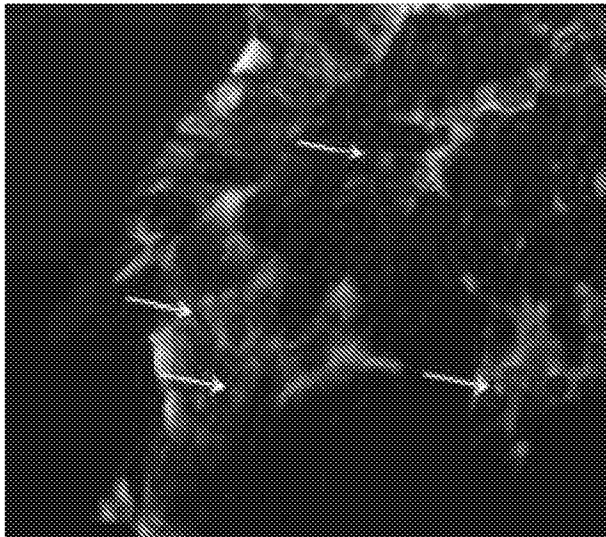
ФИГ.22А



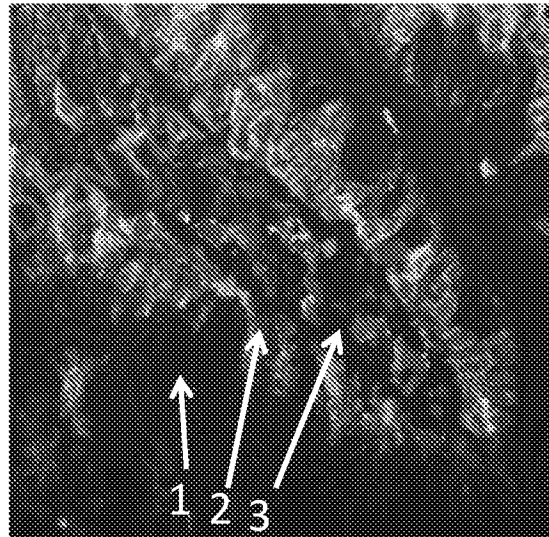
ФИГ.22В



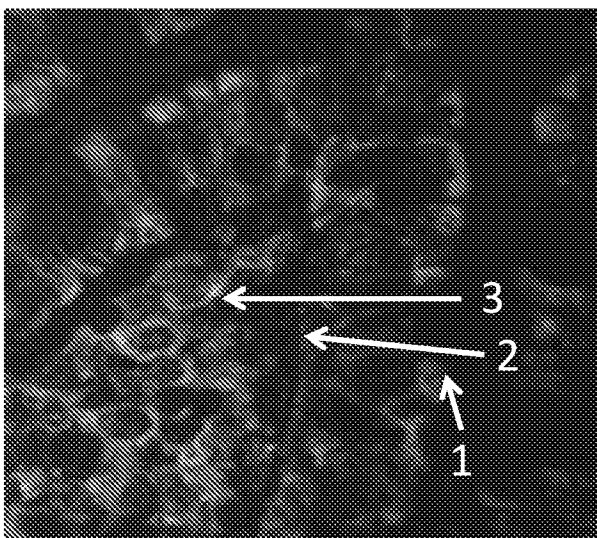
ФИГ.22С



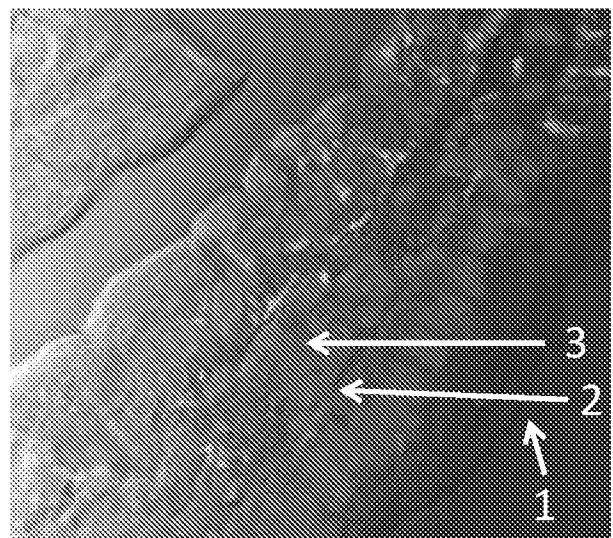
ФИГ.22D



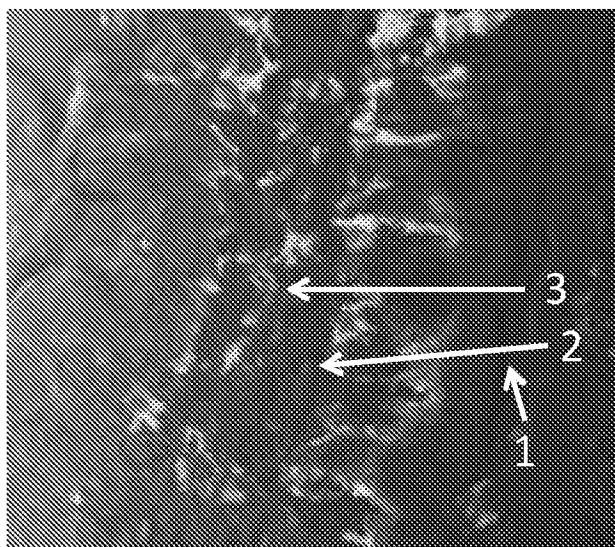
ФИГ.22Е



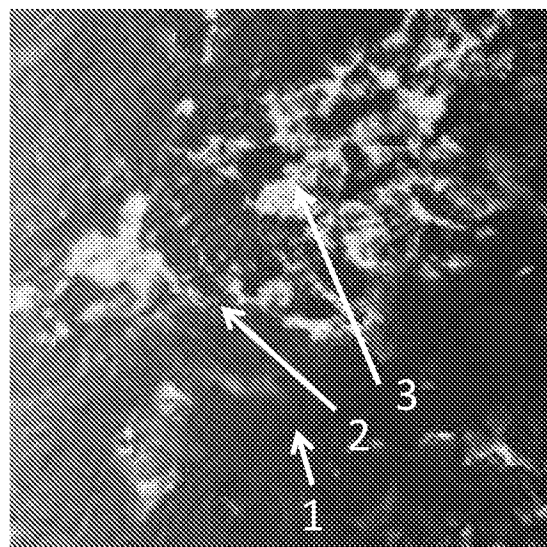
ФИГ.22F



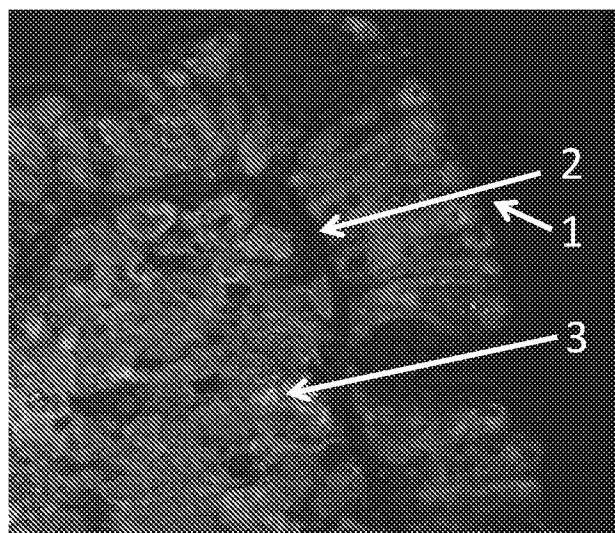
ФИГ.22Г



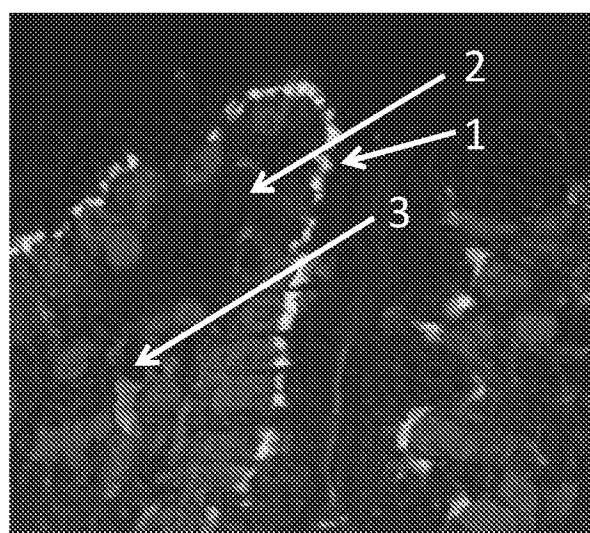
ФИГ.22Н



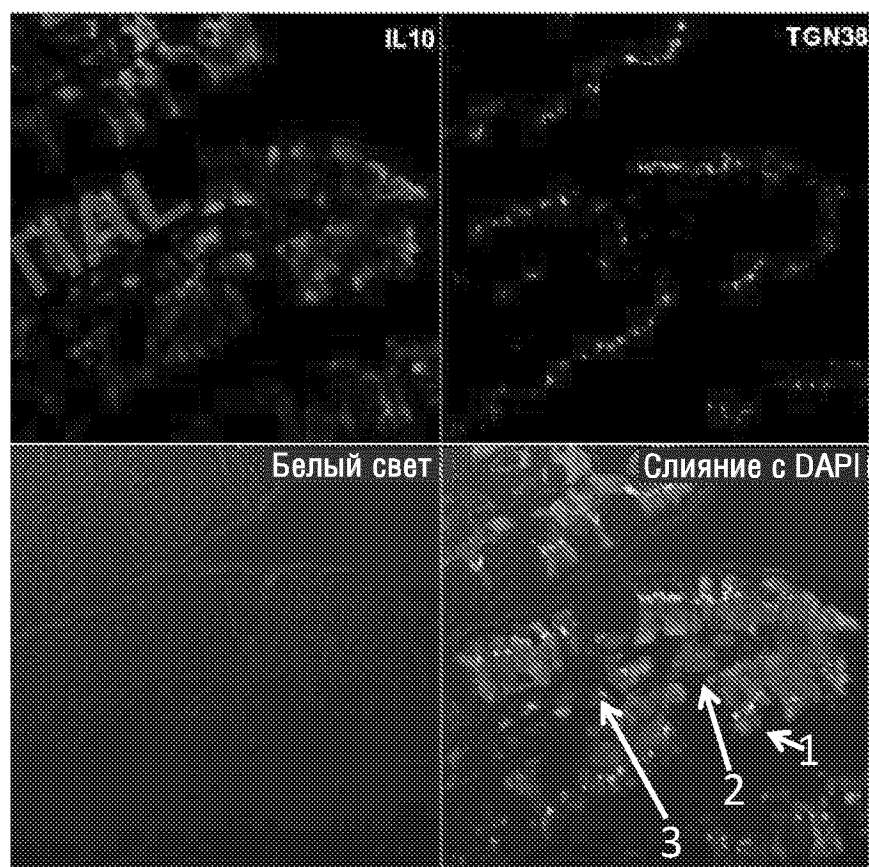
ФИГ.22И



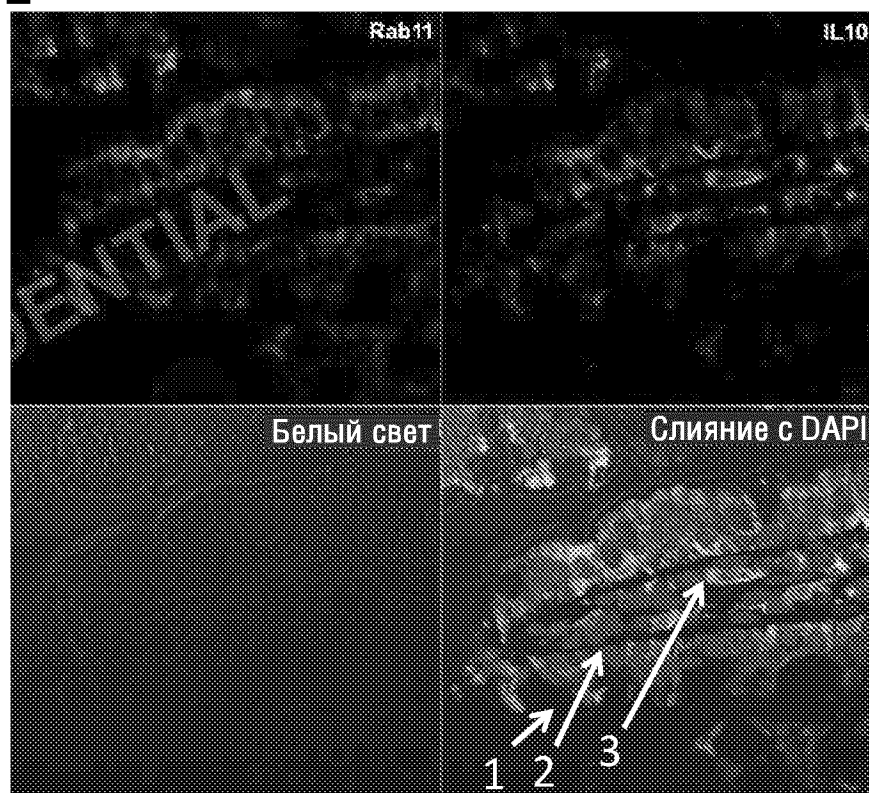
ФИГ.22J



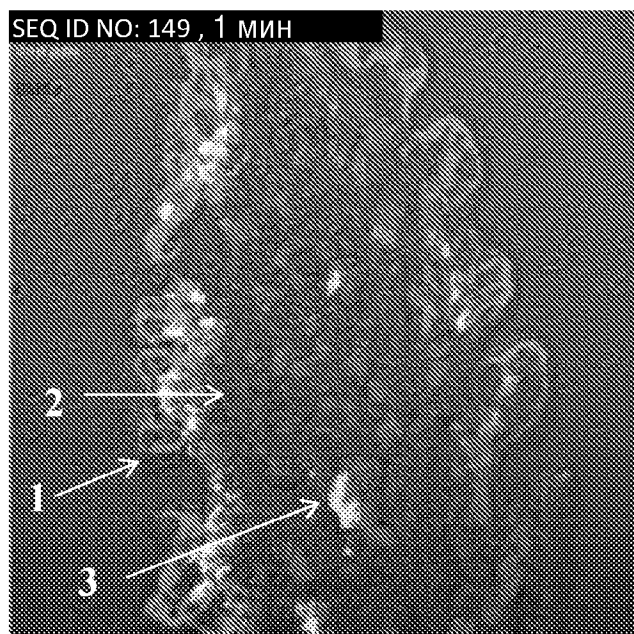
ФИГ.22K



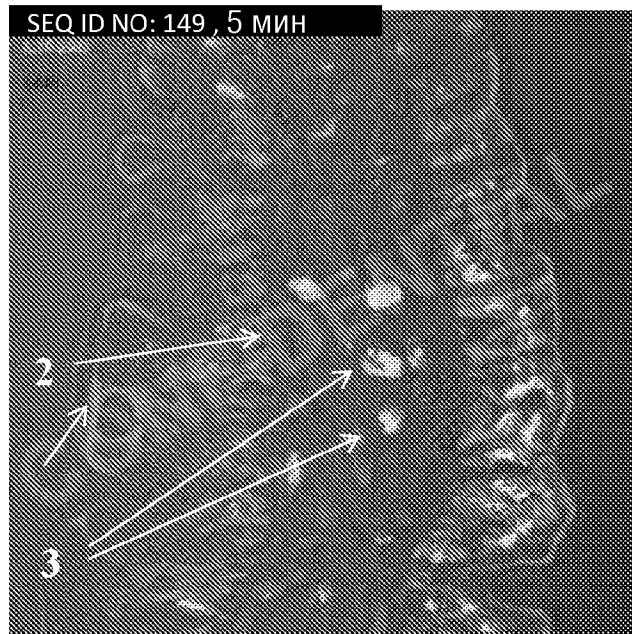
ФИГ.22L



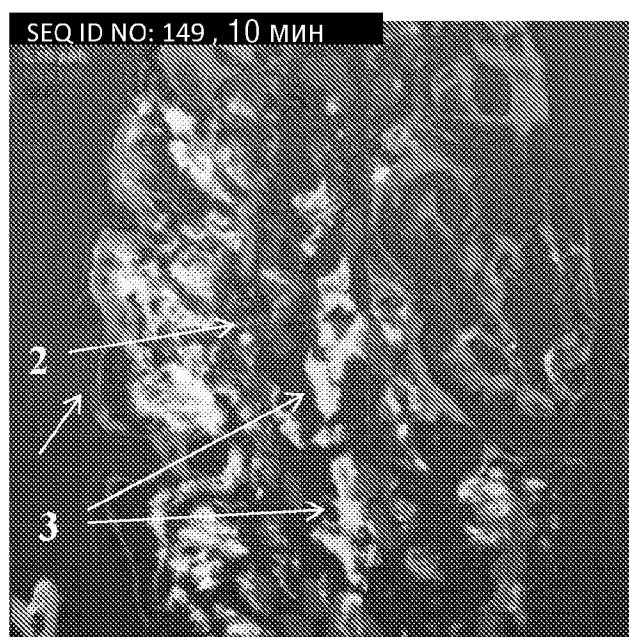
ФИГ.23А



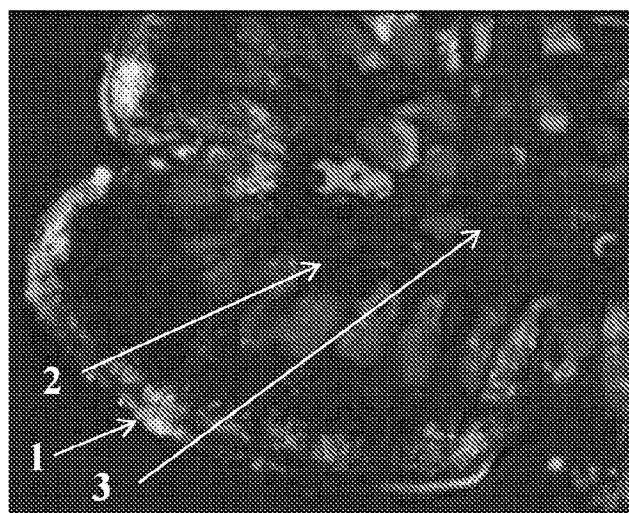
ФИГ.23В



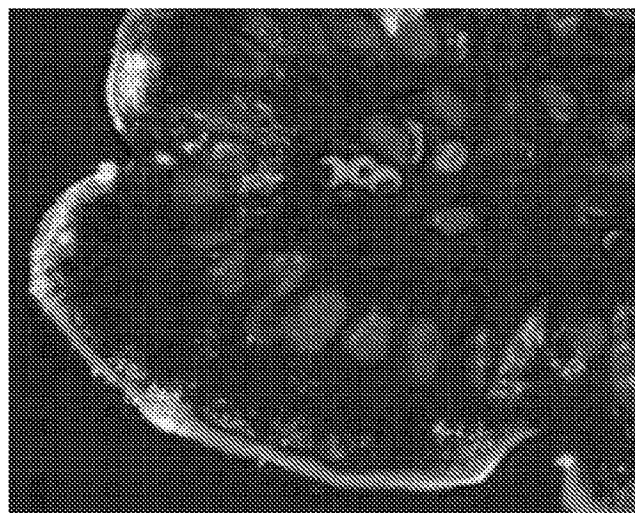
ФИГ.23С



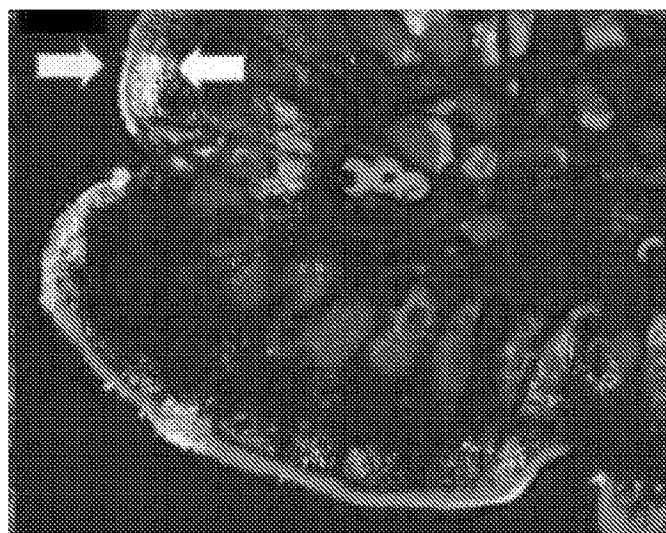
ФИГ.23D



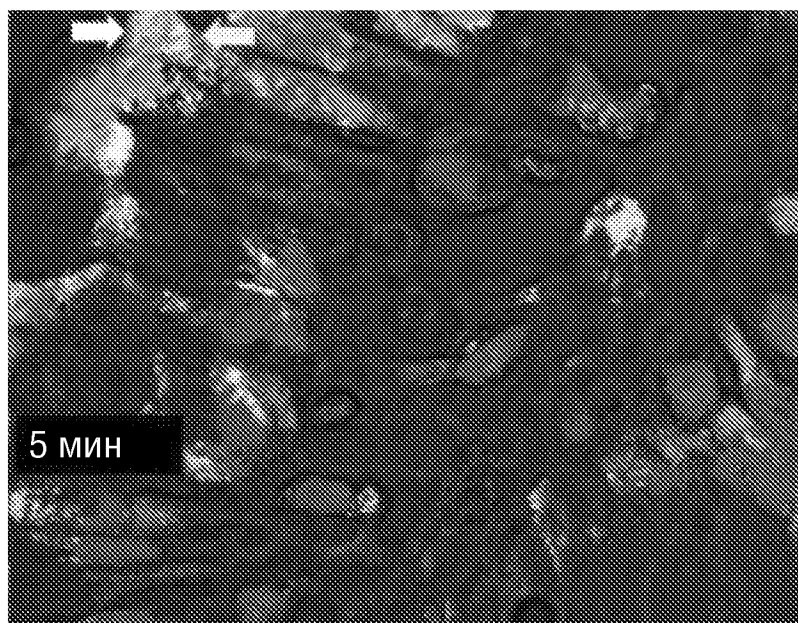
ФИГ.23E



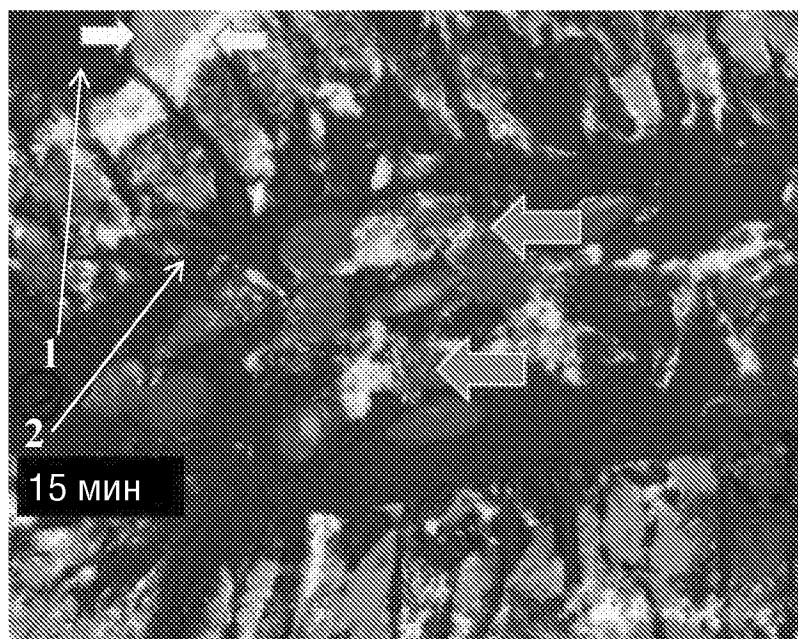
ФИГ.23F



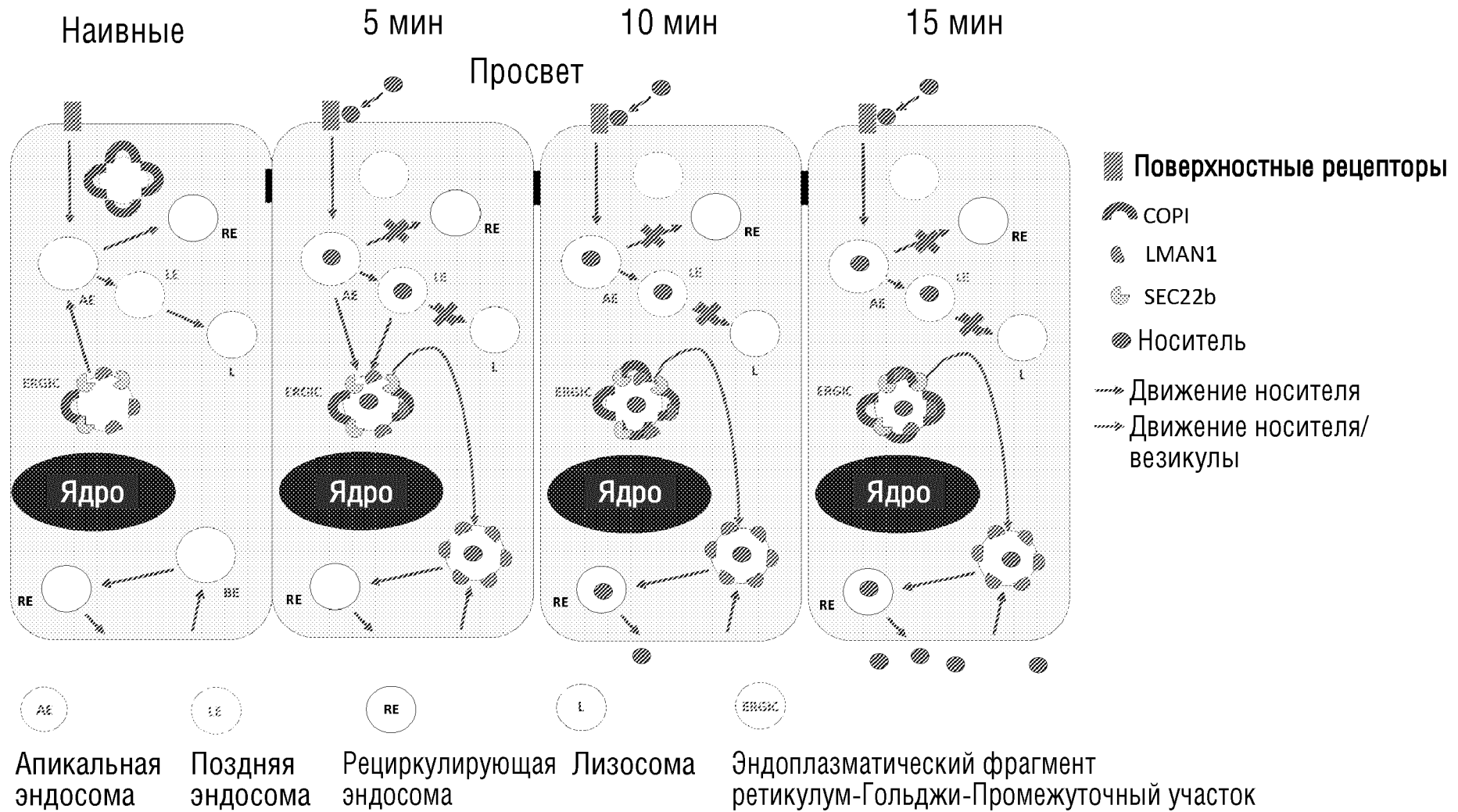
ФИГ.23Г



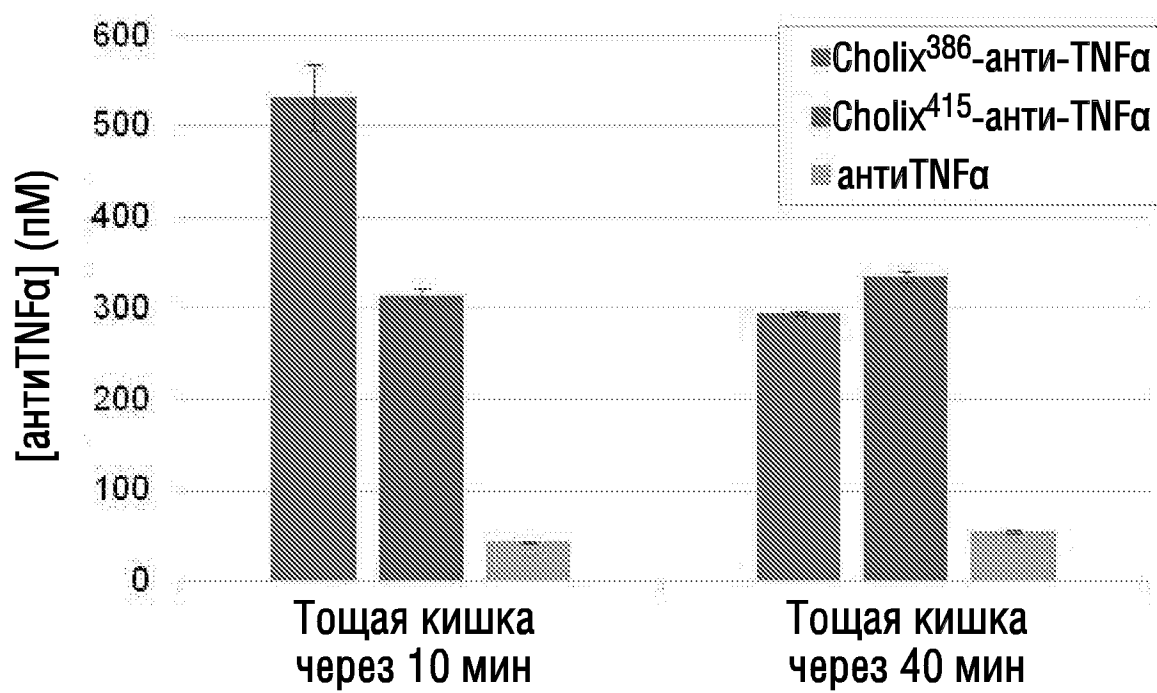
ФИГ.23Н



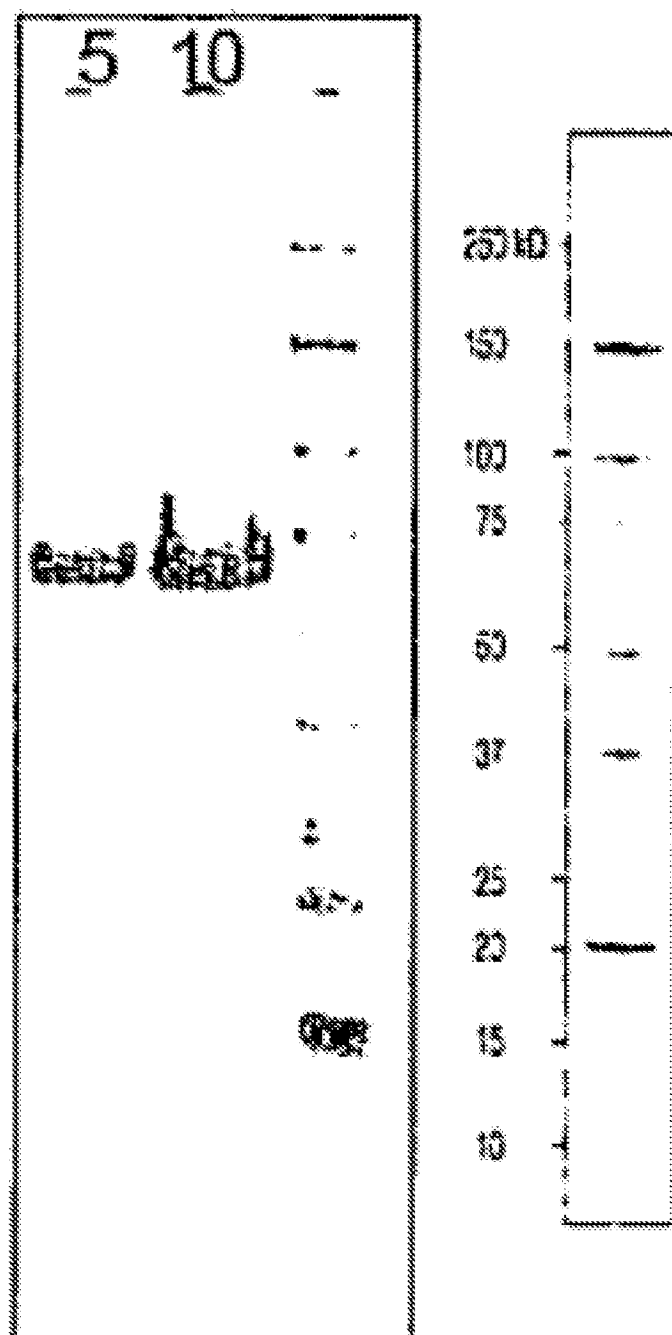
ФИГ.24



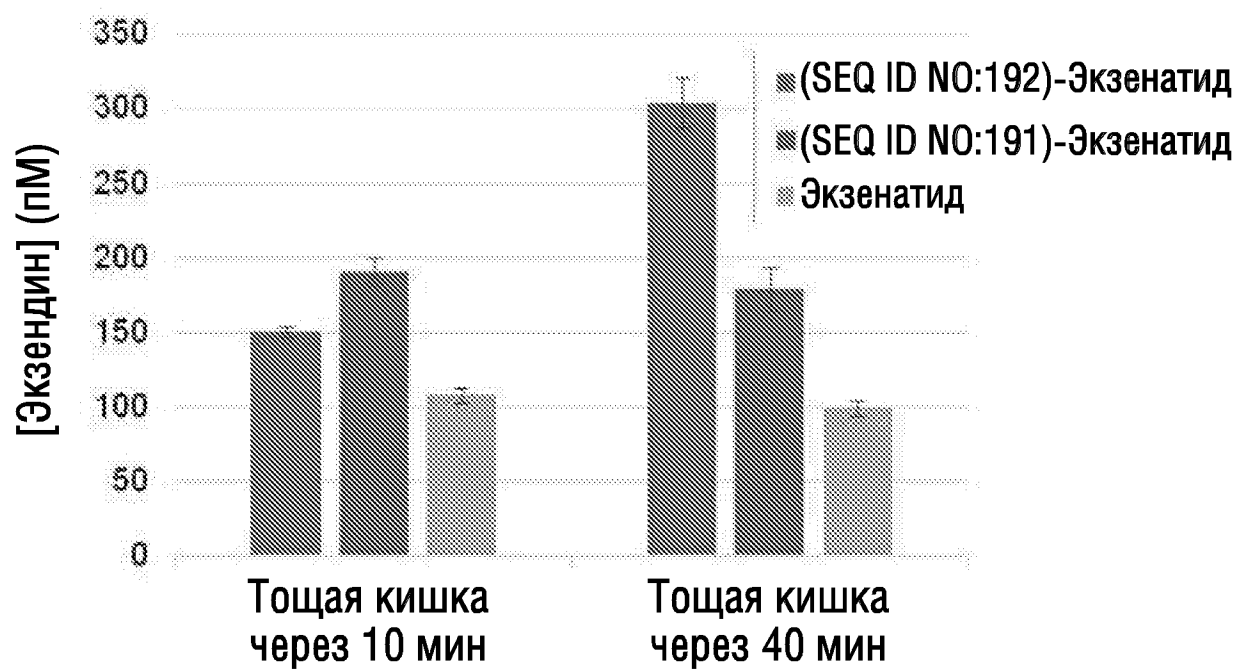
ФИГ.25



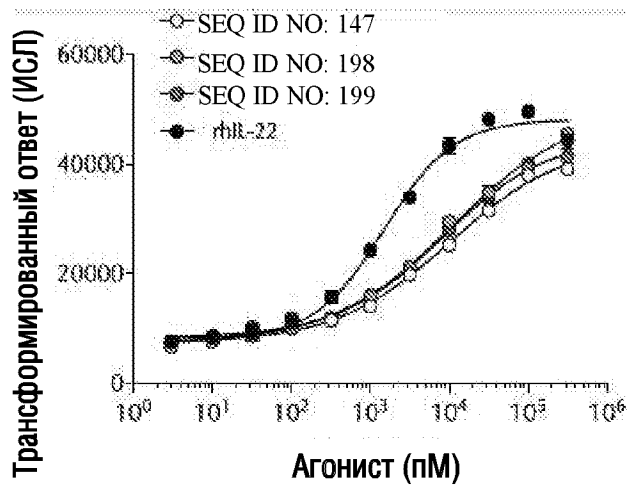
ФИГ.26



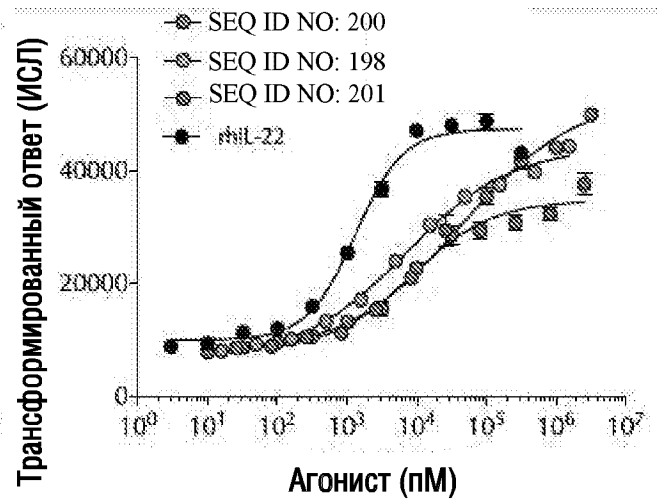
ФИГ.27



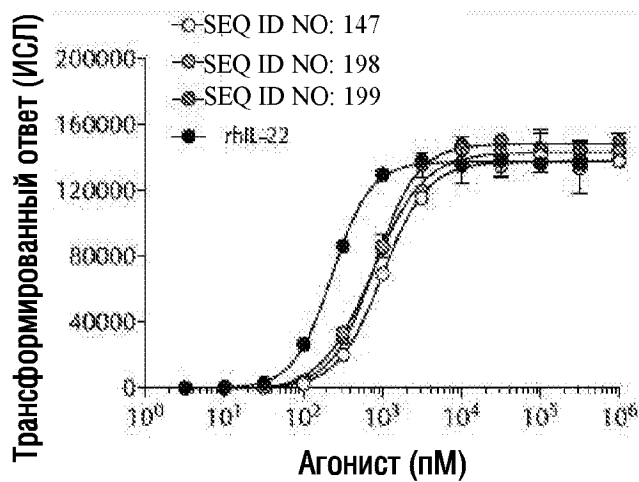
ФИГ.28А



ФИГ.28В



ФИГ.28С



ФИГ.28D

