

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290594** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.22

(22) Дата подачи заявки
2020.08.14

(51) Int. Cl. *A61K 9/16* (2006.01)
A61K 9/64 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ НАГРУЗКИ

(31) 62/888,282; 62/888,400; 62/888,133; 62/888,238;
62/888,144; 62/887,963; 62/887,933; 62/888,237;
62/899,064; PCT/US2019/050708; 62/898,729;
62/898,934; 62/898,899; 62/898,709; PCT/
US2019/060356; 62/935,615; 62/939,495;
62/970,627; 62/971,126; 62/986,557; 62/986,579;
63/013,309; 63/021,029; 63/020,996; 63/033,180;
63/033,151; 63/033,077; 63/055,886

(32) 2019.08.16; 2019.08.16; 2019.08.16; 2019.08.16;
2019.08.16; 2019.08.16; 2019.08.16; 2019.08.16;
2019.09.11; 2019.09.11; 2019.09.11; 2019.09.11;
2019.09.11; 2019.09.11; 2019.11.07; 2019.11.14;
2019.11.22; 2020.02.05; 2020.02.06; 2020.03.06;
2020.03.06; 2020.04.21; 2020.05.06; 2020.05.06;
2020.06.01; 2020.06.01; 2020.06.01; 2020.07.23

(33) US

(86) PCT/US2020/046547

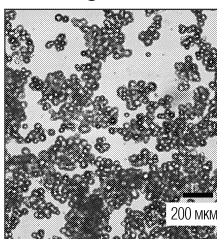
(87) WO 2021/034728 2021.02.25

(71) Заявитель:
**ЭППЛАЙД МОЛЕКЮЛАР
ТРАНСПОРТ ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Мрсни Рэндалл Дж., Маклин Дерек,
Секар Майкл, Инь Кевин, Махмуд
Тахир, Лю Кэи, Хантер Томас Карл
(US)**

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

(57) Изобретение обеспечивает комплексы и композиции, содержащие частицы, микрочастицы или наночастицы, для доставки нагрузок в клетку или через поляризованную эпителиальную клетку. Композиции могут содержать нагрузку в капсуле или таблетке для доставки нагрузки в поляризованную эпителиальную клетку или через нее.



A1

202290594

202290594

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573533EA/23

КОМПОЗИЦИИ И ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ НАГРУЗКИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] Для настоящей заявки испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой США № 62/888282, поданой 16 августа 2019 г., предварительной заявкой США № 62/935615, поданной 14 ноября 2019 г., предварительной заявкой США № 63/021029, поданной 6 мая 2020 г., предварительной заявкой США № 63/033151, поданной 1 июня 2020 г., предварительной заявкой на патент США № 62/888400, поданной 16 августа 2019 г., предварительной заявкой на патент США № 62/899064, поданной 11 сентября 2019 г., предварительной заявкой на патент США № 63/033180, поданной 1 июня 2020 г., и заявкой на патент РСТ № РСТ/US19/50708, поданной 11 сентября 2019 г., которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Неспособность больших макромолекул и/или белковых биофармацевтических препаратов легко всасываться через эпителий, респираторный эпителий или эпителий кишечника может быть ограничивающим фактором при разработке коммерчески перспективных композиций этих агентов. Например, вследствие этой неспособности к абсорбции, лабильные материалы могут оставаться в просвете кишечника до тех пор, пока их не расщепят резидентные ферменты, причем стабильные материалы могут оставаться в просвете кишечника до тех пор, пока они не будут выведены из организма. Кроме того, могут возникнуть проблемы с доставкой терапевтических средств в легкие.

[0003] Несмотря на многообещающие результаты клинических исследований, оценивающих различные биологически активные вещества для лечения заболеваний, например, злокачественной опухоли, воспалительных заболеваний, иммунных заболеваний, нарушений роста и т.д., эти вещества могут не достичь своей оптимальной эффективности. Возможна незначительная или неадекватная общая эффективность вследствие присущих организму ограничений, таких как короткий биологический период полувыведения, который может препятствовать доставке оптимальных терапевтически эффективных доз, и/или пагубных побочных эффектов и токсичности, наблюдаемых при введении терапевтически эффективных доз. Кроме того, для этих веществ может потребоваться режимы многократного дозирования, что может потребовать непрерывного внутривенного введения или частых подкожных инъекций, что может быть обременительным для пациентов и лиц, осуществляющих уход за больным.

[0004] Таким образом, существует потребность в новых способах и композициях, которые можно использовать для введения терапевтических средств человеку. Также существует потребность в улучшенных способах и композициях для доставки веществ, регулирующих уровень глюкозы, субъекту.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, описаны композиции, содержащие носитель, способный проникать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозироваться через поляризованную эпителиальную клетку; а также гетерологичную нагрузку, причем молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю больше, чем 1:1. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит катион переходного металла. В некоторых вариантах осуществления, катион переходного металла выбран из группы, состоящей из Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} . В некоторых вариантах осуществления, катион переходного металла представляет собой Zn^{2+} .

[0006] В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит поликатион. В некоторых вариантах осуществления, поликатион представляет собой протамин.

[0007] В некоторых вариантах осуществления, носитель содержит часть полипептида Cholix. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из части экзотоксина A Pseudomonas. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из части полипептида Cholix. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 206-425 в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 150-205 в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом на любой из аминокислот 150-195 в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 1-41 в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 35-40 в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, начиная с аминокислотного положения 40 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, до любого из аминокислотных положений 150-205 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix имеет С-конец в любом из аминокислотных положений 150-187 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные положения пронумерованы на основе выравнивания полипептида Cholix с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, где аминокислотные положения пронумерованы с N-конца до С-конца и начинаются с положения 1 на N-конце.

[0008] В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка выбрана из группы, состоящей из макромолекулы, малой молекулы, пептида, полипептида, нуклеиновой кислоты, мРНК, миРНК, кшРНК, миРНК, антисмысловой молекулы, антитела, ДНК, плазмиды, вакцины, полимерной наночастицы и каталитически активного материала. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой терапевтическую нагрузку.

[0009] В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка выбрана из группы, состоящей из красителя и радиофармацевтического препарата, гормона, цитокина, ингибитор ФНО, агента, снижающего уровень глюкозы, антигена, ассоциированного с опухолью, пептида и полипептида. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой полипептид, который является модулятором воспаления в желудочно-кишечном тракте.

[0010] В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой аналог глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2). В некоторых вариантах осуществления, аналог GLP-2 представляет собой тедуглутид.

[0011] В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой цитокин. В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из группы, состоящей из 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 и IL-30. В некоторых вариантах осуществления, цитокин представляет собой IL-10. В некоторых вариантах осуществления, цитокин представляет собой IL-22. В некоторых вариантах осуществления, у цитокина отсутствует нативный сигнал секреции. В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая нагрузка представляет собой гормон. В некоторых вариантах осуществления, гормон представляет собой гормон роста человека (hGH).

[0012] В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой агент, снижающий уровень глюкозы. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой инкретин, глюкагоновый пропротеин, глюкагоновый пептид, глюкагоноподобный пептид 1, глюкагоноподобный пептид 2, глицентин, родственный глицентину полипептид, препропротеин гастроингибиторного полипептида, гастроингибиторный полипептид, дипептидилпептидазу 4, глюкозный транспортер тип 4, препроглюкагон, субстрат рецептора инсулина 1, инсулин, инсулиновый аналог, апополипротеин А-II, семейство носителей растворенных веществ 2, глюкозный транспортер тип 1, гликогенсинтаза 1, гликогенсинтаза 2, протеин-тирозин фосфатазу нерецепторного типа 1, RAC-альфа серин-треониновую протеинкиназу, гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, гексокиназу 3, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатазу и белок двойной специфичности, киназу пируватдегидрогеназы 1, белок 1, связывающий кальций и содержащий суперспиральный домен, Мах-подобный белок X, фруктозобисфосфатальдололаза А, рецептор глюкагоноподобного пептида 1, рецептор

глюкагоноподобного пептида 2, рецептор гастроингибиторного полипептида, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1, рецептор инсулиноподобного фактора роста 2, инсулиновый рецептор, агонист ГПП-1 - экзенатид, агонист ГПП-1-лираглутид, эксенатид, эксендин-4, эксендин-3, агонист GIPR (Des-Ala2-GIP1-30), агонист GIPR - укороченный GIP1-30, агонист GLP-1R (аминокислоты 1-37 GIP), агонист GLP-1R (аминокислоты 7-36 GIP), ликсисенатид (торговые названия Adlyxin® и Lixumia®, Sanofi), лираглутид (торговое наименование Victoza®, Novo Nordisk A/S), семаглутид (торговое наименование Ozempic®, Novo Nordisk A/S), альбиглутид (торговое наименование Tanzeum®, GlaxoSmithKline; димер GLP-1, слитый с альбумином), дулаглутид (торговое наименование Trulicity®, Eli Lilly), глюкозозависимый инсулиотропный полипептид, мультиспецифический пептидный агонист, тирзепатид (Eli Lilly), SAR425899 (Sanofi), двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов DACRA-089, гларгин/Lantus®, глизин/Apidra®, гларин/Toujeo®, Insuman®, детемир/Levemir®, лизпро/Humalog®/Liprolog®, Деглудек/ДеглудекПлюс, инсулин аспарт, инсулин и аналоги (например, LY-2605541, LY2963016, NN1436), пегилированный инсулин Лизпро, Humulin®, Линджета, SuliXen®, NN1045, инсулин плюс Symmlin™, PE0139, инсулины быстрого и короткого действия (например, Линджета, PH20, NN1218, HinsBet), (APC-002) гидрогель, пероральные, ингаляционные, трансдермальные и сублингвальные инсулины (например, Exubera®, Nasulin®, Afrezza®, Tregopil®, TPM 02, капсулин, Oral-lyn®, Cobalamin®, пероральный инсулин, ORMD-0801, NN1953, NN1954, NN1956, VIAtab и пероральный инсулин Oshadi) или аналог эксендин-4, где аналог эксендин-4 представляет собой desPro36-эксендин-4(1-39)-Lys6NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys4-NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys5-NH₂; desPro36[Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Trp(O2)26, Asp28]эксендин-4 (1-39); или desPro36[Trp(O2) 25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, Asp28]эксендин-4 (1-39); или desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39).

[0013] В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой инсулин или аналог инсулина. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой эксенатид. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка содержит флуоресцентную метку. В некоторых вариантах осуществления, флуоресцентная метка представляет собой флуоресцеин.

[0014] В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой комплекс эксенатид-флуоресцеин. В некоторых вариантах осуществления, композиция устойчива к расщеплению ферментом поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50% носителя остается интактным через 2 часа в анализе панкреатина, где анализ панкреатина включает инкубацию композиции, содержащей 100 мкг носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) при температуре 37°C. В некоторых вариантах осуществления, молярное отношение катиона переходного металла к носителю составляет

от примерно 100:1 до примерно 300000:1. В некоторых вариантах осуществления, молярное отношение катиона переходного металла к носителю составляет от примерно 1000:1 до примерно 30000:1. В некоторых вариантах осуществления, молярное отношение катиона переходного металла к носителю составляет от примерно 1000:1 до примерно 10000:1.

[0015] В некоторых вариантах осуществления, молярное отношение протамина к носителю составляет от примерно 10:1 до примерно 0,01:1. В некоторых вариантах осуществления, молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю составляет от примерно 2:1 до примерно 6000:1. В некоторых вариантах осуществления, молярное отношение протамина к носителю составляет примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления, молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю составляет от примерно 2:1 до примерно 10:1. В некоторых вариантах осуществления, молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю составляет примерно 7:1. В некоторых вариантах осуществления, молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю составляет примерно 7,16:1.

[0016] В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 22.

[0017] В некоторых вариантах осуществления, композиция инкапсулирована. В некоторых вариантах осуществления, инкапсулированная композиция предназначена для высвобождения гетерологичной нагрузки при первом условии, но не при втором условии. В некоторых вариантах осуществления, инкапсулированная композиция предназначена для высвобождения гетерологичной нагрузки при высоком значении pH, но не при низком значении pH. В некоторых вариантах осуществления, инкапсулированная композиция содержит энтеросолюбильное покрытие. В некоторых вариантах осуществления, композиция представляет собой частицу. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит поликатион. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен транспортировать гетерологичную нагрузку в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать гетерологичную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых вариантах осуществления, носитель связан с поликатионом. В некоторых вариантах осуществления, поликатион представляет собой протамин, полилизин, полиорнитин, полиэтиленимин (PEI), проламин, протамин, поливинилпирролидон (PVP), полиаргинин, поливиниламин или их сочетание. В

некоторых вариантах осуществления, поликатион представляет собой соль протамина. В некоторых вариантах осуществления, соль протамина представляет собой сульфат протамина, ацетат протамина, бромид протамина, хлорид протамина, капроат протамина, трифторацетат протамина, бикарбонат протамина, пропионат протамина, лактат протамина, формиат протамина, нитрат протамина, цитрат протамина, моногидрофосфат протамина, дигидрофосфат протамина, тартрат протамина или перхлорат протамина. В некоторых вариантах осуществления, соль протамина представляет собой сульфат протамина.

[0018] В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, носители способны проникать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку, при этом, по меньшей мере, 60% носителя остается интактным через 0,5 часа в анализе панкреатина, причем анализ панкреатина включает инкубацию композиции, содержащей 100 мкг носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) при температуре 37°C.

[0019] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 90% носителя остается интактным через 2 часа в анализе панкреатина. В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит катион. В некоторых вариантах осуществления, катион представляет собой катион металла или поликатион. В некоторых вариантах осуществления, катион представляет собой катион металла. В некоторых вариантах осуществления, катион металла представляет собой катион переходного металла. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из части экзотоксина A *Pseudomonas*. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из части полипептида Cholix. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 206-425 в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 150-205 в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом на любой из аминокислот 150-195 в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 1-41 в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 35-40 в SEQ ID NO: 7.

[0020] В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, начиная с аминокислотного положения 40 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, до любого из аминокислотных положений 150-205 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix имеет С-конец в любом из аминокислотных положений 150-187 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых

вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные положения пронумерованы на основе выравнивания полипептида Cholix с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, где аминокислотные положения пронумерованы от N-конца до C-конца и начинаются с положения 1 на N-конце.

[0021] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе описаны композиции, содержащие вариант Cholix, оканчивающийся в положении 195-347, и гетерологичную нагрузку, где гетерологичная нагрузка представляет собой агент, регулирующий уровень глюкозы. В некоторых вариантах осуществления, конечное положение варианта Cholix определяется относительно SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, носитель способен трансцитозировать гетерологичную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых вариантах осуществления, агент, регулирующий уровень глюкозы, представляет собой агент, снижающий уровень глюкозы. В некоторых вариантах осуществления, средство, снижающее уровень глюкозы, представляет собой инкретин, пропротеин глюкагона, пептид глюкагона, глюкагоноподобный пептид 1, глюкагоноподобный пептид 2, глицентин, родственный глицентину полипептид, препропротеин гастроингибиторного полипептида, гастроингибиторный полипептид, дипептидилпептидазу 4, глюкозный транспортер тип 4, препроглюкагон, субстрат рецептора инсулина 1, инсулин, аналог инсулина, аполипопротеин А-II, семейство носителей растворенных веществ 2, глюкозный транспортер тип 1, гликогенсинтазу 1, гликогенсинтазу 2, протеин-тирозинфосфатазу нерецепторного типа 1, RAC-альфа серин-треониновую протеинкиназу, гам-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, гексокиназу 3, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат 3-фосфатазу и дуал-специфичный белок, киназу пируватдегидрогеназы 1, белок 1, связывающий кальций и содержащий суперспиральный домен, Мах-подобный белок X, фруктозо-бисфосфатазолаза А, рецептор глюкагоноподобного пептида 1, рецептор глюкагоноподобного пептида 2, рецепторы гастроингибиторного полипептида, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1, рецептор инсулиноподобного фактора роста 2, инсулиновый рецептор, агонист ГПП-1 - экзенатид, агонист ГПП-1 - лираглутид, эксенатид, эксендин-4, эксендин-3, агонист GIPR (Des-Ala2-GIP1-30), агонист GIPR - укороченный GIP1-30, агонист GLP-1R(аминокислоты 1-37 GIP), агонист GLP-1R(аминокислоты 7-36 GIP), ликсисенатид (торговые марки Adlyxin® и Lixumia®, Sanofi), лираглутид (торговое наименование Victoza®, Novo Nordisk A/S), семаглутид (торговое наименование Ozempic®, Novo Nordisk A/S), альбиглутид (торговое наименование Tanzeum®, GlaxoSmithKline; димер GLP-1, слитый с альбумином), дулаглутид (торговое наименование Trulicity®, Eli Lilly), глюкозозависимый инсулиноотропный полипептид, мультиспецифический пептидный агонист, тирзепатид (Eli

Lilly), SAR425899 (Sanofi), двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов DACRA-089, гларгин/Lantus®, глюлизин/Apidra®, гларин/Toujeo®, Insuman®, детемир/Levemir®, лизпро/Humalog®/Liprolog®, Деглудек/ДеглудекПлюс, инсулин аспарт, инсулин и аналоги (например, LY-2605541, LY2963016, NN1436), инсулин пегилированный лизпро, Humulin®, Линджета, SuliXen®, NN1045, инсулин плюс Symlin™, PE0139, инсулины быстрого и короткого действия (например, Линджета, PH20, NN1218, HinsBet), (APC-002) гидрогелевые, пероральные, ингаляционные, трансдермальные и сублингвальные инсулины (например, Exubera®, Nasulin®, Afrezza®, Tregopil®, TPM 02, капсулин, Oral-lyn®, Cobalamin®, пероральный инсулин, ORMD-0801, NN1953, NN1954, NN1956, VIAtab и пероральный инсулин Oshadi), или аналог эксендина-4, где аналог эксендина-4 представляет собой desPro36-эксендин-4(1-39)-Lys6NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys4-NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys5-NH₂; desPro36[Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Trp(O2) 26, Asp28]эксендин-4 (1-39); или desPro36[Trp(O2) 25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, Asp28]эксендин-4 (1-39); или desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39).

[0022] В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка содержит инкретин. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка содержит эксенатид или инсулин. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит частицу. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка представляет собой эксендин-3, эфпегленатид, семаглутид, агонист GLP-1R (аминокислоты 1-37 GIP), агонист GLP-1R (аминокислоты 7-36 GIP), тирзепатид, оксинтомодулин, агонист GIPR - укороченный GIP1-30, двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов, препроинсулин, инсулин аспарт, инсулин гларгин или инсулин лизпро.

[0023] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе описаны композиции, содержащие носитель, полученный из бактериального токсина, при этом носитель способен проникать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку; а также катион переходного металла или поликатион, где поликатион представляет собой молекулу или химический комплекс, имеющий более 2 положительных зарядов. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит катион переходного металла. В некоторых вариантах осуществления, катион переходного металла выбран из группы, состоящей из Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ и Cu²⁺. В некоторых вариантах осуществления, катион переходного металла представляет собой Zn²⁺. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит поликатион.

[0024] В некоторых вариантах осуществления, поликатион представляет собой протамин, полилизин, полиорнитин, полиэтиленимин (PEI), проламин, протамин, поливинилпирролидон (PVP), полиаргинин, поливиниламин или их сочетание. В некоторых вариантах осуществления, поликатион представляет собой соль протамин. В

некоторых вариантах осуществления, соль протамина представляет собой сульфат протамина, ацетат протамина, бромид протамина, хлорид протамина, капроат протамина, трифторацетат протамина, бикарбонат протамина, пропионат протамина, лактат протамина, формиат протамина, нитрат протамина, цитрат протамина, моногидрофосфат протамина, дигидрофосфат протамина, тартрат протамина или перхлорат протамина. В некоторых вариантах осуществления, соль протамина представляет собой сульфат протамина. В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит гетерологичную нагрузку. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка содержит эксенатид, инсулин или гормон роста человека.

[0025] В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из экзотоксина A *Pseudomonas* или части экзотоксина A *Pseudomonas*. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из полипептида SEQ ID NO: 69 или части SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из части полипептида Cholix. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 206-425 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 150-205 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом на любой из аминокислот 150-195 в SEQ ID NO: 1.

[0026] В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 1-41 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 35-40 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, начиная с аминокислотного положения 40 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, до любого из аминокислотных положений 150-205 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix имеет С-конец в любом из аминокислотных положений 150-187 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные положения пронумерованы на основе выравнивания полипептида Cholix с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, где аминокислотные положения пронумерованы от N-конца до С-конца и начинаются с положения 1 на N-конце. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит частицу.

[0027] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе описаны

композиции, содержащие инсулин, где, по меньшей мере, 20% инсулина остается интактным через 1 час в анализе панкреатина, включающем инкубацию композиции, содержащей инсулин, с панкреатином в ФСБ при температуре 37°C. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе описаны композиции, содержащие инсулин, в которых, по меньшей мере, 20% инсулина остается интактным через 1 час в анализе моделируемой кишечной жидкости, включающем инкубирование частиц, содержащих инсулин, в моделированной кишечной жидкости USP (Rica Pharmaceuticals R7109000-500A, 4-кратное разведение, pH 6,8) при концентрации 142 мкг/мл (содержание инсулина при температуре 37°C в течение 14 часов).

[0028] В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит носитель, полученный из бактериального токсина, при этом носитель способен транспортироваться в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых вариантах осуществления, носитель состоит из части полипептида Cholix. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит катион переходного металла. В некоторых вариантах осуществления, катион переходного металла выбран из группы, состоящей из Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ и Cu²⁺. В некоторых вариантах осуществления, катион переходного металла представляет собой Zn²⁺. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит поликатион. В некоторых вариантах осуществления, поликатион представляет собой протамин. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит частицу. В некоторых вариантах осуществления, частица представляет собой микрочастицу. В некоторых вариантах осуществления, микрочастицы получают путем распылительной сушки. В некоторых вариантах осуществления, частица имеет диаметр от около 50 нм до около 20 мкм.

[0029] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе описаны фармацевтические композиции, содержащие композиции, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе описаны фармацевтические композиции, содержащие композиции, описанные в настоящем документе, а также консервант. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе описаны фармацевтические композиции, содержащие композиции, описанные в настоящем документе, а также фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе описаны способы, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание, злокачественную опухоль или нарушение обмена веществ. В некоторых вариантах осуществления, субъекта имеет нарушение обмена веществ.

[0030] В некоторых вариантах осуществления, нарушение обмена веществ представляет собой диабет, диабет в следствие ожирения, гипергликемию, дислипидемию, гипертриглицеридемию, метаболический синдром X, инсулинорезистентность, нарушение

толерантности к глюкозе (IGT), диабетическую дислипидемию, гиперлипидемию, жировую болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH), гепатит, ожирение, сосудистые заболевания, болезни сердца, инсульт, нарушение толерантности к глюкозе, повышенный уровень глюкозы натощак, инсулинорезистентность, секрецию альбумина с мочой, центральный тип ожирения, гипертонию, повышенный уровень триглицеридов, повышенный уровень холестерина ЛПНП и сниженный уровень холестерина ЛПВП, гипергликемию, гиперинсулинемию, дислипидемию, кетоз, гипертриглицеридемию, метаболический синдром X, инсулинорезистентность, нарушенную гликемию натощак, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическую дислипидемию, глюконеогенез, избыточный гликогенолиз, диабетический кетоацидоз, гипертриглицеридемию, артериальную гипертензию, диабетическую нефропатию, почечную недостаточность, декомпенсированную почечную недостаточность, гиперфагию, атрофию мышц, диабетическую невропатию, диабетическую ретинопатию, диабетическую кому, атеросклероз, ишемическую болезнь сердца, заболевание периферических артерий или гиперлипидемию.

[0031] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе, описаны способы, включающие комбинирование носителя бактериального происхождения с гетерологичной нагрузкой и катионом для получения частицы. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная нагрузка выбрана из группы, состоящей из красителя, радиофармацевтического средства, гормона, цитокина, ингибитора ФНО, агента, снижающего уровень глюкозы, опухолеассоциированного антигена, пептида и полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает распылительную сушку носителя, полученного из бактерий, гетерологичной нагрузки и катиона. В некоторых вариантах осуществления, способ включает (a) приготовление смеси, включающей изолированный носитель и нагрузку; (b) приготовление смеси, включающей сульфат протамина и NaPO_4 ; и (c) объединение смеси (a) со смесью (b) и выдерживание объединенной смеси в течение ночи при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает стадию (d) разрушения частиц, полученных на стадии (c), на более мелкие частицы путем увеличения ионной силы объединенной смеси, полученной на стадии (c). В некоторых вариантах осуществления, препарат стадии (a) не содержит ZnCl_2 . В некоторых вариантах осуществления, препарат стадии (a) содержит ZnCl_2 .

[0032] Аспект настоящего изобретения представляет собой композицию, содержащую носитель, способный проникать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку; и гетерологичную нагрузку, где молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю больше, чем 1:1.

[0033] Композиция может представлять собой частицу. Частица может быть микрочастицей. Микрочастица может быть образована распылительной сушкой. Частица или микрочастица может иметь диаметр от примерно 50 нм до примерно 20 мкм.

[0034] В некоторых случаях, композиция содержит катион переходного металла.

Катион переходного металла может быть выбран из группы, состоящей из Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} . Катион переходного металла может представлять собой Zn^{2+} .

[0035] В некоторых случаях, композиция содержит поликатион. Поликатион может представлять собой протамин.

[0036] Композиция может содержать носитель, полученный из бактериального токсина. В некоторых случаях, носитель способен проникать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых случаях, носитель может быть связан с поликатионом.

[0037] Носитель может содержать часть экзотоксина A *Pseudomonas*. В некоторых случаях, носитель состоит из части экзотоксина A *Pseudomonas*. Носитель может содержать часть полипептида Cholix. В некоторых случаях, носитель состоит из части полипептида Cholix. Полипептид Cholix может состоять из аминокислотной последовательности с укорочением С-концевой части в любом из аминокислотных положений 206-425 в SEQ ID NO: 7. Полипептид Cholix может состоять из аминокислотной последовательности с укорочением С-концевой части в любом из аминокислотных положений 150-205 в SEQ ID NO: 7. Полипептид Cholix может состоять из аминокислотной последовательности с укорочением С-концевой части в любом из аминокислотных положений 150-195 в SEQ ID NO: 7. Полипептид Cholix может состоять из аминокислотной последовательности с укорочением С-концевой части в любом из аминокислотных положений 1-41 в SEQ ID NO: 7. Полипептид Cholix может состоять из аминокислотной последовательности с укорочением С-концевой части в любом из аминокислотных положений 35-40 в SEQ ID NO: 7. Полипептид Cholix может состоять из аминокислотной последовательности, начиная с аминокислотного положения 40 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7 до любого из аминокислотных положений 150-205 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. Полипептид Cholix может оканчиваться в аминокислотном положении 150 или аминокислотном положении 187 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. Полипептид Cholix может состоять из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8. Полипептид Cholix может состоять из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID: NO: 10. Аминокислоты могут быть пронумерованы на основе выравнивания полипептида Cholix с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, где аминокислотные положения могут быть пронумерованы от N-конца к С-концу и начиная с положения 1 на N-конце.

[0038] В некоторых случаях, композиция содержит гетерологичную нагрузку. Гетерологичная нагрузка может быть выбрана из группы, состоящей из макромолекулы, малой молекулы, пептида, полипептида, нуклеиновой кислоты, матричной РНК (мРНК), микроРНК (миРНК), малой шпилечной РНК (мшРНК), малой интерферирующей РНК (миРНК), CRISPR РНК (например, направляющая РНК, например, одиночная направляющая РНК (онРНК)), антисмысловой молекулы, белка, антитела, ДНК, плазмиды, вакцины, полимерной наночастицы и каталитически активного вещества.

[0039] Гетерологичная нагрузка может представлять собой терапевтическую нагрузку. Гетерологичная нагрузка может быть выбрана из группы, состоящей из красителя и радиофармацевтического средства, гормона, цитокина, ингибитора ФНО, средства, снижающего уровень глюкозы, опухолеассоциированного антигена, пептида и полипептида. Гетерологичная нагрузка может представлять собой полипептид, который является модулятором воспаления в желудочно-кишечном тракте. Терапевтическая нагрузка может представлять собой аналог глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2). Аналогом GLP-2 может быть тедуглутид.

[0040] Гетерологичная нагрузка может представлять собой цитокин. Цитокин может быть выбран из группы, состоящей из 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 и IL-30. Цитокин может представлять собой IL-10. Цитокин может представлять собой IL-22. У цитокина может отсутствовать нативный сигнал секреции.

[0041] Гетерологичная нагрузка может представлять собой гормон. Гормон может представлять собой гормон роста человека (hGH).

[0042] Гетерологичная нагрузка может представлять собой агент, снижающий уровень глюкозы. Гетерологичная нагрузка может представлять собой инкретин, пропротеин глюкагона, пептид глюкагона, глюкагоноподобный пептид 1, глюкагоноподобный пептид 2, глицентин, глицентин-родственный полипептид, препропротеин гастроингибиторного полипептида, гастроингибиторный полипептид, дипептидилпептидазу 4, глюкозный транспортер тип 4, препроглюкагон, субстрат рецептора инсулина 1, инсулин, аналог инсулина, аполипептид А-II, семейство носителей растворенных веществ 2, глюкозный транспортер тип 1, гликогенсинтазу 1, гликогенсинтазу 2, протеин-тирозиновая фосфатаза нерецепторного типа 1, RAS-альфа серин-треониновая протеинкиназа, гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, гексокиназу 3, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатазу и белок двойной специфичности, киназа пируватдегидрогеназы 1, белок 1, связывающий кальций и содержащий суперспиральный домен, Мах-подобный белок X, фруктозобисфосфатальдололаза А, рецептор глюкагоноподобного пептида 1, рецептор глюкагоноподобного пептида 2, рецептор гастроингибиторного полипептида, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1, рецептор инсулиноподобного фактора роста 2, инсулиновый рецептор, агонист ГПП-1 - эксенатид, агонист ГПП-1 - лираглутид, эксенатид, эксендин-4, эксендин-3, агонист GIPR (Des-Ala2-GIP1-30), агонист GIPR - укороченный GIP1-30, агонист GLP-1R(аминокислоты 1-37 GIP), агонист GLP-1R(аминокислоты 7-36 GIP), ликсисенатид (торговые марки Adlyxin® и Lixumia®, Sanofi), лираглутид (торговое наименование Victoza®, Novo Nordisk A/S), семаглутид (торговое наименование Ozempic®, Novo Nordisk A/S), альбиглутид (торговое наименование Tanzeum®, GlaxoSmithKline; димер GLP-1, слитый с альбумином), дулаглутид (торговое наименование Trulicity®, Eli Lilly), глюкозозависимый

инсулинотропный полипептид, мультиспецифический пептидный агонист, тирзепатид (Eli Lilly), SAR425899 (Sanofi), двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов DACRA-089, гларгин/Lantus®, глизин/Аpidra®, гларин/Toujeo®, Insuman®, детемир/Levemir®, лизпро/Humalog®/Liprolog®, деглудек/ДеглудекПлюс, инсулин аспарт, инсулин и аналоги (например, LY-2605541, LY2963016, NN1436), инсулин пегилированный лизпро, Humulin®, Линджета, SuliXen®, NN1045, инсулин плюс SymlinTM, PE0139, инсулины быстрого и короткого действия (например, Линджета, PH20, NN1218, HinsBet), (APC-002) гидрогелевые, пероральные, ингаляционные, трансдермальные и сублингвальные инсулины (например, Exubera®, Nasulin®, Afrezza®, Tregopil®, TPM 02, капсулин, Oral-lyn®, Cobalamin®, пероральный инсулин, ORMD-0801, NN1953, NN1954, NN1956, VIAtab и пероральный инсулин Oshadi) или аналог эксендин-4, где аналог эксендин-4 может представлять собой desPro36-эксендин-4(1-39)-Lys6NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys4-NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys5-NH₂; desPro36[Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Trp(O₂) 26, Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Trp(O₂) 25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14 Trp(O₂)25, Asp28]эксендин-4 (1-39); или desPro36[Met(O)14 Trp(O₂)25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39). Гетерологичной нагрузкой может быть инсулин или аналог инсулина. Гетерологичной нагрузкой может быть эксенатид.

[0043] Гетерологическая нагрузка может содержать флуоресцентную метку. Флуоресцентная метка может представлять собой флуоресцеин. Гетерологичной нагрузкой может быть эксенатид-флуоресцеиновый комплекс.

[0044] В некоторых случаях, композиция устойчива к расщеплению посредством фермента поджелудочной железы. По крайней мере 50% носителя может оставаться интактным после воздействия фермента поджелудочной железы в течение 2 часов. По меньшей мере 50% носителя может оставаться интактным через 2 часа в анализе панкреатина, при этом анализ панкреатина включает инкубацию композиции, содержащей 100 мкг носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) при температуре 37°C.

[0045] Молярное отношение катиона переходного металла к носителю может составлять от примерно 100:1 до примерно 300000:1. Молярное отношение катиона переходного металла к носителю может составлять от примерно 1000:1 до примерно 30000:1. Молярное отношение катиона переходного металла к носителю может составлять от примерно 1000:1 до примерно 10000:1.

[0046] Молярное отношение протамина к носителю может составлять от примерно 10:1 до примерно 0,01:1. Молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю может составлять от примерно 2:1 до примерно 6000:1. Молярное отношение протамина к носителю может составлять примерно 1:1.

[0047] Молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю может

составлять от примерно 2:1 до примерно 10:1. Молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю может составлять примерно 7:1. Молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю может составлять примерно 7,16:1.

[0048] Гетерологичная нагрузка может представлять собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 14. Гетерологическая нагрузка может представлять собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19. Гетерологическая нагрузка может представлять собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 20. Гетерологичная нагрузка может представлять собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 21. Гетерологическая нагрузка может представлять собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 22.

[0049] Композиция может быть инкапсулирована. Инкапсулированная композиция может быть сконфигурирована для высвобождения гетерологичной нагрузки при первом условии, но не при втором условии. Инкапсулированная композиция может быть сконфигурирована для высвобождения гетерологичной нагрузки при высоком значении pH, но не при низком значении pH. Инкапсулированная композиция может содержать энтеросолюбильное покрытие.

[0050] Другой аспект настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую любую описанную в настоящем документе композицию.

[0051] В некоторых случаях, поликатион представляет собой протамин, полилизин, полиорнитин, полиэтиленмин (PEI), проламин, протамин, поливинилпирролидон (PVP), полиаргинин, поливиниламин или их сочетание. В некоторых случаях, поликатион представляет собой соль протамина. В некоторых случаях, соль протамина представляет собой сульфат протамина, ацетат протамина, бромид протамина, хлорид протамина, капроат протамина, трифторацетат протамина, бикарбонат протамина, пропионат протамина, лактат протамина, формиат протамина, нитрат протамина, цитрат протамина, моногидрофосфат протамина, дигидрофосфат протамина, тартрат протамина или перхлорат протамина. В некоторых случаях, соль протамина представляет собой сульфат протамина.

[0052] Аспект настоящего изобретения представляет собой композицию, содержащую носитель, при этом носитель способен проникать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку, причем, по меньшей мере, 60% носителя остается интактным через 0,5 часа в анализе панкреатина, где анализ панкреатина включает инкубацию композиции, содержащей 100 мкг носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) при температуре 37°C. В некоторых случаях по меньшей мере 90% носителя остается интактным через 2 часа в анализе панкреатина.

[0053] В некоторых случаях, композиция дополнительно содержит катион. В некоторых случаях, катион представляет собой катион металла или поликатион. В

некоторых случаях, катион представляет собой катион металла. В некоторых случаях, катион металла представляет собой катион переходного металла. В некоторых случаях, носитель состоит из части экзотоксина A *Pseudomonas*. В некоторых случаях, носитель состоит из части полипептида Cholix. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 206-425 в SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 150-205 SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом на любой из аминокислот 150 to 195 of SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 1-41 в SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 35-40 в SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, начиная с аминокислотного положения 40 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, до любого из аминокислотных положений 150-205 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, полипептид Cholix имеет С-конец в любом из аминокислотных положений 150-187 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В некоторых случаях, аминокислотные положения пронумерованы на основе выравнивания полипептида Cholix с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, где аминокислотные положения пронумерованы от N-конца до С-конца и начинаются с положения 1 на N-конце.

[0054] Другим аспектом настоящего изобретения является композиция, содержащая вариант Cholix, оканчивающийся в положении 195-347, и гетерологичную нагрузку, где гетерологичная нагрузка представляет собой агент, регулирующий уровень глюкозы. В некоторых случаях, конечное положение в варианте Cholix определяется относительно SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, носитель способен транскитировать гетерологичную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых случаях, агент, регулирующий уровень глюкозы, представляет собой агент, снижающий уровень глюкозы. В некоторых случаях, средство, снижающее уровень глюкозы, представляет собой инкретин, пропротеин глюкагона, пептид глюкагона, глюкагоноподобный пептид 1, глюкагоноподобный пептид 2, глицентин, родственник глицентину полипептид, препропротеин гастроингибиторного полипептида, гастроингибиторный полипептид, дипептидилпептидаза 4, глюкозный транспортер тип 4, препроглюкагон, субстрат рецептора инсулина 1, инсулин, аналог инсулина, аполипептопротеин А-II, семейство носителей растворенных веществ 2, глюкозный транспортер тип 1, гликогенсинтазу 1, гликогенсинтазу 2, протеин-тирозиновая фосфатаза

нерецепторного типа 1, RAC-альфа серин-треониновая протеинкиназа, гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, гексокиназу 3, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатазу и белок двойной специфичности, киназа пируватдегидрогеназы 1, белок 1, связывающий кальций и содержащий суперспиральный домен, Мах-подобный белок X, фруктозо-бисфосфаталядолаза A, рецептор глюкагоноподобного пептида 1, рецептор глюкагоноподобного пептида 2, рецептор гастроингибиторного полипептида, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1, рецептор инсулиноподобного фактора роста 2, инсулиновый рецептор, агонист ГПП-1 - эксенатид, агонист ГПП-1 - лираглутид, эксенатид, эксендин-4, эксендин-3, агонист GIPR (Des-Ala2-GIP1-30), агонист GIPR - укороченный GIP1-30, агонист GLP-1R(аминокислоты 1-37 GIP), агонист GLP-1R(аминокислоты 7-36 GIP), ликсисенатид (торговые марки Adlyxin® и Lixumia®, Sanofi), лираглутид (торговое наименование Victoza®, Novo Nordisk A/S), семаглутид (торговое наименование Ozempic®, Novo Nordisk A/S), альбиглутид (торговое наименование Tanzeum®, GlaxoSmithKline; димер GLP-1, слитый с альбумином), дулаглутид (торговое наименование Trulicity®, Eli Lilly), глюкозозависимый инсулинотропный полипептид, мультиспецифический пептидный агонист, тирзепатид (Eli Lilly), SAR425899 (Sanofi), двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов DACRA-089, гларгин/Lantus®, глутизин/Apidra®, гларин/Toujeo®, Insuman®, детемир/Levemir®, лизпро/Humalog®/Liprolog®, Деглудек/ДеглудекПлюс, инсулин аспарт, инсулин и аналоги (например, LY-2605541, LY2963016, NN1436), инсулин пегилированный лизпро, Humulin®, Линджета, SuliXen®, NN1045, инсулин плюс SymlinTM, PE0139, инсулины быстрого и короткого действия (например, Линджета, PH20, NN1218, HinsBet), (APC-002) гидрогелевые, пероральные, ингаляционные, трансдермальные и сублингвальные инсулины (например, Exubera®, Nasulin®, Afrezza®, Tregopil®, TPM 02, капсулин, Oral-lyn®, Cobalamin®, пероральный инсулин, ORMD-0801, NN1953, NN1954, NN1956, VIAtab и пероральный инсулин Oshadi), или аналог эксендина-4, где аналог эксендина-4 представляет собой desPro36-эксендин-4(1-39)-Lys6NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys4-NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys5-NH₂; desPro36[Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Trp(O2) 26, Asp28]эксендин-4 (1-39); или desPro36[Trp(O2) 25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, Asp28]эксендин-4 (1-39); или desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39). В некоторых случаях, гетерологичная нагрузка содержит инкретин. В некоторых случаях, гетерологичная нагрузка включает эксенатид или инсулин. В некоторых случаях, композиция содержит частицу. В некоторых случаях, гетерологичная нагрузка представляет собой эксендин-3, эфпегленатид, семаглутид, агонист GLP-1R(аминокислоты 1-37 GIP), агонист GLP-1R(аминокислоты 7-36 GIP), тирзепатид, оксинтомодулин, агонист GIPR - укороченный GIP1-30, двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов, препроинсулин, инсулин аспарт, инсулин гларгин или инсулин лизпро.

[0055] Одним из аспектов настоящего изобретения является композиция, содержащая носитель, полученный из бактериального токсина, способного проникать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку; и катион переходного металла или поликатион, где поликатион представляет собой молекулу или химический комплекс, имеющий более 2 положительных зарядов. В некоторых случаях, композиция содержит катион переходного металла. В некоторых случаях, катион переходного металла выбран из группы, состоящей из Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} . В некоторых случаях, катионом переходного металла является Zn^{2+} . В некоторых случаях, композиция включает поликатион. В некоторых случаях, поликатион представляет собой соль протамина. В некоторых случаях, композиция дополнительно содержит гетерологичную нагрузку. В некоторых случаях, гетерологичная нагрузка включает эксенатид, инсулин или человеческий гормон роста. В некоторых случаях, носитель состоит из экзотоксина *Pseudomonas A* или части экзотоксина *A Pseudomonas*. В некоторых случаях, носитель состоит из полипептида SEQ ID NO: 69 или части SEQ ID NO: 69. В некоторых случаях, носитель состоит из части полипептида Cholix. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 206-425 в SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 150-205 в SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом на любой из аминокислот 150 to 195 of SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 1 to 41 of SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 35-40 в SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, начиная с аминокислотного положения 40 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, до любого из аминокислотных положений 150-205 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, полипептид Cholix имеет С-конец в любом из аминокислотных положений 150-187 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях, полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В некоторых случаях, аминокислотные положения пронумерованы на основе выравнивания полипептида Cholix с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, где аминокислотные положения пронумерованы от N-конца до С-конца и начинаются с положения 1 на N-конце. В некоторых случаях, композиция содержит частицу.

[0056] Одним из аспектов настоящего изобретения является композиция, содержащая инсулин, в которой, по меньшей мере, 20% инсулина остается интактным

через 1 час в анализе панкреатина, включающем инкубацию композиции, содержащей инсулин, с панкреатином при температуре 37°C. В некоторых случаях, 10 мкг инсулина инкубируют в течение 1 часа с 10 мкг панкреатина при температуре 37°C. В некоторых случаях, композиция дополнительно содержит носитель, полученный из бактериального токсина, при этом носитель способен транспортироваться в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку. В некоторых случаях носитель состоит из части полипептида Cholix. В некоторых случаях, композиция содержит катион переходного металла. В некоторых случаях, катион переходного металла выбран из группы, состоящей из Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} . В некоторых случаях, катионом переходного металла является Zn^{2+} . В некоторых случаях, композиция содержит поликатион. В некоторых случаях, поликатион представляет собой протамин. В некоторых случаях, композиция содержит частицы. В некоторых случаях, частица представляет собой микрочастицу. В некоторых случаях, микрочастицы получают путем распылительной сушки. В некоторых случаях, частицы имеют диаметр от примерно 50 нм до примерно 20 мкм.

[0057] Другим аспектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая любую описанную в настоящем документе композицию и консервант.

[0058] Другим аспектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая любую описанную в настоящем документе композицию и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0059] В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту любой описанной в настоящем документе фармацевтической композиции.

[0060] Заболевание может представлять собой воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание, злокачественную опухоль или нарушение обмена веществ.

[0061] Заболевание может представлять собой метаболическое расстройство. Метаболическое расстройство может представлять собой сахарный диабет (T1D или T2D), диабет вследствие ожирения, гипергликемию, дислипидемию, гипертриглицеридемию, метаболический синдром X, инсулинорезистентность, нарушенную гликемию натощак, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическую дислипидемию, гиперлипидемию, жировую болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, гепатит, ожирение, сосудистые заболевания, болезни сердца, инсульт, нарушение толерантности к глюкозе, повышенный уровень глюкозы натощак, инсулинорезистентность, секрецию альбумина с мочой, центральный тип ожирения, гипертонию, повышенный уровень триглицеридов, повышенный уровень холестерина ЛПНП и пониженный уровень холестерина ЛПВП, гипергликемию, гиперинсулинемию, дислипидемию, кетоз, гипертриглицеридемию, метаболический синдром X, инсулинорезистентность, нарушенную гликемию натощак, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическую дислипидемию, глюконеогенез, избыточный гликогенолиз, диабетический

кетацидоз, гипертриглицеридемия, артериальная гипертензия, диабетическая нефропатия, почечная недостаточность, декомпенсированная почечная недостаточность, гиперфагия, атрофия мышц, диабетическая невропатия, диабетическая ретинопатия, диабетическая кома, артериосклероз, ишемическая болезнь сердца, заболевание периферических артерий или гиперлипидемия.

[0062] Композиция может представлять собой частицу, где композиция содержит гетерологичную нагрузку, и при этом композиция содержит поликатион, при этом носитель способен транспортировать гетерологичную нагрузку в поляризованную эпителиальную клетку или осуществлять транцитоз гетерологичной нагрузки через поляризованную эпителиальную клетку.

[0063] Носитель может быть связан с поликатионом. Поликатион может представлять собой протамин, полилизин, полиорнитин, полиэтиленимин (PEI), проламин, протамин, поливинилпирролидон (PVP), полиаргинин, поливиниламин или их комбинацию. Поликатион может представлять собой соль протамина. Соль протамина может представлять собой сульфат протамина, ацетат протамина, бромид протамина, хлорид протамина, капроат протамина, трифторацетат протамина, бикарбонат протамина (HCO_3), пропионат протамина, лактат протамина, формиат протамина, нитрат протамина, цитрат протамина, моногидрофосфат протамина, дигидрофосфат протамина, тартрат протамина или перхлорат протамина. Соль протамина может представлять собой сульфат протамина.

[0064] Аспект настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую любую описанную в настоящем документе частицу, в которой гетерологичная нагрузка представляет собой агент, снижающий уровень глюкозы.

[0065] В некоторых случаях, агент, снижающий уровень глюкозы, выбран из группы, состоящей из инсулина и аналога инсулина. В некоторых случаях, инкапсулированная частица высвобождает нагрузку при высоком значении pH, но не при низком значении pH.

[0066] Другой аспект настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую любую описанную в настоящем документе частицу и консервант. В некоторых случаях, фармацевтическая композиция дополнительно содержит модификатор тонуса.

[0067] В одном из аспектов, в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая носитель, полученный из бактериального токсина, причем носитель способен транспортироваться в поляризованную эпителиальную клетку или транцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку, в которой по меньшей мере 30% носителя остается интактным через 0,5 часа в анализе панкреатина, включающем инкубацию композиции, содержащей 100 мкг носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл ФСБ при температуре 37°C.

[0068] По меньшей мере 40% носителя может оставаться интактным через 0,5 часа в анализе панкреатина, включающем инкубацию композиции, содержащей 100 мкг

носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл ФСБ при температуре 37°C. По меньшей мере 50% носителя может оставаться интактным через 0,5 часа в анализе панкреатина, включающем инкубацию композиции, содержащей 100 мкг носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл ФСБ при температуре 37°C. По меньшей мере 60% носителя может быть интактным через 0,5 часа в анализе панкреатина, включающем инкубацию композиции, содержащей 100 мкг носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл ФСБ при температуре 37°C. По меньшей мере 90% носителя может оставаться интактным через 2 часа в анализе панкреатина, включающем инкубацию композиции, содержащей 100 мкг носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл ФСБ при температуре 37°C.

[0069] Композиция может дополнительно содержать катион. Катион может представлять собой катион металла или поликатион. Катион может представлять собой катион металла. Катион металла может представлять собой катион переходного металла.

[0070] Аспект настоящего изобретения представляет собой композицию, содержащую (а) носитель, полученный из бактериального токсина, и (b) катион или поликатион переходного металла, при этом носитель способен проникать в поляризованную эпителиальную клетку и/или транцитироваться через поляризованную эпителиальную клетку.

[0071] Один из аспектов настоящего изобретения включает способ, включающий комбинирование носителя бактериального происхождения с гетерологичной нагрузкой и катионом для получения частицы. В некоторых случаях, гетерологичная нагрузка выбрана из группы, состоящей из красителя, радиофармацевтического средства, гормона, цитокина, ингибитора ФНО, средства, снижающего уровень глюкозы, опухлеассоциированного антигена, пептида и полипептида. В некоторых случаях, способ дополнительно включает распылительную сушку носителя, полученного из бактерий, гетерологичной нагрузки и катиона. В некоторых случаях способ включает (а) получение смеси, состоящей из выделенного носителя и нагрузки; (b) получение смеси, содержащей сульфат протамина и NaPO_4 ; и (с) объединение смеси (а) со смесью (b) и выдерживание объединенной смеси в течение ночи при комнатной температуре. В некоторых случаях, способ дополнительно включает стадию (d) разрушения частиц со стадии (с) на более мелкие частицы путем увеличения ионной силы объединенной смеси со стадии (с). В некоторых случаях, препарат на стадии (а) не содержит ZnCl_2 . В некоторых случаях, препарат стадии (а) содержит ZnCl_2 .

[0072] В одном из аспектов, в настоящем документе предложена конструкция для доставки, содержащая вариант Cholix, который не содержит аминокислоты 1-348 SEQ ID NO: 75 и не представляет собой SEQ ID NO: 76, в комплексе с гетерологичной нагрузкой, где гетерологичная нагрузка представляет собой агент, регулирующий уровень глюкозы, и при этом носитель способен а) транцитозировать гетерологичную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку или б) транспортировать гетерологичную нагрузку в поляризованную эпителиальную клетку. Нагрузка может представлять собой инкретин или миметик инкретина. Нагрузка может содержать агонист рецептора GLP-1.

Нагрузка может содержать любую из SEQ ID NO: 26-34 или 17. Нагрузка может состоять из SEQ ID NO: 15. Нагрузка может состоять из SEQ ID NO: 29. Нагрузка может состоять из SEQ ID NO: 16. Нагрузка может состоять из SEQ ID NO: 17. Нагрузка может состоять из SEQ ID NO: 33. Нагрузка может состоять из SEQ ID NO: 34. Нагрузка может представлять собой агонист рецептора GIP. Нагрузка может включать любую из SEQ ID NO: 33 или 36-38.

[0073] Нагрузкой может представлять собой инсулин. Инсулин может содержать SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48; или SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50. Инсулин может содержать SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48. Инсулин может содержать SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50. Нагрузка может быть любой нагрузкой из SEQ ID NO: 51-63.

[0074] Вариант Cholix может представлять собой последовательность, указанную в SEQ ID NO: 81, или ее фрагмент или вариант последовательности. Носитель может быть нековалентно связан с гетерологичной нагрузкой. Носитель может быть ковалентно связан с гетерологичной нагрузкой.

[0075] Конструкция для доставки может представлять собой один полипептид. Конструкция для доставки может дополнительно содержать расщепляемый линкер, при этом расщепление линкера высвобождает нагрузку из носителя. Носитель может быть расположен на С-конце полипептида, причем нагрузка может находиться на N-конце полипептида. Носитель может содержать SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 65; или SEQ ID NO: 73. Носитель может иметь, по меньшей мере, 90% аминокислотную идентичность укороченному с С-конца варианту SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать укороченный с С-конца вариант SEQ ID NO: 81. Носитель может состоять из первых 195, 206, 244, 250, 266, 386 или 415 аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 81. Гетерологичная нагрузка может быть сконфигурирована для связывания рецептора.

[0076] Также в настоящем документе предложен способ лечения метаболического расстройства у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества любой из указанных выше конструкций для доставки. Метаболическим расстройством может быть диабет и/или ожирение.

[0077] Любой аспект или случай, описанный в настоящем документе, может быть объединен с любым другим аспектом случая, описанного в настоящем документе.

ВКЛЮЧЕНИЕ СВЕДЕНИЙ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0078] Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в настоящем описании, включены здесь посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0079] Патентный файл или файл заявки содержит по меньшей мере один чертеж, выполненный в цвете. Копии публикации настоящего патента или патентной заявки с

цветным(и) чертежем(ами) будут предоставлены *Ведомством по запросу и уплате пошлины*. Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения можно получить посредством следующего подробного описания, в котором представлены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы изобретения, а также прилагаемых чертежей, в которых:

[0080] Фиг.1А представляет собой цифровое изображение, отображающее самособирающиеся микрочастицы на основе слитой молекулы-протамина, полученные способом, описанные в примере 1, суспендированные в буфере с низкой ионной силой (0,05 М). **Фиг.1В** представляет собой цифровое изображение, отображающее самособирающиеся микрочастицы на основе слитой молекулы-протамина, полученные способом, описанные в примере 1, суспендированные в буфере с высокой ионной силой (>1 М). **Фиг.1С** представляет собой цифровое изображение, отображающее микрочастицы на **фиг.1В**, возвращенные в буфер с низкой ионной силой (0,05 М). Частицы визуализировали посредством системы GE Cytel в режиме светлого поля высокой мощности (10×).

[0081] Фиг.2А представляет собой цифровое изображение, отображающее самособирающиеся микрочастицы на основе инсулина-протамина, полученные способом, описанным в примере 2, в режиме светлого поля. **Фиг.2В** представляет собой цифровое изображение, отображающее самособирающиеся микрочастицы на основе инсулина-протамина, полученные способом, описанным в примере 2, которые демонстрируют ФИТЦ(флуоресцеина изотиоцианат)-флуоресценцию в режиме синего поля. **Фиг.2С** представляет собой цифровое изображение, представляющее объединенное изображение светлого поля и синего поля, показанных на **фиг.2А** и **фиг.2В**. Объединенное изображение показывает ФИТЦ-флуоресценцию микрочастиц инсулина. Частицы визуализировали посредством системы GE Cytel в режиме яркого или синего поля высокой мощности (10×). ФИТЦ-флуоресцентную визуализацию осуществляли посредством возбуждения образца при длине волны 381 нм и регистрации флуоресцентного излучения при 435 нм. Синяя стрелка указывает на частицу размером примерно 150 мкм.

[0082] Фиг.3А представляет собой цифровое изображение, описывающее самособирающиеся микрочастицы на основе слитой молекулы-протамина-цинка, полученные способом, описанным в примере 3, в режиме красного поля.

[0083] Фиг.3В представляет собой цифровое изображение аналогичного синтеза микрочастиц на основе слитой молекулы-протамина-цинка в режиме светлого поля. Частицы визуализировали посредством системы GE Cytel в режиме высокой мощности (10×) светлого или красного поля. Красную флуоресценцию визуализировали путем возбуждения образца при 481 нм и регистрации флуоресцентного излучения при 535 нм.

[0084] Фиг.4А представляет собой цифровое изображение, описывающее самособирающиеся микрочастицы на основе слитой молекулы-протамина (без $ZnCl_2$),

полученные способом, описанным в примере 3, в режиме светлого поля. **Фиг.4В** представляет собой цифровое изображение аналогичных частиц в режиме красного поля. Частицы визуализировали посредством системы GE Cytel в режиме высокой мощности (10×) светлого или красного поля. Красную флуоресценцию визуализировали путем возбуждения образца при 481 нм и регистрации флуоресцентного излучения при 535 нм.

[0085] На **фиг.5А** показан профиль растворения для композиции 37-156 при значении pH 2 и 7 и при повышении значения pH с 2 до 7.

[0086] На **фиг.5В** показан профиль растворения для композиции 37-167 при pH 2 и pH 7 и при повышении значения pH с 2 до 7.

[0087] На **фиг.5С** показан профиль растворения полученных наночастиц при значении pH 2 и 7 и при повышении значения pH с 2 до 7.

[0088] На **фиг.6** показана стабильность инсулина при воздействии различных композиций наночастиц на панкреатин.

[0089] На **фиг.7А** показаны срезы тонкого кишечника крысы через 15 минут после внутрикишечной инъекции 37-49 hGH/SEQ ID NO: 3/Eudragit FS частиц. hGH показан зеленым цветом, а SEQ ID NO: 3 показан красным. На **фиг.7В** показаны срезы тонкого кишечника крысы через 30 минут после внутрикишечной инъекции частиц 37-49 hGH/SEQ ID NO: 3/Eudragit FS. hGH показан зеленым цветом, а SEQ ID NO: 3 показан красным.

[0090] На **фиг.7С** показаны срезы тонкого кишечника крысы через 45 минут после внутрикишечной инъекции частиц с 37-49 hGH/SEQ ID NO: 3/Eudragit FS. Зеленым цветом показан hGH, а SEQ ID NO: 3 показан красным цветом.

[0091] На **фиг.7D** показаны срезы тонкого кишечника крысы через 60 минут после внутрикишечной инъекции частиц с 37-49 hGH/SEQ ID NO: 3/Eudragit FS. hGH показан зеленым цветом, а SEQ ID NO: 3 показан красным.

[0092] На **фиг.8** показаны уровни hGH в сыворотке крыс, которым вводили содержащие hGH частицы через желудочный зонд.

[0093] На **фиг.9** показаны уровни hGH, транспортируемые через клетки Caco-2 при доставке в различных композициях.

[0094] На **фиг.10А** показано высвобождение эксенатида *in vitro*, анализируемое посредством обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), из 5 частиц, представленных в **таблице 3**, при значениях pH, составляющих 5, 7, 7,5 и 10, в указанные моменты времени.

[0095] На **фиг.10В** показано высвобождение эксенатида *in vitro*, анализируемое посредством ОФ ВЭЖХ, из 5 дополнительных частиц, представленных в **таблице 3**, при значениях pH 5, 7, 7,5 и 10 в указанные моменты времени.

[0096] На **фиг.10С** показано высвобождение эксенатида *in vitro*, анализируемое посредством эксклюзионной хроматографии (SEC), из 5 частиц, представленных в **таблице 3**, при значениях pH 5, 7, 7,5 и 10 в указанные моменты времени.

[0097] На **фиг.10D** показано высвобождение эксенатида *in vitro*, анализируемое

посредством эксклюзионной хроматографии (SEC), из 5 дополнительных частиц, представленных в **таблице 3**, при значениях pH 5, 7, 7,5 и 10 в указанные моменты времени.

[0098] На **фиг.11А-С** показана стабильность панкреатина SEQ ID NO: 3 и/или эксенатида в различных композициях, описанных в настоящем документе. На **фиг.11А** показана стабильность панкреатина SEQ ID NO: 3 и/или эксенатида в цинксодержащих композициях, на **фиг.11В** показана стабильность панкреатина SEQ ID NO: 3 и/или эксенатида в композициях, содержащих протамин, и на **фиг.11С** показана стабильность панкреатина эксенатида в композиции цинка и эксенатида.

[0099] На **фиг.12А** показано изображение конфокальной микроскопии композиции SEQ ID NO: 3, ФИТЦ-эксенатида и цинка с визуализированным ФИТЦ-эксенатидом.

[0100] На **фиг.12В** показано изображение конфокальной микроскопии композиции SEQ ID NO: 3, ФИТЦ-эксенатида и цинка, с SEQ ID NO: 3, визуализируемой мечеными Alexa 647 антителами против SEQ ID NO: 3.

[0101] На **фиг.12С** показано объединенное изображение **фиг.12А** и **12В**.

[0102] На **фиг.13** показано распределение частиц по размерам композиции на **фиг.12А-С**.

[0103] На **фиг.14** показан транспорт описанных в настоящем документе композиций через клетки SMI-100.

[0104] На **фиг.15** показан схематический пример способа получения кислотоустойчивых частиц, содержащих носитель CholiX, цинк и эксенатид.

[0105] На **фиг.16** показаны способы, в которых прохождение микрочастиц через различные слои слизи и эпителия может быть обнаружено с использованием способов *in vitro* или *in vivo*.

[0106] На **фиг.17А** показана стабильность панкреатина SEQ ID NO: 3 и/или эксенатида в различных композициях, описанных в настоящем документе.

[0107] На **фиг.17В** показана стабильность панкреатина SEQ ID NO: 3 и/или ФИТЦ-эксенатида в различных композициях, описанных в настоящем документе.

[0108] На **фиг.18** показана хроматограмма, полученная методом хроматографии с обращенной фазой (ОФ ВЭЖХ), показывающая присутствие SEQ ID NO: 3 при времени удерживания 6,8 мин, а также эксенатида при времени удерживания 7,5 мин.

[0109] На **фиг.19** показано высвобождение эксенатида *in vitro*, анализируемое методом ОФ ВЭЖХ из композиций E0, E14, E18, E0-ФИТЦ, E14-ФИТЦ и E18-ФИТЦ при значениях pH, составляющих 1, 5 и 7, в указанные моменты времени при температуре 37°C.

[0110] На **фиг.20** показаны концентрации эксенатида в сыворотке крови крыс, которым внутрикишечно вводили композиции E0, E14 и E18.

[0111] На **фиг.21** показаны концентрации эксенатида в сыворотке крови крыс, которым вводили эксенатид внутривенно.

[0112] На **фиг.22** показана чистота SEQ ID NO: 70-эксенатида (SEQ ID NO: 70,

сшитая с эксенатидом) с использованием геля, окрашенного кумасси синим, в ДСН-ПААГ-электрофорезе.

[0113] На **фиг.23** показан транцитоз *in vivo* эксенатида, поперечно сшитого с носителями SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 70 через тощую кишку крыс линии Sprague Dawley. Количество (в пмоль) эксенатида, транспортируемого через ткани кишечника, измеряли через 10 и 40 минут после обработки. Данные показывают, что как SEQ ID NO: 80-эксенатид, так и SEQ ID NO: 70-эксенатид способны к транспорту с более высокой скоростью, чем только эксенатид в течение 10 и 40 минут.

[0114] На **фиг.24** показан профиль временной зависимости концентрации сахара в крови после теста с глюкозной нагрузкой. Эффекты SEQ ID NO: 70-эксенатид, вводимый перорально через желудочный зонд, сравнивали с обработкой негативным контролем (пероральный буфер) и эксенатидом, вводимым посредством внутривенной инъекции, в качестве положительного контроля. Эти результаты демонстрируют, что SEQ ID NO: 70-эксенатид снижает повышение уровней глюкозы в крови после теста с глюкозной нагрузкой.

[0115] На **фиг.25** показано, что SEQ ID NO: 11 может связываться с рецептором GLP-1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Общее описание

[0116] В настоящем документе предусмотрены способы и композиции, которые могут содержать (a) носитель, полученный из бактериального токсина, и (b) катион переходного металла или поликатион, где носитель способен проникать в поляризованную эпителиальную клетку или транцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку. Носителем, полученным на основе бактериального токсина, может быть, например, полипептид Cholix (например, на основе *Vibrio cholerae*) или экзотоксин *Pseudomonas* (PE) A, например, на основе *Pseudomonas aeruginosa*. Композиции могут дополнительно содержать нагрузку, например, гетерологичную нагрузку (например, нагрузка не является носителем, например, Cholix или PE), например, терапевтическую нагрузку. Композиции могут быть в форме частиц, например, микрочастиц или наночастиц, и могут быть получены, например, путем распылительной сушки и/или лиофилизации. Представленные в настоящем документе способы включают введение композиций субъекту. В некоторых случаях, композиции могут быть составлены таким образом, чтобы они, оставаясь интактными, проходили через кислую среду желудка (например, частицы могут представлять собой кислотоустойчивые микрочастицы). На **фиг.16** представлена схема, иллюстрирующая проникновение частиц через образцы слизи, тонкий слой слизи над культивируемыми клетками и нормальный слой слизи над эпителиальными клетками *in vivo*. Частицы могут становиться растворимыми при значениях pH 5-7 и, например, могут поддерживать связывание или транспорт в восстановленном слизистом слое, оцениваемом в исследовании переноса с использованием культивируемых слоев эндотелиальной ткани или через ткани кишечника

в моделях *in vitro* или *in vivo*. В некоторых случаях, композиции, представленные в настоящем документе, могут быть получены для доставки субъекту другими способами, таким как, доставка в дыхательные пути.

[0117] Также в настоящем документе предложены способы и композиции, содержащие носитель, способный проникать в поляризованную эпителиальную клетку или осуществлять трансцитоз через поляризованную эпителиальную клетку, а также гетерологичную нагрузку, где молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю составляет более 1:1.

[0118] В настоящем документе предусмотрены способы и композиции, содержащие носитель, при этом носитель способен проникать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку, причем, по меньшей мере, 60% носителя остается интактным через 0,5 часа в анализе панкреатина, где анализ панкреатина включает инкубацию композиции, содержащей 100 мкг носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) при температуре 37°C. В настоящем документе представлены способы получения указанных композиций и способы введения указанных композиций субъекту.

[0119] Также в настоящем документе предусмотрены способы и композиции, содержащие вариант Cholix, оканчивающийся в положении 195-347, и гетерологичную нагрузку, причем гетерологичная нагрузка представляет собой агент, регулирующий уровень глюкозы. Также в настоящем документе предусмотрены композиции, содержащие носитель, связанный с агентом, регулирующим уровень глюкозы.

[0120] Также в настоящем документе предусмотрены фармацевтические композиции, включающие композиции, представленные в настоящем документе, способы изготовления представленных в настоящем документе композиций и способы введения представленных в настоящем документе композиций субъекту, например, субъекту с нарушением регуляции уровня глюкозы.

II. Частицы

[0121] Представленные в настоящем документе композиции могут содержать одну или несколько частиц. Одна или несколько частиц могут содержать одну или несколько микрочастиц или наночастиц. Одна или несколько частиц могут содержать один или несколько носителей, одну или несколько нагрузок (например, гетерологичные нагрузки) и/или один или несколько катионов. Один или несколько катионов могут представлять собой один или несколько поликатионов, например, протамин. Один или несколько катионов могут представлять собой один или несколько катионов металлов. Один или несколько катионов металлов могут представлять собой один или несколько катионов переходных металлов. Один или несколько катионов металлов могут представлять собой один или несколько катионов двухвалентных металлов. Один или несколько катионов переходных металлов могут представлять собой Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} . Один или несколько катионов переходных металлов могут представлять собой катион цинка. Катион одного или нескольких двухвалентных металлов может представлять собой

катион кальция (Ca^{2+}), хрома (Cr^{2+}), кобальта (Co^{2+}), железа (Fe^{2+}), магния (Mg^{2+}), марганца (Mn^{2+}), никеля (Ni^{2+}), меди (Cu^{2+}) или цинка (Zn^{2+}). Один или несколько катионов могут представлять собой протамин, полилизин, полиорнитин, полиэтиленимин (ПЭИ), проламин, поливинилпирролидон (ПВП), полиаргинин, поливиниламин или их сочетание. Один или несколько катионов могут представлять собой протаминовую соль.

[0122] Одна или несколько частиц, например, одна или несколько микрочастиц или наночастиц, могут представлять собой одну или несколько самособирающихся частиц, например стабильную самособирающуюся частицу, например, микрочастицу или наночастицу.

[0123] Представленные в настоящем документе композиции могут содержать один или несколько носителей и одну или несколько нагрузок и/или один или несколько катионов, например, один или несколько поликатионов. Один или несколько носителей и одна или несколько нагрузок могут быть связаны непосредственно или косвенно, ковалентно или нековалентно. Один или несколько носителей и одна или несколько нагрузок могут быть в форме слитой молекулы. В некоторых случаях, один или несколько носителей и одна или несколько нагрузок не включены в состав слитой молекулы. Слитая молекула носитель-нагрузка может транспортировать одну или несколько молекул нагрузки (например, одну или несколько терапевтических нагрузок) в эпителиальные клетки (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника). Носитель может быть способен транспортировать нагрузку в эпителиальные клетки или через них, используя эндогенные транспортные пути. Использование эндогенных транспортных путей, в отличие от использования пассивного переноса (пассивной диффузии), может позволить носителю быстро и эффективно перемещать нагрузку в эпителиальные клетки или через них, не нарушая барьерную функцию этих клеток или биологическую активность нагрузки. Одна или несколько нагрузок могут представлять собой полипептид, содержащий, состоящий из, или по существу состоящий из, последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 11 или 14-64 (см. **таблицу 12**).

[0124] Один или несколько носителей и один или несколько катионов могут быть связаны непосредственно или косвенно, ковалентно или нековалентно. Один или несколько носителей и один или несколько катионов могут быть в форме слитых молекул. В некоторых случаях, слитая молекула может собираться в микрочастицу или наночастицу с одной или несколькими нагрузками. Слитая молекула катион-носитель может транспортировать одну или несколько молекул нагрузки (например, одну или несколько терапевтических нагрузок) в эпителиальные клетки (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника). В некоторых случаях, один или несколько носителей и один или несколько катионов не связаны непосредственно или ковалентно. В некоторых случаях, один или несколько носителей и один или несколько катионов не являются частью слитой молекулы.

[0125] В некоторых случаях, один или несколько катионов представляют собой протамин или соль протамин. Протамин может относиться к группе сильноосновных

белков, присутствующих в сперматогониях в солеподобной комбинации с нуклеиновыми кислотами. Протамины можно получить из лосося (salmine), радужной форели (iridine), сельди (clupeine), осетра (sturine), испанской макрели или тунца (thynnine). Пептидная композиция состав конкретного протамина может изменяться в зависимости от того, из какого семейства, рода или вида рыб он получен. Протамин может содержать четыре основных компонента, например, одноцепочечные пептиды, содержащие примерно 30-32 остатка, из которых примерно 21-22 представляют собой аргинины. N-концевой остаток может представлять собой пролин для каждого из четырех основных компонентов. Следовательно, можно ожидать, что химическая модификация протамина посредством конкретной соли будет гомогенной. Соль протамина может быть получена из лосося. Соль протамина может быть получена из сельди. Соль протамина может быть получена из радужной форели. Соль протамина может быть получена из тунца.

[0126] Одна или несколько частиц, например, одна или несколько микрочастиц или наночастиц, могут содержать соль протамина, выбранную из группы, состоящей из сульфата протамина, ацетата протамина, бромида протамина, хлорида протамина, капроата протамина, трифторацетата протамина, бикарбоната протамина (HCO_3), пропионата протамина, лактата протамина, формиата протамина, нитрата протамина, цитрата протамина, моногидрофосфата протамина, дигидрофосфата протамина, тартрата протамина, перхлората протамина и смеси любых двух солей протамина. Соль протамина может быть объединена с другими компонентами в жидкой среде перед образованием частиц, например, путем осаждения или распылительной сушки. Соль протамина в жидкой среде, перед образованием частиц, может иметь концентрацию от примерно 0,05 мг/мл до примерно 0,10 мг/мл, от примерно 0,10 мг/мл до примерно 0,15 мг/мл, от примерно 0,15 мг/мл до примерно 0,20 мг/мл, от примерно 0,20 мг/мл до примерно 0,25 мг/мл, от примерно 0,25 мг/мл до примерно 0,30 мг/мл, от примерно 0,30 мг/мл до примерно 0,35 мг/мл, от примерно 0,35 мг/мл до примерно 0,40 мг/мл, от примерно 0,40 мг/мл до примерно 0,45 мг/мл или от примерно 0,45 мг/мл до примерно 0,5 мг/мл. Соль протамина может представлять собой смесь двух разных солей, где одна соль представляет собой сульфат, а другая соль представляет собой ацетат, пропионат, лактат, формиат или нитрат протамина. Молярное соотношение между двумя различными солями может составлять от примерно 0,1 до примерно 1, от примерно 0,2 до примерно 1, от примерно 0,3 до примерно 1, от примерно 0,4 до примерно 1, от примерно 0,5 до примерно 1, от примерно 0,6 до примерно 1, от примерно 0,7 до примерно 1, от примерно 0,8 до примерно 1 и от примерно 0,9 до примерно 1.

[0127] Частица может дополнительно содержать ион двухвалентного металла, например цинка, кобальта, магния или кальция, или сочетания этих ионов. Ион металла может представлять собой цинк.

[0128] В некоторых примерах, частицы могут быть образованы путем объединения носителя и катиона в соотношении от примерно 1:0,001 до примерно 1:2000 по массе (носитель:катион). В некоторых случаях, носитель и катион могут быть объединены в

соотношении примерно от 1:0,01 до примерно 1:500 по массе. В некоторых случаях, носитель и катион могут быть объединены в соотношении примерно от 1:0,08 до примерно 1:173 по массе. В некоторых случаях, носитель и катион могут быть объединены в соотношении примерно от 1:0,1 до примерно 1:200 по массе. В некоторых случаях, носитель и катион могут быть объединены в соотношении примерно от 1:0,1 до примерно 1:5 по массе. В некоторых случаях, носитель и катион могут быть объединены в соотношении примерно от 1:0,08 до примерно 1:1,6 по массе. В некоторых случаях, носитель и катион могут быть объединены в соотношении от примерно 1:8 до примерно 1:180 по массе. В других примерах, частицы могут быть образованы путем объединения носителя и катиона в соотношении от примерно 0,01:1 до примерно 0,2:1 по массе. В некоторых случаях, носитель и катион могут быть объединены в соотношении примерно 1:1 по массе. В некоторых случаях, носитель и катион могут быть объединены в соотношении, по меньшей мере, примерно 1:0,001, 1:0,01, 1:0,08, 1:0,1, 1:0,16, 1:0,2, 1:0,3, 1:0,32, 1:0,4, 1:0,8, 1:1, 1:1,6, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:8,6, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:86, 1:90, 1:100, 1:150, 1:172, 1:200 или 1:2000 по массе. В некоторых случаях, носитель и катион могут быть объединены в соотношении меньше, чем примерно 1:0,001, 1:0,01, 1:0,08, 1:0,1, 1:0,16, 1:0,2, 1:0,3, 1:0,32, 1:0,4, 1:0,8, 1:1, 1:1,6, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:8,6, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:86, 1:90, 1:100, 1:150, 1:172 или 1:200, 1:2000 по массе.

[0129] В некоторых примерах, частицы могут быть образованы путем объединения нагрузки слитой молекулы и катиона в соотношении примерно от 1:0,001 до примерно 1:2000 по массе (нагрузка слитая молекула:катион). В некоторых случаях, нагрузка слитая молекула и катион могут быть объединены в соотношении примерно от 1:0,01 до примерно 1:500 по массе. В некоторых случаях, нагрузка слитая молекула и катион могут быть объединены в соотношении примерно от 1:0,08 до примерно 1:173 по массе. В некоторых случаях, нагрузка слитая молекула и катион могут быть объединены в соотношении примерно от 1:0,1 до примерно 1:200 по массе. В некоторых случаях, нагрузка слитая молекула и катион могут быть объединены в соотношении примерно от 1:0,1 до примерно 1:5 по массе. В некоторых случаях, нагрузка слитая молекула и катион могут быть объединены в соотношении примерно от 1:0,08 до примерно 1:1,6 по массе. В некоторых случаях, нагрузка слитая молекула и катион могут быть объединены в соотношении примерно от 1:8 до примерно 1:180 по массе. В других примерах, частицы могут быть образованы путем объединения нагрузки слитой молекулы и катиона в соотношении от примерно 0,01:1 до примерно 0,2:1 по массе. В некоторых случаях, нагрузка слитая молекула и катион могут быть объединены в соотношении примерно 1:1 по массе. В некоторых случаях, нагрузка слитая молекула и катион могут быть объединены в соотношении, по меньшей мере, примерно 1:0,001, 1:0,01, 1:0,08, 1:0,1, 1:0,16, 1:0,2, 1:0,3, 1:0,32, 1:0,4, 1:0,8, 1:1, 1:1,6, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:8,6, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50,

1:60, 1:70, 1:80, 1:86, 1:90, 1:100, 1:150, 1:172 или 1:200, 1:2000 по массе. В некоторых случаях, нагрузка слитая молекула и катион могут быть объединены в соотношении менее примерно 1:0,001, 1:0,01, 1:0,08, 1:0,1, 1:0,16, 1:0,2, 1:0,3, 1:0,32, 1:0,4, 1:0,8, 1:1, 1:1,6, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:8,6, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:86, 1:90, 1:100, 1:150, 1:172 или 1:200, 1:2000 по массе.

[0130] В некоторых примерах, частицы могут быть образованы путем объединения носителя и нагрузки в соотношении от примерно 0,01:1 до примерно 1:2, от примерно 0,0116:1 до примерно 1:1, от примерно 0,2:1 до примерно 1:1 по массе. В некоторых случаях, носитель с нагрузкой могут быть объединены в соотношении, составляющем по меньшей мере 0,01:1, 0,0116:1, 0,02:1, 0,0232:1, 0,03:1, 0,04:1, 0,05:1, 0,06:1, 0,07:1, 0,08:1, 0,09:1, 0,1:1, 0,2:1, 0,232:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1 или 2:1 по массе. В некоторых случаях, носитель с нагрузкой может быть объединен в соотношении меньше, чем 0,01:1, 0,0116:1, 0,02:1, 0,0232:1, 0,03:1, 0,04:1, 0,05:1, 0,06:1, 0,07:1, 0,08:1, 0,09:1, 0,1:1, 0,2:1, 0,232:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1 или 2:1 по массе.

[0131] В некоторых примерах, частица или композиция могут содержать носитель и катион (например, Zn^{2+} или протамин) при соотношении носителя к катиону от примерно 5:1 до примерно 1:5 по молям, примерно от 10:1 до 1:10 по молям, от примерно 2:1 до примерно 1:2 по молям, от примерно 1:10 до примерно 1:1000 по молям, от примерно 1:30 до примерно 1:700 по молям, от примерно от 1:100 до примерно 1:300000 по молям или от примерно 1:1000 до примерно 1:30000 по молям. Отношение носителя к катиону может составлять примерно 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:500, 1:650, 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:40000, 1:50000, 1:75000, 1:100000, 1:200000 или 1:300000 по молям. В некоторых случаях, соотношение носителя и катиона составляет по меньшей мере 1:300000, 1:200000, 1:100000, 1:50000, 1:30000, 1:25000, 1:20000, 1:15000, 1:10000, 1:5000, 1:3000, 1:2800, 1:2000, 1:1500, 1:1000, 1:500, 1:100, 1:50, 1:25, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1, 1:12, 1:1 или 10:1 по молям. В некоторых случаях, отношение носителя к катиону составляет меньше, чем 1:300000, 1:200000, 1:100000, 1:50000, 1:30000, 1:25000, 1:20000, 1:15000, 1:10000, 1:5000, 1:3000, 1:2800, 1:2000, 1:1500, 1:1000, 1:500, 1:2, 1:1, 1:12 или 1:1 по молям. В некоторых случаях, носитель может присутствовать в частице в виде мономера, димера, тримера или другого комплекса. Отношение носителя к катиону может быть определено исходя из молей мономеров носителя. Если катион находится в соли, для определения отношения можно использовать количество или моли самого катиона, а не количество или моли соли, содержащей катион.

[0132] Частица или композиция может содержать носитель и нагрузку при соотношении носителя к нагрузке от примерно 1:1 до примерно 1:10 по молям, от примерно 10:1 до примерно 1:1000 по молям, от примерно от 1:1 до примерно 1:1000 по

молям, от примерно 1:10 до примерно 1:1000 по молям, от примерно 1:10 до примерно 1:6000 на моль, от примерно 1:1 до примерно 1:100 по молям, от примерно 1:5 до примерно 1:20 по молям, примерно 1:7 по молям или примерно 1:716 по молям. В некоторых случаях, частица или композиция может содержать носитель и нагрузку при соотношении носителя к нагрузке, которое составляет меньше, чем примерно 1:1, примерно 1:2, примерно 1:5, примерно 1:7, примерно 1:10, примерно 1:20, примерно 1:30, примерно 1:60, примерно 1:70, примерно 1:80, примерно 1:90, примерно 1:100, примерно 1:125, примерно 1:150, примерно 1:200, примерно 1:300, примерно 1:400, примерно 1:500, примерно 1:600, примерно 1:750, примерно 1:1000, примерно 1:2500, примерно 1:5000, примерно 1:6000 или около 1:50 по молям. В некоторых случаях, отношение носителя к нагрузке составляет по меньшей мере 1:6000, 1:5000, 1:4000, 1:3000, 1:2000, 1:1000, 1:900, 1:800, 1:700, 1:620, 1:617,06, 1:600, 1:500, 1:400, 1:310, 1:308,53, 1:200, 1:150, 1:125, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:5 или 1:1 по молям. В некоторых случаях, отношение носителя к нагрузке составляет меньше, чем примерно 1:6000, 1:5000, 1:4000, 1:3000, 1:2000, 1:1000, 1:900, 1:800, 1:700, 1:620, 1:617,06, 1:600, 1:500, 1:400, 1:310, 1:308,53, 1:200, 1:150, 1:125, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:5 или 1:1 по молям. Отношение носителя к нагрузке может составлять примерно 1:6000, 1:5000, 1:4000, 1:3000, 1:2000, 1:1000, 1:900, 1:800, 1:700, 1:620, 1:617,06, 1:600, 1:500, 1:400, 1:310, 1:308,53, 1:200, 1:150, 1:125, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:5 или 1:1 по молям. Отношение носителя к нагрузке может составлять примерно 1:6000, 1:5000, 1:4000, 1:3000, 1:2000, 1:1000, 1:900, 1:800, 1:700, 1:620, 1:617,06, 1:600, 1:500, 1:400, 1:310, 1:308,53, 1:200, 1:150, 1:125, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 5:1 или 10:1 по молям. В некоторых случаях, носитель или нагрузка, или они оба, могут присутствовать в виде мономеров, димеров, тримеров или других комплексов. Молярное отношение может быть определено путем сравнения мономеров носителя с мономерами нагрузки.

[0133] В некоторых случаях, носитель косвенно и нековалентно связан с нагрузкой. В таких случаях, частицы (например, липосомы, микрочастицы, наночастицы, металлические наночастицы, наночастицы на основе полимера и т.д.) могут содержать (например, внутри и/или на поверхности частицы) молекулы нагрузки (например, IL-10, IL-22, GLP-1 и т.д.), причем носители, например молекула(ы) носителя, полученного из Cholix или PE, могут быть связаны с такими наночастицами (например, на их поверхности). В некоторых случаях, могут образовываться частицы, которые содержат молекулы нагрузки и молекулы носителя, например, молекулы, полученные из cholix или PE.

[0134] В некоторых случаях, отношение (например, молярное отношение) нагрузки к носителю в представленной в настоящем документе композиции (например, частица) может составлять, 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 отношение может обеспечивать транспорт таких частиц, содержащих нагрузку (например, наночастицы), в поляризованные эпителиальные клетки или через них (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника) с использованием носителя, например, носителя, полученного из PE или Cholix, прикрепленного к поверхности. В некоторых случаях,

частица (например, наночастица) может высвобождать нагрузку после трансцитоза или внутриклеточной доставки. В случаях, когда частица (например, наночастица) переносится через эпителиальные клетки, высвобожденная нагрузка может связываться с рецепторами внутри подслизистой ткани (например, lamina propria) и/или может поступать в системный кровоток и, таким образом, обеспечивать определенную функцию (например, терапевтическую или диагностическую функцию) системно. В других случаях, когда частица (например, наночастица) высвобождает нагрузку внутри эпителиальной клетки, нагрузка (например, нуклеиновая кислота) может обеспечивать определенные внутриклеточные функции, например, продукцию транскриптов в этих клетках, модуляцию экспрессии генов и т.д.

[0135] Частица или композиция, например фармацевтическая композиция, может дополнительно содержать консервант, например, фенол, м-крезол, метил-п-гидроксibenзоат, пропил-п-гидроксibenзоат, 2-феноксietанол, бутил-п-гидроксibenзоат, 2-фенилэтанол, бензиловый спирт, хлорбутанол или тиомеросал или их смеси.

[0136] Композиция, например, фармацевтическая композиция, может дополнительно содержать модификатор тоничности, например, сахар или сахарный спирт, аминокислоту (например, L-глицин, L-гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновую кислоту, триптофан, треонин), альдит (например, глицерол (глицерин), 1,2-пропандиол (пропиленгликоль), 1,3-пропандиол, 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, ПЭГ400), глицерин, маннит, пропиленгликоль, диметилсульфон, метилсульфонилметан, трегалозу, сахарозу, сорбит, сахарозу, лактозу или их смеси.

[0137] Композиция, например фармацевтическая композиция, может дополнительно содержать буфер, например, ацетат натрия, карбонат натрия, цитрат, глицилглицин, гистидин, глицин, лизин, аргинин, дигидрофосфат натрия, динатрийгидрофосфат, фосфат натрия и трис(гидроксиметил)аминометан или их смеси.

[0138] Композиции по настоящему изобретению могут быть получены способом, например, описанным в Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985 или в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995, где методы фармацевтической промышленности включают растворение и смешивание ингредиентов, по мере необходимости, с получением желаемого конечного продукта.

[0139] В другом аспекте, в настоящем документе предложен способ получения частиц, например, микрочастиц или наночастиц, например, самособирающихся микрочастиц или наночастиц, содержащих носитель, нагрузку и катион. Носитель и нагрузка могут образовывать слитую молекулу. Способ может включать: (a) приготовление смеси, содержащей выделенный носитель и нагрузку (например, в виде слитой молекулы) и, необязательно, $ZnCl_2$; (b) приготовление смеси, включающей сульфат протамина и $NaPO_4$; и (c) объединение смеси (a) со смесью (b) и выдерживание объединенной смеси в течение ночи при комнатной температуре. Способ может дополнительно включать стадию (d) расщепления частиц со стадии (c) на более мелкие частицы, путем увеличения ионной силы объединенной смеси со стадии (c). В некоторых

случаях, препарат стадии (а) не включает ZnCl_2 . В некоторых случаях, препарат стадии (а) включает ZnCl_2 .

[0140] В некоторых случаях, носитель и нагрузка не образуют слитую молекулу. Способ может включать: (а) приготовление смеси, содержащей выделенный носитель и выделенную нагрузку и, необязательно, ZnCl_2 ; (b) приготовление смеси, содержащей сульфат протамина и NaPO_4 ; и (с) объединение смеси (а) со смесью (b) и выдерживание объединенной смеси в течение ночи при комнатной температуре. Способ может дополнительно включать стадию (d) расщепления частиц со стадии (с) на более мелкие частицы путем увеличения ионной силы объединенной смеси со стадии (с). В некоторых случаях, препарат на стадии (а) не включает ZnCl_2 . В некоторых случаях, препарат стадии (а) включает ZnCl_2 . В некоторых случаях, объединенная смесь (а) и (b) может быть высушена путем распыления с образованием микрочастиц или наночастиц. В некоторых случаях, микрочастицы или наночастицы могут быть получены с использованием доступной в продаже распылительной сушилки.

[0141] В некоторых случаях, носитель и катион могут образовывать слитую молекулу. Способ может включать: (а) приготовление смеси, содержащей слитую молекулу выделенного носителя и катиона, а также выделенную нагрузку и, необязательно, ZnCl_2 ; (b) приготовление смеси, содержащей выделенную нагрузку и NaPO_4 ; и (с) объединение смеси (а) со смесью (b) и выдерживание объединенной смеси в течение ночи при комнатной температуре. Способ может дополнительно включать стадию (d) расщепления частиц со стадии (с) на более мелкие частицы путем увеличения ионной силы объединенной смеси со стадии (с). В некоторых случаях, препарат на стадии (а) не включает ZnCl_2 . В некоторых случаях, препарат стадии (а) включает ZnCl_2 . В некоторых случаях, объединенная смесь (а) и (b) может быть высушена распылением с образованием микрочастиц или наночастиц. В некоторых случаях, микрочастицы или наночастицы могут быть получены с использованием доступной в продаже распылительной сушилки.

[0142] Нанораспылительная сушилка B-90 (Buchi, Switzerland) может производить белковые частицы размером от субмикрона до 2 микрон с узким распределением по размерам и контролируемым высвобождением активного фармацевтического ингредиента. Белки, такие как hGH, инсулин, могут быть высушены распылением в непрерывном одноэтапном процессе. Противоионы и полимерные вспомогательные вещества могут быть использованы для инкапсулирования и для достижения медленного высвобождения активного фармацевтического ингредиента. Система может быть совместима с водорастворимыми вспомогательными веществами и эмульсиями на водной основе. Скорость подачи пробы может составлять от 1 мл/мин до 3 мл/мин. Расход газа может составлять от 100 л/мин до 160 л/мин. Давление может соответствовать атмосферному давлению.

[0143] Концентрация белка может составлять примерно от 0,02 мкмоль до 1 мкмоль. Скорость подачи может составлять примерно от 100 л/мин до 200 л/мин. Температура на входе может составлять примерно от 80°C до 140°C. Температура

форсунки может составлять примерно от 30°C до 70°C. Можно использовать различные буферные растворы, такие как, например, карбонатный, ацетатный, лактатный, сукцинатный, фосфатный буферы и трис-буфер. Примеры вспомогательных веществ, которые можно использовать, включают гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), карбоксиметилцеллюлозу (CMC), альгинат, эудрагиты (Eudragits), хитозан, декстран, поли(молочно-гликолевую кислоту) (PLGA), плуроник, гуммиарабик и полисорбат 20. Неограничивающие примеры противоионов или молекул, которые включают противоионы, включают протамин, SEQ ID NO: конструкция 3, катионные проникающие в клетку пептиды, полиглутамат и гиалуроновую кислоту.

[0144] Частицы, например, самособирающиеся частицы или частицы, высушенные распылением, например, частицы протамина, частицы цинка или частицы цинка и протамина, могут иметь размер не больше, чем примерно 200 нм, не больше, чем примерно 300 нм, не больше, чем примерно 400 нм, не больше, чем примерно 500 нм, не больше, чем примерно 600 нм, не больше, чем примерно 700 нм, не больше, чем примерно 800 нм или не больше, чем примерно 900 нм. Самособирающиеся микрочастицы, например микрочастицы протамина, частицы цинка, частицы цинка и протамина, могут иметь размер не больше, чем примерно 10 нм, 20 нм, 30 нм, 40 нм, 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 110 нм, 120 нм, 130 нм, 140 нм, 150 нм, 160 нм, 170 нм, 180 нм, 190 нм, 200 нм, 250 нм, 300 нм, 350 нм, 400 нм, 450 нм, 500 нм, 600 нм, 700 нм, 800 нм, 900 нм, 1 мкм, не больше, чем примерно 5 мкм, не больше, чем примерно 10 мкм, не больше, чем примерно 15 мкм, не больше, чем примерно 20 мкм, не больше, чем примерно 25 мкм, не больше, чем примерно 30 мкм, не больше, чем примерно 35 мкм, не больше, чем примерно 40 мкм, не больше, чем примерно 45 мкм, не больше, чем примерно 50 мкм, не больше, чем примерно 55 мкм, не больше, чем примерно 60 мкм, не больше, чем примерно 65 мкм, не больше, чем примерно 70 мкм, не больше, чем примерно 75 мкм, не больше, чем примерно 80 мкм, не больше, чем примерно 85 мкм, не больше, чем примерно 90 мкм, не больше, чем примерно 95 мкм, не больше, чем примерно 100 мкм, не больше, чем примерно 105 мкм, не больше, чем примерно 110 мкм, не больше, чем примерно 115 мкм, не больше, чем примерно 120 мкм, не больше, чем примерно 125 мкм, не больше, чем примерно 130 мкм, не больше, чем примерно 135 мкм, не больше, чем примерно 140 мкм, не больше, чем примерно 145 мкм и не больше, чем примерно 150 мкм. В некоторых случаях, частицы имеют размер от около 1 мкм до около 20 мкм. В некоторых случаях, частицы имеют средний размер около 5 мкм $\pm$ 2 мкм. В некоторых случаях, частицы имеют средний размер около 150 мкм $\pm$ 50 мкм. В некоторых случаях, частицы имеют средний размер от примерно 30 нм до примерно 6000 нм, от примерно 60 нм до примерно 6000 нм, от примерно 30 нм до примерно 3000 нм, от примерно 60 нм до примерно 3000 нм, от примерно 100 нм до примерно 1000 нм, от примерно 200 нм до примерно 800 нм или от примерно 300 нм до примерно 600 нм. В некоторых случаях частицы имеют средний размер, составляющий по меньшей мере примерно 30 нм, 40 нм, 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 150 нм, 200 нм, 250 нм, 300 нм, 350 нм, 400 нм,

450 нм, 500 нм, 550 нм, 600 нм, 650 нм, 700 нм, 750 нм, 800 нм, 850 нм, 900 нм, 950 нм, 1000 нм, 1100 нм, 1200 нм, 1300 нм, 1400 нм, 1500 нм, 2000 нм, 3000 нм, 4000 нм, 5000 нм или 6000 нм.

[0145] Частицы, например микрочастицы и наночастицы, могут быть инкапсулированы. Натуральные и синтетические полимерные матрицы могут использоваться для инкапсуляции лекарственных средств и контролируемого высвобождения. Полимерные матрицы, используемые для инкапсуляции частиц, могут быть выбраны таким образом, чтобы частицы и лекарственное средство, содержащееся внутри частиц, высвобождались при желаемом значении pH, температуре или времени. Полимерные матрицы, используемые для инкапсуляции частиц, могут быть выбраны таким образом, чтобы частицы и лекарственное средство, содержащееся внутри частиц, были защищены в среде с низким значением pH и высвобождались при повышении значения pH, например, защищались в желудке, а затем высвобождались в кишечнике. Полимерные матрицы, используемые для инкапсуляции частиц, также могут быть выбраны для защиты частиц от условий в первой ткани или биологической жидкости, т.е. желудочном соке. Eudragits можно использовать для pH- и время-контролируемого высвобождения лекарственного средства, причем хитозаны, HPMS и гиалуроновую кислоту можно использовать для диффузионно-контролируемого высвобождения. Eudragits включают широкий спектр сополимеров на основе полиметакрилата. Примеры Eudragits, которые могут подходить для использования со способами и композициями по настоящему изобретению, включают Eudragit RS 30 D: поли(этилакрилат-со-метилметакрилат-со-триметиламмониетилметакрилатхлорид) 1:2:0,1; Eudragit RL 30 D: Поли(этилакрилат-со-метилметакрилат-со-триметиламмониетилметакрилатхлорид) 1:2:0,2; Eudragit FS 30D: поли(метилакрилат-со-метилметакрилат-со-метакриловая кислота) 7:3:1; и Eudragit L 30 D-55: поли(метакриловая кислота-со-этилакрилат) 1:1.

[0146] Частицы могут быть инкапсулированы любым способом, известным в данной области техники. В некоторых случаях частицы, например микрочастицы или наночастицы, могут быть сформированы на первой стадии и инкапсулированы на второй стадии. Например, частицы могут быть образованы путем осаждения, как описано выше, а затем инкапсулированы на второй стадии путем распылительной сушки. В другом примере, частицы могут быть сформированы на первой стадии путем распылительной сушки, а затем инкапсулированы на второй стадии распылительной сушки. В некоторых случаях, частицы могут быть сформированы и инкапсулированы за одну стадию. Например, инкапсулирующие полимерные матрицы можно смешивать с раствором, содержащим один или несколько носителей, нагрузки и катионы, перед стадией распылительной сушки. В некоторых случаях, раствор, содержащий одну или несколько инкапсулирующих полимерных матриц, носителей, нагрузок и катионов, можно подвергать распылительной сушке с образованием наночастиц или микрочастиц.

III. Носители

[0147] Носитель может представлять собой белок или молекулу другого типа,

способную переносить гетерологичную нагрузку через эпителий или в него (например, поляризованный кишечный эпителий субъекта).

[0148] Носитель может быть получен из полипептида, секретируемого бактерией. Такой носитель может быть получен из полипептида, секретируемого *Vibrio cholerae* или *Pseudomonas aeruginosa*. Полипептид, секретируемый *Vibrio cholerae*, может представлять собой полипептид Cholix. Полипептид, секретируемый *Pseudomonas aeruginosa*, может представлять собой экзотоксин *Pseudomonas* (PE). Носитель, полученный из полипептида Cholix или PE, может быть природным или неприродным. Носитель, полученный из полипептида Cholix или PE, может представлять собой укороченный вариант природного пептида Cholix или PE, или неприродный мутантный вариант. Мутации могут включать замену, делецию, вставку.

[0149] A. Cholix

[0150] Носитель в настоящем документе может иметь сниженную (например, сниженную, по меньшей мере, на 50%) или удаленную активность АДФ-рибозилирования (например, рибозилирование фактора элонгации 2) по сравнению с носителем, представленным в SEQ ID NO: 1.

[0151] Носитель может представлять собой полипептид, полученный из Cholix, или его вариант, дополнительно укороченный в любом из положений 206-415 для транцитоза, или в положении 151-187 для эндоцитоза по сравнению с эталонной последовательностью, такой как SEQ ID NO: 1 или 12 или 7. Также в настоящем документе предусмотрены носители для транцитоза, по меньшей мере, примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичны любой из последовательностей носителей, представленных в таблице 14, или носители для эндоцитоза, по меньшей мере, примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичны любой из последовательностей носителей, представленных в таблице 15. Любой из носителей в настоящем документе может иметь V1L-замену. В некоторых случаях, носитель может представлять собой полипептид Cholix с укорочением С-концевой части по любой из аминокислот 206-425, 150-205 или 150-195 в SEQ ID NO: 1 или 7. В некоторых случаях, носитель может представлять собой полипептид Cholix с укорочением С-концевой части по любой из аминокислот 1-40 или 35-40 в SEQ ID NO: 1 или 7. В некоторых случаях, носитель состоит из аминокислотных остатков, начиная с N-концевого положения 40 до любого из С-концевых положений 150-205 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, носитель может представлять собой полипептид Cholix с укорочением С-концевой части по аминокислоте 266 в SEQ ID NO: 1, или 12, или 7. Такой носитель может содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 65-67. В других случаях, носитель может иметь С-конец в положениях 150 или 187 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях, носитель состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, 9, или 10. В некоторых случаях, носитель Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ

ID NO: 12 или 13. Нумерация положений может быть основана на выравнивании полипептида Cholix с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, где положения пронумерованы от N-конца к С-концу, начиная с положения 1 на N-конце. В некоторых случаях, носитель может иметь последовательность SEQ ID NO: 3.

[0152] Носитель может представлять собой укороченный вариант природного полипептида Cholix или неприродный мутантный вариант. Мутации могут включать замены, делеции или вставки. Укороченный полученный из Cholix носитель может, например, содержать, состоять или по существу состоять из аминокислотных остатков 1-415, 1-386, 1-266 или 1-206 SEQ ID NO: 1 или 7. Таким образом, носитель может содержать, состоять или по существу состоять из аминокислотных остатков, указанных в SEQ ID NO: 6 (пример Cholix1-415), SEQ ID NO: 2 (пример Cholix1-386), SEQ ID NO: 65 (пример Cholix¹⁻²⁶⁶) или SEQ ID NO: 73 (пример Cholix¹⁻²⁰⁶). Аминокислотные последовательности представлены в **таблице 12**.

[0153] Носитель может включать одну или несколько аминокислот на своем N-конце, которые облегчают экспрессию в различных микроорганизмах (например, бактериях). Например, носитель может включать N-концевой метионин, который может быть сайтом инициации трансляции. Такой носитель может содержать, состоять или по существу состоять из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 65 (пример M+Cholix1-386). Кроме того, любой из носителей в данном документе может иметь замену V1L, как указано в SEQ ID NO: 2 (пример V1L Cholix).

[0154] Носитель может представлять собой фрагмент SEQ ID NO: 81 и может содержать, по существу состоять или состоять из не больше, чем из 386 аминокислот аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 81. Носитель может содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотных остатков от любого из положений 1-38 до любого из аминокислотных остатков в положениях 195-347 SEQ ID NO: 81. Альтернативно, носитель может содержать, по существу состоять или состоять из аминокислотных остатков, начиная с положения 1 до любого из аминокислотных остатков в любом из положений 195-347 SEQ ID NO: 81.

[0155] Носитель может существовать, по существу состоять или состоять из аминокислотных остатков 1-195, 1-206, 1-244, 1-266, 1-386 или 1-415 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 81. Аналогичным образом, носитель может существовать, по существу состоять или состоять из аминокислотных остатков 1-275, 1-266, 1-265, 2-265, 3-265, 4-265, 5-265, 1-250, 2-250, 3-250, 4-250, 5-250, 1-245, 2-245, 3-245, 4-245, 5-245, 1-205, 2-205, 3-205, 4-205 и 5-205 в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 81.

[0156] Носители также включают варианты любого из вышеуказанных, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичные любой из последовательностей, представленных в настоящем документе.

[0157] В. Псевдомонадный экзотоксин А

[0158] Носитель может содержать часть экзотоксина *Pseudomonas*. Экзотоксин *Pseudomonas* А или “PE” может секретироваться *Pseudomonas aeruginosa* в виде белка

массой 67 кДа, состоящего из трех основных глобулярных доменов (Ia, II и III) и одного небольшого субдомена (Ib), соединяющего домены II и III (см., например, Allured et al. и др., Proc.Natl.Acad.Sci., 83:1320, 1324, 1986). Зрелый PE может представлять собой белок из 613 остатков, последовательность которого указана в SEQ ID NO: 69. Пример нуклеиновой кислоты, кодирующей зрелый PE, как используется в настоящем документе, представлен в SEQ ID NO: 68.

[0159] Домен экзотоксина PE I (например, SEQ ID NO: 82) может содержать аминокислоты 1-252 в SEQ ID NO: 69 и может представлять собой рецептор-связывающий домен, который может быть лигандом для рецептора клеточной поверхности и опосредует связывание PE с клеткой. Носитель может иметь аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 82. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с больше, чем 50%, больше, чем 60%, больше, чем 70%, больше, чем 80%, больше, чем 90%, больше, чем 95% или больше, чем 99% гомологичности или идентичности последовательности, представленной в SEQ ID NO: 82. Также в настоящем документе предусмотрены носители, имеющие, по меньшей мере, примерно 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности любой из частей последовательности носителя SEQ ID NO: 69, представленной в **таблице 13**.

[0160] В некоторых случаях, носитель содержит полипептид с консервативными или неконсервативными заменами в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. Носитель может сохранять способность связываться с клеткой. Носитель может представлять собой укороченный вариант SEQ ID NO: 69, например, SEQ ID NO: 82. Носитель может содержать полипептид с рецептор-связывающим доменом, в котором удалены один или несколько аминокислотных остатков SEQ ID NO: 82. Носитель может содержать полипептид с рецептор-связывающим доменом, в котором один или несколько аминокислотных остатков SEQ ID NO: 82 заменены другой аминокислотой.

[0161] Домен PE-носителя I может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82 или, по меньшей мере, на 80% идентичную последовательности его функционального фрагмента. Носитель может содержать делецию или мутацию в одном или нескольких аминокислотных остатках 1-252 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69, например аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную аминокислотной последовательности 1-252 SEQ ID NO: 69 (например, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 82) или, по меньшей мере, на 90% идентичную последовательности его функционального фрагмента. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную аминокислотной последовательности 1-252 SEQ ID NO: 69, например аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, или, по меньшей мере. Носитель может содержать аминокислотную

последовательность, по меньшей мере, на 99% идентичную аминокислотной последовательности 1-252 SEQ ID NO: 69, например аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, или, по меньшей мере, на 99% идентичную последовательности его функционального фрагмента. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, на 100% идентичную аминокислотной последовательности 1-252 SEQ ID NO: 69, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, или на 100% идентичную последовательности его функционального фрагмента.

[0162] Носитель может быть связан непосредственно или косвенно, ковалентно или нековалентно, с нагрузкой. В некоторых случаях, носитель и нагрузка образуют слитый белок. Носитель может быть связан непосредственно или косвенно, ковалентно или нековалентно, с катионом. В некоторых случаях, носитель и катион образуют слитый белок или комплекс. В различных вариантах осуществления, носитель, нагрузка, комплексы носитель-нагрузка или слитые молекулы фармацевтических композиций кодируются нуклеиновыми кислотами, которые содержат промотор, регуляторный элемент, последовательность ДНК, кодирующую носитель или фрагмент или укороченный вариант такого носителя, и последовательность ДНК, кодирующая нагрузку или катион. Регуляторный элемент может содержать сайты связывания транскрипции для факторов транскрипции, которые активируют или подавляют экспрессию кодирующих последовательностей ДНК. В некоторых случаях, регуляторный элемент представляет собой эндогенный регуляторный элемент последовательности ДНК, кодирующей носитель или фрагмент или укороченный вариант такого носителя. В некоторых случаях, регуляторным элементом является эндогенный регуляторный элемент последовательности ДНК, кодирующей нагрузку. В некоторых случаях, регуляторный элемент регулирует как последовательность ДНК, кодирующую носитель или фрагмент или укороченный вариант такого носителя, так и последовательность ДНК, кодирующую нагрузку или катион. В некоторых случаях, носитель и нагрузка кодируются на разных молекулах нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях, носитель, нагрузка и катион кодируются на разных нуклеиновых молекулах. В некоторых случаях, носитель и нагрузка кодируются одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях, носитель, нагрузка и катион кодируются одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты.

IV. Нагрузка

[0163] В дополнение к полипептиду носителя, композиции, представленные в настоящем документе, могут содержать одну или несколько нагрузок, например, одну или несколько гетерологичных нагрузок или одну или несколько биологически активных нагрузок для доставки субъекту. Одна или несколько гетерологичных нагрузок могут представлять собой одну или несколько нагрузок, которые не имеют последовательности носителя, например, последовательности Cholix или последовательности PE. Одна или несколько нагрузок, например, гетерологичных нагрузок, могут представлять собой макромолекулу, малую молекулу, малую органическую молекулу, пептид, полипептид, нуклеиновую кислоту, мРНК, микроРНК, мшРНК, миРНК, ПНК, антисмысловую

молекулу, антитело, ДНК, плазмиду, полисахарид, липид, антиген, вакцину, полимерную наночастицу или каталитически активный материал. Одна или несколько нагрузок, например, гетерологичных нагрузок, могут представлять собой полипептид, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 11 или 14-64 (см. **таблицу 12**).

[0164] Одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько биологически активных нагрузок могут представлять собой макромолекулы, которые могут проявлять желаемую биологическую активность при введении в кровоток субъекта. Например, одна или несколько нагрузок могут обладать активностью связывания с рецептором, ферментативной активностью, активностью мессенджеров (т.е. действовать в качестве гормона, цитокина, нейротрансммиттера, фактора свертывания крови, фактора роста или другой сигнальной молекулы), люминесцентной или другой обнаруживаемой активностью или регулирующей активностью или любое их сочетание. В различных диагностических вариантах осуществления, одна или несколько нагрузок могут быть конъюгированы с фармацевтически приемлемым гамма-излучающим фрагментом или могут сами представлять собой фармацевтически приемлемый гамма-излучающий фрагмент, включая, но ими не ограничиваясь, индий и технеций, магнитные частицы, рентгеноконтрастные материалы, такие как воздух или барий, и флуоресцентные соединения (например, Alexa-488 или красный флуоресцентный белок). В некоторых случаях, одна или несколько нагрузок, например одна или несколько биологически активных нагрузок, не попадают в кровоток субъекта. В некоторых случаях, одна или несколько нагрузок воздействуют на собственную пластинку слизистой.

[0165] В различных вариантах осуществления, одна или несколько нагрузок представляют собой белок, который содержит более одной полипептидной субъединицы. Например, белок может быть димером, тримером или мультимером высшего порядка. В различных вариантах осуществления, две или несколько субъединиц белка могут быть соединены ковалентной связью, такой как, например, дисульфидная связь. В других вариантах осуществления, субъединицы белка могут удерживаться вместе нековалентными взаимодействиями. Специалист в данной области может идентифицировать такие белки и определить, правильно ли связаны субъединицы, используя, например, иммуноанализ.

[0166] В различных вариантах осуществления, одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько терапевтических нагрузок, представляют собой, например, краситель, радиофармацевтическое средство, гормон, цитокин, ингибитор ФНО, агент, снижающий уровень глюкозы или опухолеассоциированный антиген. В некоторых случаях, одна или несколько терапевтических нагрузок представляют собой полипептид, который является модулятором воспаления в желудочно-кишечном тракте. В различных вариантах осуществления, одна или несколько нагрузок, подлежащих доставке, представляют собой агент, снижающий уровень глюкозы для доставки субъекту. Примеры агентов, снижающих уровень глюкозы, включают инкретины, глюкагон, пропротеин

глюкагона, пептид глюкагона, глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1), глюкагоноподобный пептид 2 (GLP-2), агонист GLP-2, тедуглутид, глицентин, глицентин-родственный полипептид, препротеин гастроингибиторного полипептида, гастроингибиторный полипептид, дипептидилпептидаза 4, глюкозный транспортер тип 4, препроглюкагон, субстрат рецептора инсулина 1, инсулин, аполипопротеин А-II, семейство носителей растворенных веществ 2, глюкозный транспортер тип 1, гликогенсинтазу 1, гликогенсинтазу 2, протеиновую тирозинфосфатазу рецепторного типа 1, RAC-альфа серин-треониновая протеинкиназа, гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, гексокиназу 3, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатазу и белок двойной специфичности, киназа пируватдегидрогеназы 1, белок 1, связывающий кальций и содержащий суперспиральный домен, Мах-подобный белок X, фруктозо-бисфосфатальдолоза А, рецептор глюкагоноподобного пептида 1, рецептор глюкагоноподобного пептида 2, рецептор гастроингибиторного полипептида, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1, рецептор инсулиноподобного фактора роста 2, инсулиновый рецептор, агонист ГПП-1 - эксенатид, агонист ГПП-1 - лираглутид, эксендин-4, эксендин-3, гастроингибиторный пептид (GIP), агонист GIPR (Des-Ala2-GIP1-30), агонист GIPR - укороченный GIP1-30, агонист GLP-1R (аминокислоты 1-37 GIP), агонист GLP-1R (аминокислоты 7-36 GIP), ликсисенатид (торговые марки Adlyxin® и Lyxumia®, Sanofi), лираглутид (торговое наименование Victoza®, Novo Nordisk A/S), семаглутид (торговое наименование Ozempic®, Novo Nordisk A/S), альбиглутид (торговое наименование Tanzeum®, GlaxoSmithKline; димер GLP-1, слитый с альбумином), дулаглутид (торговое наименование Trulicity®, Eli Lilly), глюкозозависимый инсулинотропный полипептид, мультиспецифические пептидные агонисты, тирзепатид (Eli Lilly), SAR425899 (Sanofi), двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов DACRA-089, гларгин/Lantus®, глужизин/Apidra®, гларин/Toujeo®, Insuman®, детемир/Levemir®, лизпро/Humalog®/Liprolog®, деглудек/деглудекПлюс, инсулин аспарт, инсулин и аналоги (например, LY-2605541, LY2963016, NN1436), инсулин пегилированный лизпро (SEQ ID NOs: 40-41), Humulin®, Линджета, SuliXen®, NN1045, инсулин плюс SymlinTM, PE0139, инсулины быстрого и короткого действия (например, Линджета, PH20, NN1218, HinsBet), (APC-002) гидрогелевые, пероральные, ингаляционные, трансдермальные и сублингвальные инсулины (например, Exubera®, Nasulin®, Afrezza®, Tregopil®, TPM 02, капсулин, Oral-lyn®, Cobalamin®, пероральный инсулин, ORMD-0801, NN1953, NN1954, NN1956, VIAtab и пероральный инсулин Oshadi), и аналог эксендина-4, выбранный из группы, состоящей из: desPro36-эксендин-4(1-39)-Lys6NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys4-NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys5-NH₂; desPro36[Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Trp(O2) 26, Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Trp(O2) 25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, Asp28]эксендин-4 (1-39); и desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39). Агонисты GLP-1,

предполагаемые для использования в частицах или конструкциях для доставки, описанных в настоящем документе, включают: например, эксенатид (торговое наименование Byetta®, Amylin/Astrazeneca, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 11); ликсисенатид (торговые наименования Adlyxin® и Lyxumia®, Sanofi, SEQ ID NO: 15); лираглутид (торговое наименование Victoza®, Novo Nordisk A/S, SEQ ID NO: 16); семаглутид (торговое наименование Ozempic®, Novo Nordisk A/S); альбиглутид (торговое наименование Tanzeum®, GlaxoSmithKline; димер GLP-1, слитый с альбумином); и дулаглутид (торговое наименование Trulicity®, Eli Lilly, SEQ ID NO: 17). Нагрузка может обладать способностью связываться с инкретиновым рецептором, например, с инкретиновым рецептором в ткани желудочно-кишечного тракта или в воротной системе печени.

[0167] В некоторых случаях, одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько терапевтических нагрузок, имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или любую одну или несколько из SEQ ID NO: 14-64.

Инкретины

[0168] Носитель может быть связан с одним или несколькими инкретинами. Инкретины принадлежат к классу гормонов желудочно-кишечного тракта, которые могут повышать высвобождение инсулина бета-клетками островков Лангерганса после еды, даже до повышения уровня глюкозы в крови. Инкретины могут замедлять скорость всасывания питательных веществ в кровоток путем уменьшения опорожнения желудка и могут снизить потребление пищи. Инкретины могут ингибировать высвобождение глюкагона из альфа-клеток островков Лангерганса. Инкретином может быть глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1) или гастроингибиторный пептид (GIP). GLP-1 и GIP могут быть быстро инаktivированы ферментом дипептидилпептидазой 4 (DPP-4).

[0169] Инкретины или пептиды-миметики инкретинов, которые можно использовать в настоящем изобретении, могут быть природными инкретинами или пептидами-миметиками инкретинов или модифицированными природными инкретинами или пептидами-миметиками инкретинов. Пептиды могут быть химически синтезированы с использованием стандартных методов синтеза пептидов, таких как твердофазный синтез пептидов, или могут быть получены с использованием методов рекомбинантной ДНК, известных в данной области. Полученные таким образом пептиды могут или могут не быть идентичными природным пептидам. Аналоги, фрагменты и конъюгаты природных инкретинов или пептидов-миметиков инкретинов включены в настоящее изобретение в качестве нагрузки при условии, что они сохраняют одну или несколько биологических активностей природных инкретинов или пептидов-миметиков инкретинов.

[0170] GLP-1 может быть природным инкретиновым гормоном, синтезируемым в L-клетках кишечника путем тканеспецифического посттрансляционного процессинга препроглюкагона. GLP-1 участвует в контроле аппетита и удовлетворения чувства голода. GLP-1 может функционировать через рецептор GLP-1 (GLP-1R), члена суперсемейства рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), состоящий из 463 аминокислот (см.,

например, Drucker DJ et al., *Mol Endocrinol*, 17(2): 161-171, 2003). Биоактивный GLP-1 может существовать в двух равноэффективных молекулярных формах: GLP-1(7-37) и GLP-1(7-36) амид. Биоактивный GLP-1 может быть быстро расщеплен диаминопептидилпептидазой-4 (DPP-4), что может привести к образованию в значительной степени неактивных амидных молекулярных форм GLP-1(9-37) и GLP-1(9-36). В некоторых случаях, большая часть GLP-1, выходящего из кишечной венозной циркуляции, уже была расщеплена посредством DPP-4, экспрессируемой в капиллярах, окружающих L-клетки кишечника. Период полувыведения GLP-1 *in vivo* оценивается как составляющий 1-2 мин (см., например, Drucker DJ, *Gastroenterology*, 122(2):531-544, 2002).

[0171] GLP-1 может относиться к глюкагоноподобному пептиду 1 из любого источника, включая выделенный, очищенный и/или рекомбинантный GLP-1, полученный из любого источника или путем химического синтеза, например, с использованием твердофазного синтеза. Например, GLP-1 может иметь последовательность SEQ ID NO: 26. При этом также включены консервативные аминокислотные замены природного GLP-1. Например, могут быть осуществлены консервативные замены аминокислот, которые, несмотря на то, что изменяют первичную последовательность белка или пептида, обычно не изменяют его функции. Было описано много молекулярных производных GLP-1, включая некоторые из которых, как сообщается, обладают агонистической активностью и/или имеют более длительный период полувыведения, чем нативный GLP-1, см., например, патент США № 6358924; 6344180; 6284725; 6277819; 6271241; 6268343; и 6191102, содержание которых включено в настоящем документе посредством ссылки.

[0172] Также были описаны молекулы, родственные GLP-1, например, белки, и сообщалось, что они способны индуцировать эндокринную дифференцировку поджелудочной железы, пролиферацию островков и увеличение массы β -клеток (Parkes et al., *Metabolism* 50:583, 2001). Эксендин-4 (примером которого является SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 11, также известный как Эксенатид или Byetta®) и эксендин-3 (примером которого является SEQ ID NO: 28) представляют собой пептиды, состоящие из 39 аминокислот (отличаясь остатками 2 и 3), которые примерно на 53% гомологичны GLP-1 и обладают инсулинотропной активностью. Было описано множество молекулярных производных эксендина-3 и эксендина-4, в том числе некоторые из которых, как сообщается, обладают агонистической активностью, см., например, патент США № 5424286; 6268343; 6384016; 6458924; 6858576; 6989366; 7115569; 7153825; 7223725; 7235627; 7297761; 7419952; 7521423; 7696161; 7700549; 8097698; 8853160; 8889619; 9012398; США 20120283179; США 20140206608; США 20140206609; 20140221281; США 20140213513; США 20150164997; и патент США № 9181305, содержания которых включено в настоящем документе посредством ссылки. Агонист GLP-1 может представлять собой аналог эксендина-4, который активно активирует рецепторы GLP-1 и GIP и, необязательно, рецептор глюкагона, и содержит, помимо других замен, модификацию Туг в положении 1 и модификацию Пе в положении 12. Примеры таких аналогов, предполагаемых для использования, включают аналоги, описанные, например, в

патенте США 20140206608; США 20140206609; 20140221281; и США 20140213513, содержание каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки.

[0173] Агонист GLP-1 может представлять собой, например, эксенатид (торговое название Byetta®, Amylin/Astrazeneca, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 11); ликсисенатид (торговые наименования Adlyxin® и Lixumia®, Sanofi, SEQ ID NO: 15); лираглутид (торговое наименование Victoza®, Novo Nordisk A/S, SEQ ID NO: 16); семаглутид (торговое наименование Ozempic®, Novo Nordisk A/S, SEQ ID NO: 30); альбиглутид (торговое наименование Tanzeum®, GlaxoSmithKline; димер GLP-1, слитый с альбумином); и дулаглутид (торговое наименование Trulicity®, Eli Lilly, SEQ ID NO: 17).

[0174] В некоторых случаях, нагрузка может представлять собой глюкозозависимый инсулиотропный полипептид. Глюкозозависимый инсулиотропный полипептид (также называемый гастроингибиторным полипептидом; GIP) может быть членом класса молекул инкретинов. GIP может быть получен из 153-аминокислотного пропротеина, кодируемого геном GIP, и циркулирует в виде биологически активного 42-аминокислотного пептида, содержащего, содержащего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 36. GIP может быть синтезирован кишечными К-клетками, которые можно обнаружить в слизистой оболочке двенадцатиперстной и тощей кишки пищеварительного тракта. Рецепторы GIP могут представлять собой семь трансмембранных белков, обнаруживаемых на бета-клетках поджелудочной железы. Различные антагонисты GIP могут ингибировать GIP-зависимое высвобождение инсулина *in vivo*, а также могут повышать толерантность к глюкозе в пероральном тесте на толерантность к глюкозе. Как таковые, антагонисты GIP можно использовать в способах лечения T2D (см., например, патент США 20070167363, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки). Агонист рецептора GIP (GIPR) в виде укороченного аналога GIP (аминокислотные остатки 1-30 GIP) и имеющий замену D-аланина (Ala) в положении 2 SEQ ID NO: 38, обозначенный как D-Ala2-GIP1-30 (D-GIP1-30), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 37, может демонстрировать антидиабетическое действие без эффектов, способствующих ожирению (см., например, Widenmaier et al, PloS ONE, March 2010 | Volume 5 | Issue 3 | e9590). Агент, регулирующий уровень глюкозы, например, агент, снижающий уровень глюкозы, может представлять собой агонист GIPR, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 60. Нагрузкой может представлять собой глюкагон.

Мультиспецифические пептидные агонисты

[0175] В некоторых случаях, композиция, представленная в настоящем документе, например, частица или конструкция для доставки, может быть разработана для осуществления двойной активации рецепторов GLP-1 и GIP, например, путем объединения действия GLP-1 и GIP в одном препарате. Вариантом осуществления конструкции для доставки является композиция с носителем или композиция с носителем и нагрузкой. Это может обеспечить терапию со значительно лучшим снижением уровня

глюкозы в крови, повышенной секрецией инсулина и снижением массы тела у мышей с диабетом 2 типа и ожирением по сравнению с имеющимся на рынке лираглутидом агонистом GLP-1 (см., например, VA Gault et al., Clin Sci. (Lond), 121, 107-117, 2011).

[0176] В некоторых случаях, носитель по настоящему изобретению связан с двойным агонистом, например, тирзепатидом (Eli Lilly, SEQ ID NO: 33) или SAR425899 (Sanofi).

[0177] Композиция, например, конструкция для доставки, предусмотренная в настоящем документе, может активировать рецепторы GLP-1, GIP и глюкагона. Предусмотренный в настоящем документе носитель может быть связан с триагонистом GGG, который исследуется компанией Eli Lilly.

[0178] Носитель по настоящему документу может быть связан с другими исследуемыми пептидами для лечения диабета и ожирения, включая двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов DACRA-089 (SEQ ID NO: 41, также известный как KBP-089, Sanofi).

Инсулин и его аналоги

[0179] Предусмотренная в настоящем документе нагрузка может представлять собой инсулин, или аналог инсулина, или производное инсулина. Используемые в настоящем документе термины “аналог инсулина” или “производное инсулина” могут относиться к полипептиду, молекулярная структура которого формально может быть получена из структуры природного инсулина, например инсулина человека (пример которого представляет собой А-цепь инсулина SEQ ID NO: 43 и В-цепь инсулина SEQ ID NO: 44, которые могут быть связаны дисульфидными связями), путем удаления и/или замены, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в природном инсулине, и/или или добавления, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка. Добавленный и/или замененный аминокислотный остаток может быть либо кодируемым аминокислотным остатком, либо другим природным остатком, либо полностью синтетическим аминокислотным остатком.

[0180] Инсулин и аналоги/производные инсулина подробно описаны в данной области (см., например, США 20150216981; патент США № 9265723; патент США № 8633156; патент США № 8410048; патент США № 8048854; патент США № патент США № 7713930, патент США № 7696162, патент США № 7659363, патент США № 7291132, патент США № 7193035 и цитируемые в них ссылки, которые все включены в настоящее описание посредством ссылки). Инсулин может иметь нативную последовательность человеческого инсулина с цепью А (SEQ ID NO: 43) и цепью В (SEQ ID NO: 44), связанными дисульфидными связями.

[0181] В некоторых вариантах осуществления, инсулин содержит цепь А, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 43, и цепь В, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44. Дополнительные варианты инсулина с благоприятными быстродействующими или медленнодействующими (базальными) свойствами включают инсулин аспарт, имеющий

цепь A SEQ ID NO: 45 и цепь B SEQ ID NO: 46; инсулин гларгин, имеющий цепь A SEQ ID NO: 47 и цепь B SEQ ID NO: 48; и инсулин лизпро, имеющий цепь A SEQ ID NO: 49 и цепь B SEQ ID NO: 50.

[0182] Одна или несколько нагрузок, например гетерологичных нагрузок, могут представлять собой средство для лечения гемофилии, например, гемофилии А или гемофилии В. Средство для лечения гемофилии может представлять собой фактор свертывания крови VIII (например, концентрат фактора свертывания крови VIII), фактор свертывания крови IX (например, концентрат фактора свертывания крови IX), фактор VIIa, Hemlibra® (ACE 910 или эмицизумаб), DDAVP® или Stimate® (десмопрессина ацетат), антифибринолитическое средство, например, Amicar® (аминокапроновая кислота) или Lysteda® (транексамовая кислота), ELOCTATE® [антигемофильный фактор (рекомбинантный), слитый белок Fc] или криопреципитат.

[0183] В некоторых случаях, нагрузка, например, гетерологичная нагрузка, например, агент, регулирующий уровень глюкозы, например, агент, снижающий уровень глюкозы, представляет собой инсулин или аналог инсулина. В некоторых случаях, нагрузка, например, гетерологичная нагрузка, например, агент, регулирующий уровень глюкозы, например агент, снижающий уровень глюкозы, представляет собой эксенатид. Эксенатид (SEQ ID NO: 11) может представлять собой пептид, обладающий GLP-1-подобной биологической активностью, который стабилизирован С-концевым амином и N-концевым Н.

[0184] В некоторых случаях, одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько гетерологичных нагрузок, используемых в настоящем документе, могут включать противоопухолевые соединения (такие как химиотерапевтические или противоопухолевые средства), такие как нитрозомочевины, например, кармустин, ломустин, семустин, стрепзотоцин; метилгидразины, например прокарбазин, дакарбазин; стероидные гормоны, например глюкокортикоиды, эстрогены, прогестины, андрогены, тетрагидродезоксикариостерон; 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, карбапенимы и монобактамы, ингибиторы бета-лактамазы, аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, спектиномицин; противомаларийные препараты, амебициды; антипротозойные средства; противогрибковые средства, например, амфотерицин-бета, противовирусные средства, например, ацикловир, идоксуридин, рибавирин, трифлуридин, видарбин, ганцикловир; паразитициды; противоглистныe средства; радиоактивные лекарственные средства; желудочнокишечные 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 вазодилататоры прямого действия, например, диазоксид, гидралазина гидрохлорид; лекарственные средства, влияющие на ренин-ангиотензиновую систему; периферические вазодилататоры, например, фентоламин; антиангинальные лекарственные средства; глюкозиды сердечно-сосудистого действия; кардиотонические средства, например амрион, милрион, эноксимон, феноксимон, имазодан, сульмазол; антиаритмические средства; блокаторы входа кальция; лекарственные средства, влияющие на липиды крови, например ранитидин, бозентан, резулин; лекарственные средства, действующие на органы дыхания; сипатомиметические лекарственные средства, например, альбутерол, битолтерола мезилат, добутамина гидрохлорид, дофамин гидрохлорид, эфедрин So, эпинефрин, фенфлурамина гидрохлорид, изопротеренола гидрохлорид, метоксамина гидрохлорид, норэпинефрина битартрат, фенилэфрина гидрохлорид, ритодрина гидрохлорид; холиномиметические средства, например, ацетилхолина гидрохлорид; антихолинэстеразные средства, например, эдрофониум хлорид; реактиваторы холинэстеразы; адренергические блокаторы, например, ацебутолола гидрохлорид, атенолол, эсмолола гидрохлорид, лабеталола гидрохлорид, метопролол, надолол, фентоламина мезилат, пропанолола гидрохлорид; антимускариновые средства, например, анизотропина метилбромид, атропин, клинидия бромид, гликопирролат, ипратропия бромид, скополамина гидробромид; средства, блокирующие нервно-мышечную передачу; деполяризующие средства, например, атракурия безилат, гексафлуорения бромид, метокурина йодид, сукцинилхолина хлорид, тубокурарина хлорид, векурония бромид; миорелаксанты центрального действия, например, баклофен; нейротрансмиттеры и нейротрансмиттерные средства, например, ацетилхолин, аденозин, аденозинтрифосфат; аминокислотные нейротрансмиттеры, например, возбуждающие аминокислоты, гамма-аминомасляная кислота, глицин; биогенные амины - нейротрансмиттеры, например, дофамин, эпинефрин, гистамин, норадреналин, октопамин, серотонин, тирамин; нейропептиды, оксид азота, токсины K^+ -каналов; противопаркинсонические лекарственные средства, например амальтидина HCl, бензтропина мезилат, карбидопа; диуретические лекарственные средства, например дихлорфенамид, метазоламид, бендрофлуметиазид, политиазид; противомигренозные лекарственные средства, например, карбопроста трометамина мезилат, доксорубицин, митомицин, цисплатин, даунорубицин, блеомицин, актиномицин D, неокарзиностатин и метисергида малеат.

[0185] В некоторых случаях, одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько гетерологичных нагрузок, предусмотренных для использования со способами по настоящему изобретению, включают фактор, ингибирующий лимфокины, макрофагальный колониестимулирующий фактор, фактор роста тромбоцитов, фактор стволовых клеток, фактор роста опухоли- β , фактор некроза опухоли, лимфотоксин, Fas, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарно-макрофагальный

колониестимулирующий фактор, интерферон- α , интерферон- β , интерферон- γ , факторы роста и белковые гормоны, такие как эритропоэтин, ангиогенин, фактор роста гепатоцитов, фактор роста фибробластов, фактор роста кератиноцитов, фактор роста нервов, фактор роста опухоли- α , тромбопоэтин, тиреостимулирующий фактор, тиреотропин-рилизинг гормон, нейротрофин, эпидермальный фактор роста, фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), цилиарный нейротрофический фактор, ЛПНП, соматомедин, инсулиновый фактор роста, инсулиноподобный фактор роста I и II, хемокины, такие как ENA-78, ELC, GRO- α , GRO- β , GRO- γ , HRG, LEF, IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1- α , MIP-1- β , MG, MDC, NT-3, NT-4, SCF, LIF, лептин, RANTES, лимфотактин, эотаксин-1, эотаксин-2, TARC, TECK, WAP-1, WAP-2, GCP-1, GCP-2; α -хемокиновые рецепторы, например, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7; и рецепторы β -хемокинов, например, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6 и CCR7. Дополнительные примеры нагрузки включают ингибиторы регуляторных Т-клеток (Treg), таких как Treg, которые экспрессируют CD4, CD25 и Foxp3, и Treg, такие как Tr1, Th3, CD8+CD28-, Qa-1 ограниченные Т-клетки и Treg-клетки IL-17.

[0186] В некоторых случаях, одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько гетерологичных нагрузок, могут представлять собой термолабильный энтеротоксин *E. coli* (Etx).

[0187] В некоторых случаях, одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько гетерологичных нагрузок, используемых с описанными в настоящем документе способами и композициями, могут представлять собой краситель или радиофармацевтическое средство. Одним или несколькими красителями и радиофармацевтическими средствами могут быть Alexa488, флуоресцентные соединения, индий, технеций, магнитные частицы, рентгеноконтрастные материалы и красный флуоресцентный белок (RFP).

[0188] В некоторых случаях, одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько гетерологичных нагрузок, используемых в описанных в настоящем документе способах и композициях, могут представлять собой гормон. Примеры гормонов включают, но ими не ограничиваются, гормон роста человека, NUTROPIN® (Genentech), HUMATROPE® (Lilly), GENOTROPIN® (Pfizer), NORDITROPIN® (Novo), SAIZEN® (Merck Serono), OMNITROPE® (Sandoz), SEROSTIM® (EMD Serono), ZORBITIVE® (Merck Serono), TEV-TROPIN® (Teva), гормоны гипофиза, например, хорионический гонадотропин, косинтропин, менотропины, соматотропин, иортикотропин, протирелин, тиреотропин, вазопрессин, липрессин; гормоны надпочечников, например, беклометазона дипропионат, бетаметазон, дексарнетазон, триамцинолон, гормоны поджелудочной железы, например, глюкагон, инсулин, паратиреоидный гормон, например, дигидрохистерол; гормоны щитовидной железы, например, динатрийэтидронат кальцитонина, левотироксин Na, лиотиронин Na, лиотрикс, тироглобулин, терипаратида ацетат; антииреоидные средства; эстрогенные гормоны; прогестины и антагонисты; гормональные контрацептивы; тестикулярные гормоны; гормоны желудочно-кишечного

тракта, например, холецистокинин, энтерогликан, галанин, гастроингибиторный полипептид, эпидермальный фактор роста-урогастрон, гастроингибиторный полипептид, гастрин-высвобождающий пептид, гастрины, пентагастрин, тетрагастрин, мотилин, пептид YY, секретин, вазоактивный интестинальный пептид или синкалид, соматотропин, синтетический гормон роста человека, синтетический гормон роста человека парциальный, гормон роста человека 2, соматолиберин, гормон, регулирующий аппетит, лептин, рецептор гормона роста, рецептор соматотропин-рилизинг-гормона, рецептор секретатагога гормона роста, форма А рецептора соматотропин-рилизинг-гормона и рецептор гормона роста.

[0189] В дополнительных примерах, одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько гетерологичных нагрузок, могут представлять собой цитокин. Один или несколько цитокинов могут представлять собой хемокины, интерлейкины, например, 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 и IL-30.

[0190] В дополнительных примерах, одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько гетерологичных нагрузок, могут представлять собой агент против ФНО(TNF). Примеры ингибиторов ФНО, которые можно использовать, включают антитела против ФНО, инфликсимаб (Ремикейд), адалимумаб (Хумира), этанерцепт (ENBREL®), фактор некроза опухоли-а (“TNF-a”); NP_000585.2, лимфотоксин-а (“LT-a”), лимфотоксин-b (“LT-b”), лиганд CD30, лиганд CD40, лиганд CD70, лиганд OX40, лиганд 41BB, лиганд Apo1 (или FasL или CD95L), лиганд Apo2 (или TRAIL, AIM-1 или AGP-1), лиганд Apo3 (или TWEAK), APRIL, LIGHT, лиганд OPG (или лиганд RANK), BlyS (или THANK), BCMA, TACI, TNFR1, TNFR2, lymphotoxin-bR, CD40, CD95 (или FAS или APO-1), OPG, RANK, CD30, CD27, OX40 (или CD134), 41BB, NGFR, BCMA, TAC1, EDA2R, TROY, DR6, DR5 (или TRAILR2), DR4, DR3, HVEM, LTβR, GITR, DcR3, Fn14 (или TWEAKR), BAFF, небольшие модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP), тетрациклины (например, тетрациклин, доксициклин, лемециклин, окситетрациклин, миноциклин), химически модифицированные тетрациклины (например, дедиметиламино-тетрациклин), соединения гидроксамовой кислоты, карбоциклические кислоты и производные, лазароиды, пентоксифиллин, нафтопираны, амринон, пимобендан, веснаринон, ингибиторы фосфодиэстеразы и низкомолекулярные ингибиторы киназ. Низкомолекулярные ингибиторы киназы включают, без ограничения, низкомолекулярные ингибиторы киназы p38MAPK, COT, MK2, P13K, IKKα, b,γ, MEKK1,2,3, IRAK1,4 и Akt.

[0191] В некоторых случаях, одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько гетерологичных нагрузок, могут представлять собой опухолеассоциированный антиген. Примеры опухолеассоциированных антигенов включают Her2/neu, Her3, Her4, EGF, EGFR, CD2, CD3, CD5, CD7, CD13, CD19, CD20, CD21, CD23, CD30, CD33, CD34, CD38, CD46, CD55, CD59, CD69, CD70, CD71, CD97, CD117, CD127, CD134, CD137, CD138, CD146, CD147, CD152, CD154, CD195, CD200, CD212, CD223, CD253, CD272, CD274, CD276, CD278, CD279, CD309 (VEGFR2), DR6, PD-L1, Kv1.3, 5.00E+10, MUC1,

uPA, SLAMF7 (CD319), MAGE 3, MUC 16 (CA-125), KLK3, K-ras, мезотелин, p53, сурвивин, G250 (антиген почечно-клеточной карциномы) и PSMA.

[0192] В некоторых случаях, одна или несколько нагрузок, например, одна или несколько гетерологичных нагрузок, могут представлять собой фермент, такой как гиалуронидаза, стрептокиназа, активатор тканевого плазминогена, 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 различных вариантах осуществления, биологически активная нагрузка представляет собой фермент, выбранный из гиалуронидазы, стрептокиназы, тканевого активатора плазминогена, урокиназы или PGE-аденозиндезаминазы.

V. Связывание нагрузки или катиона с носителем

[0193] В некоторых случаях, представленные в настоящем документе композиции содержат носитель, соединенный с нагрузкой, например гетерологичной нагрузкой. Нагрузка, например гетерологичная нагрузка, может быть соединена с носителем любым способом, известным специалисту в данной области, без ограничений. Нагрузка может связываться с носителем посредством нековалентных взаимодействий, таких как ионные взаимодействия, или сборки в наночастицы. Нагрузка может быть химически сшита с носителем посредством ковалентных взаимодействий. В некоторых случаях, одна или несколько нагрузок соединены с носителем. В слитой молекуле одна или несколько нагрузок или один или несколько катионов слитой молекулы могут быть присоединены к остальной части слитой молекулы любым способом, известным специалисту в данной области, без ограничений. Нагрузка или катион могут быть введены в любую часть слитой молекулы, которая не нарушает клеточносвязывающую или трансцитозную активность носителя. В различных вариантах осуществления, нагрузка или катион непосредственно связаны с N-концом или C-концом носителя. В различных вариантах осуществления, нагрузка или катион могут быть связаны с боковой цепью аминокислоты носителя. Нагрузка может быть косвенно связана с носителем через спейсер или линкер. В различных вариантах осуществления, нагрузка или катион связаны с носителем посредством расщепляемого линкера таким образом, что расщепление на расщепляемом(ым) линкере(ам) отделяет нагрузку или катион от остальной части слитой молекулы. В различных вариантах осуществления, нагрузка или катион представляет собой полипептид, который также может содержать короткий лидерный пептид, который остается присоединенным к полипептиду после расщепления расщепляемого линкера. Например, нагрузка или катион может содержать короткий лидерный пептид, содержащий больше, чем 1 аминокислота, больше, чем 5 аминокислот, больше, чем 10 аминокислот, больше, чем 15 аминокислот, больше, чем 20 аминокислот, больше, чем 25 аминокислот, больше, чем 30 аминокислот, больше, чем 50 аминокислот или больше, чем 100 аминокислот. В некоторых случаях, биологически активная нагрузка может включать

короткий лидерный пептид, содержащий меньше, чем 100 аминокислот, меньше, чем 50 аминокислот, меньше, чем 30 аминокислот, меньше, чем 25 аминокислот, меньше, чем 20 аминокислот, меньше, чем 15 аминокислот, меньше, чем 10 аминокислот или меньше, чем 5 аминокислот. В некоторых случаях, нагрузка или катион могут включать короткий лидерный пептид, содержащий от 1 до 100 аминокислот, от 5 до 10 аминокислот, от 10 до 50 аминокислот или от 20 до 80 аминокислот.

[0194] В вариантах осуществления, где нагрузка или катион экспрессируются вместе с другой последовательностью в виде слитого белка, нагрузка или катион могут быть вставлены в слитую молекулу любым способом, известным специалисту в данной области, без ограничений. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, соответствующие нагрузке или катиону, могут быть непосредственно вставлены в нуклеиновые кислоты, кодирующие другой фрагмент или слитую молекулу, с делецией нативных аминокислотных последовательностей или без нее.

[0195] В вариантах осуществления, где нагрузка или катион не экспрессируются вместе в виде слитого белка, нагрузка или катион могут быть связаны любым подходящим способом, известным специалисту в данной области, без ограничений. Более конкретно, примеры способов, описанных выше для соединения рецепторсвязывающего домена с остальной частью молекулы, в равной степени применимы для соединения нагрузки или катиона с остальной частью молекулы.

VI. Продукция нуклеиновых кислот, кодирующих носители и/или нагрузки

[0196] В различных вариантах осуществления, носители, нагрузки и/или неприродные конструкции для доставки, такие как, слитая молекула по настоящему изобретению, получают методом, описанным, например, в патентах США № 9090691 и 7713737, каждый из которых включен полностью в настоящий документ посредством ссылки.

[0197] В различных вариантах осуществления, носители, нагрузки и/или неприродные слитые молекулы синтезируются методом рекомбинантной ДНК. В общем случае, метод может включать формирование последовательности ДНК, которая кодирует носитель, нагрузку и/или слитую молекулу, помещение ДНК в кассету экспрессии под контролем определенного промотора, экспрессию молекулы в хозяине, выделение экспрессируемой молекулы и, при необходимости, сворачивание молекулы в активную конформационную форму.

[0198] ДНК, кодирующая носитель, нагрузку и/или слитые молекулы, описанные в настоящем документе, может быть получена любым подходящим способом, включая, например, клонирование и рестрикцию соответствующих последовательностей или прямой химический синтез методами, такими как фосфотриэфирный метод, описанный Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99; фосфотриэфирный метод, описанный Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151; диэтилфосфорамидитный метод, описанный Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862; метод синтеза на твердой подложке, описанный в патенте США № 4458066 и т.п.

[0199] Химический синтез может обеспечить одноцепочечный олигонуклеотид. Его можно преобразовать в двухцепочечную ДНК путем гибридизации с комплементарной последовательностью или путем полимеризации посредством ДНК-полимеразы с использованием одноцепочечной ДНК в качестве матрицы. Химический синтез можно использовать для создания последовательностей ДНК примерно из 100 оснований. Более длинные последовательности могут быть получены лигированием более коротких последовательностей.

[0200] Альтернативно субпоследовательности могут быть клонированы и соответствующие субпоследовательности расщеплены с использованием соответствующих ферментов рестрикции. Затем фрагменты можно лигировать с получением желаемой последовательности ДНК.

[0201] В различных вариантах осуществления, ДНК, кодирующая носитель, нагрузку и/или слитые молекулы по настоящему изобретению, можно клонировать с использованием методов амплификации ДНК, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Таким образом, например, ген или гены для одной или нескольких нагрузок, т.е. одну или несколько биологически активных нагрузок подвергают ПЦР-амплификации с использованием смыслового праймера, содержащего сайт рестрикции, например, для NdeI, и антисмыслового праймера, содержащего сайт рестрикции для HindIII. Это может привести к образованию одной или нескольких нуклеиновых кислот, кодирующих одну или несколько последовательностей нагрузки и имеющих терминальные сайты рестрикции. Носитель, имеющий “комплементарные” сайты рестрикции, может быть аналогичным образом клонирован и затем лигирован с одной или несколькими нуклеиновыми кислотами, кодирующими одну или несколько нагрузок, и/или с линкером, присоединенным к одной или нескольким нуклеиновым кислотам, кодирующим одну или несколько нагрузок. Лигирование последовательностей нуклеиновых кислот и вставка в вектор обеспечивает вектор, кодирующий одну или несколько нагрузок, присоединенных к носителю/носителям.

VII. Расщепляемые линкеры

[0202] В различных вариантах осуществления, одна или несколько нагрузок, например, гетерологичных нагрузок, которые должны быть доставлены субъекту, связаны с носителем с использованием одного или нескольких расщепляемых линкеров. Количество расщепляемых линкеров, присутствующих в молекуле слияния, зависит по меньшей мере частично, от расположения одной или нескольких нагрузок относительно носителя, и от природы биологически активной нагрузки. В случае, если одна или несколько нагрузок могут быть отделены от остатка слитой молекулы с расщеплением по одному линкеру, слитые молекулы могут содержать один расщепляемый линкер. Кроме того, в тех случаях, когда одна или несколько нагрузок представляют собой, например, димер или другой мультимер, каждая субъединица одной или нескольких нагрузок может быть отделена от остатка слитой молекулы и/или других субъединиц одной или нескольких нагрузок путем расщепления по расщепляемому линкеру.

[0203] В различных вариантах осуществления, расщепляемые линкеры расщепляются посредством расщепляющего фермента, который присутствует на базолатеральной мембране эпителиальной клетки или рядом с ней. Вследствие выбора расщепляемого линкера для расщепления такими ферментами, одна или несколько нагрузок могут высвобождаться из остатка слитой молекулы после транскитоza через слизистую мембрану и высвобождаться из эпителиальной клетки в клеточный матрикс на базолатеральной стороне мембраны. Кроме того, можно использовать расщепляющие ферменты, которые присутствуют внутри эпителиальной клетки, таким образом, что расщепляемый линкер расщепляется перед высвобождением слитой молекулы из базолатеральной мембраны, при условии, что расщепляющий фермент не расщепит слитую молекулу до того, как слитая молекула войдет в транспортный путь в поляризованной эпителиальной клетке, что приведет к высвобождению слитой молекулы и одной или нескольких нагрузок из базолатеральной мембраны клетки.

[0204] В различных вариантах осуществления, расщепляемый линкер проявляет большую способность к расщеплению, чем остальная часть конструкции для доставки. Как известно специалисту в данной области, многие пептидные и полипептидные последовательности могут быть расщеплены пептидазами и протеазами. В различных вариантах осуществления, расщепляемый линкер выбран таким образом, чтобы он был предпочтительно расщеплен, по сравнению с другими аминокислотными последовательностями, присутствующими в конструкции для доставки, в процессе введения конструкции для доставки. В различных вариантах осуществления, рецепторсвязывающий домен является по существу (например, примерно 99%, примерно 95%, примерно 90%, примерно 85%, примерно 80 или примерно 75%) интактным после доставки конструкции для доставки в кровотока субъекта. В различных вариантах осуществления, транскитозная активность по существу (например, примерно 99%, примерно 95%, примерно 90%, примерно 85%, примерно 80 или примерно 75%) остается интактной после доставки конструкции для доставки в кровотока субъекта. В различных вариантах осуществления, макромолекула остается практически (например, примерно на 99%, примерно 95%, примерно 90%, примерно 85%, примерно 80 или примерно 75%) интактной после доставки конструкции для доставки в кровотока субъекта. В различных вариантах осуществления, расщепляемый линкер в значительной степени (например, примерно на 99%, примерно на 95%, примерно на 90%, примерно на 85%, примерно на 80 или примерно на 75%) расщепляется после доставки конструкции в кровотока субъекта.

[0205] В других вариантах осуществления, для расщепления расщепляемого линкера может быть использован расщепляющий фермент, обнаруженный в плазме субъекта. Любой расщепляющий фермент, который, как известно специалисту в данной области, присутствует в плазме субъекта, может быть использован для расщепления расщепляемого линкера.

[0206] В различных вариантах осуществления, расщепляемый линкер расщепляется расщепляющим ферментом, обнаруженным в плазме субъекта. Любой расщепляющий

фермент, который, как известно специалисту в данной области, присутствует в плазме субъекта, может быть использован для расщепления расщепляемого линкера. В некоторых случаях, для расщепления конструкций доставки можно использовать расщепляющие ферменты плазмы. В других вариантах осуществления, расщепляемый линкер содержит нуклеиновую кислоту, такую как РНК или ДНК. В других вариантах осуществления, расщепляемый линкер содержит углевод, такой как дисахарид или трисахарид.

[0207] В различных вариантах осуществления, расщепляемый линкер может представлять собой расщепляемый линкер, который расщепляется после изменения среды слитой молекулы. Например, расщепляемый линкер может быть расщепляемым линкером, который чувствителен к значению рН и расщепляется при изменении значения рН, что происходит, когда слитая молекула высвобождается из базально-латеральной мембраны поляризованной эпителиальной клетки. Например, среда просвета кишечника может быть сильнощелочной, тогда как плазма может быть практически нейтральной. Таким образом, расщепляемый линкер может представлять собой фрагмент, который расщепляется при сдвиге значения рН от щелочного к нейтральному. Изменением среды слитой молекулы, которая расщепляет расщепляемый линкер, может быть любое изменение окружающей среды, происходящее в случае, когда слитая молекула высвобождается из базально-латеральной мембраны поляризованной эпителиальной клетки, известное специалисту в данной области, без ограничения.

VIII. Нерасщепляемые линкеры

[0208] В различных вариантах осуществления, носитель и одна или несколько нагрузок могут быть разделены линкером. В случае, когда используется линкер, линкер может включать одну или несколько аминокислот. Примеры рассматриваемых в настоящем документе линкеров включают такие последовательности, как S, (GS)_x, (GGS)_x, (GGGS)_x, (GGGS)_x или (GGGGGS)_x, где $x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14$ или 15 . В некоторых случаях линкер не включает концевой остаток S, например, SEQ ID NO: 4 (GGGGSGGGSGGGG). В общем случае линкер не может обладать конкретной биологической активностью, кроме связывания белков или сохранения некоторой минимальной дистанции или другого пространственного отношения между ними. Однако в различных вариантах осуществления, аминокислоты, входящие в состав линкера, могут быть выбраны таким образом, чтобы они оказывали влияние на некоторые свойства молекулы, такие как фолдинг, полный заряд или гидрофобность.

[0209] В различных вариантах осуществления, линкер способен образовывать ковалентные связи как с носителем, так и с биологически активной нагрузкой. Подходящие линкеры включают прямые или разветвленные углеродные линкеры, гетероциклические углеродные линкеры или пептидные линкеры. В различных вариантах осуществления, линкер(ы) может быть присоединен к составляющим аминокислотам носителя и/или одной или несколькими нагрузкам через их боковые группы (например, через дисульфидную связь с цистеином). В различных вариантах осуществления, линкеры присоединены к альфа-углеродным амино- и/или карбоксильным группам концевых

аминокислот носителя и/или биологически активной нагрузки.

[0210] Бифункциональный линкер, имеющий одну функциональную группу, взаимодействующую с группой на носителе, и другую группу, взаимодействующую с одной или несколькими нагрузками, можно использовать для формирования желаемого конъюгата. Альтернативно, дериватизация может включать химическую обработку нацеливающего фрагмента. Способы образования, например, свободных сульфгидрильных групп на полипептидах, таких как антитела или фрагменты антител, являются хорошо известными (см. патент США № 4659839).

[0211] Известно множество способов и линкерных молекул для присоединения различных соединений, включая радиоактивные хелаты металлов, носители и лекарственные средства, к белкам, таким как антитела. Смотри, например, Европейскую патентную заявку №188256; патент США № 4671958, 4659839, 4414148, 4699784; 4680338; 4569789; и 4589071; и Borlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075.

IX. Химическая конъюгация или образование комплекса нагрузки или катиона с носителем

[0212] В различных вариантах осуществления, нагрузка, которая должна быть доставлена субъекту, химически конъюгирована с носителем. Способы химического конъюгирования молекул хорошо известны специалистам в данной области.

[0213] Процедура конъюгации двух молекул изменяется в зависимости от химической структуры агента. Полипептиды обычно содержат множество функциональных групп; например, группы карбоновой кислоты (COOH) или свободного амина (--NH₂), которые доступны для взаимодействия с подходящей функциональной группой на другом пептиде или на линкере для присоединения к нему молекул.

[0214] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения, выделенные носители получают путем бактериальной ферментации и очищают существующими способами. Затем очищенный носитель модифицируется на своем С-конце, чтобы сделать возможным прямое химическое связывание через свободный сульфгидрильный остаток, расположенный рядом с С-концом белка. С-концевая модификация может включать цистеин-ограниченную петлю, содержащую консенсусную последовательность расщепления ENLFQS для высокоселективной протеазы из вируса гравировки табака (TEV), второй цистеин и гексагистидиновую (His6) метку (например, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78). Второй цистеин включен для формирования дисульфидного мостика с цистеином, который в конечном итоге используется для связывания. Добавление последовательности His6 к белку может упростить очистку, а последовательность расщепления TEV обеспечивает механизм для селективного удаления концевых остатков цистеина после мягкого восстановления. Расщепление TEV и мягкое восстановление с помощью 0,1 мМ дитиотеитола после экспрессии и выделения конструкций нетоксичного бактериального токсина позволяет осуществлять прямое химическое связывание агента, регулирующего уровень глюкозы, например агента, воспринимающего уровень активности посредством реакции на основе малеимида в

качестве общего механизма прикрепления нагрузки. После расщепления, восстановления и связывания протеазой TEV посредством малеимидной реакции со свободным сульфгидрилом, удаление высвобожденной С-концевой последовательности было достигнуто на второй стадии колоночной хроматографии с Ni²⁺.

[0215] В некоторых вариантах осуществления, конструкция для доставки содержит частицы, которые ковалентно декорированы носителем, и при этом нагрузка интегрирована в частицы. В некоторых вариантах осуществления частицы могут быть меньше ~150 нм в диаметре, меньше ~100 нм или меньше ~50 нм.

Анализ трансцитоза

[0216] Функцию носителя можно анализировать на основе его способности пропускать носитель или нагрузку, ассоциированную с носителем, например, в частице, через эпителиальную мембрану. Поскольку для трансцитоза может сначала потребоваться связывание с клеткой, указанные анализы также можно использовать для оценки функции домена распознавания клеток.

[0217] Трансцитозную активность можно анализировать любым способом, известным специалисту в данной области, без ограничений. Трансцитозную активность можно анализировать путем оценки способности композиции, частицы, проникать в неполяризованную клетку, с которой она связывается. Аналогичное свойство, которое позволяет носителю проходить через поляризованную эпителиальную клетку, может также обеспечить молекулам, содержащим носитель, проникновение в неполяризованные клетки. Таким образом, способность композиции проникать в клетку можно оценить, например, путем обнаружения физического присутствия композиции (например, носителя или нагрузки) внутри клетки. Например, композиция может быть помечена, например, флуоресцентным маркером, и доставка вступает в контакт с клеткой. Затем клетки можно промыть, удалив любую композицию (например, носитель или нагрузку, например конструкцию для доставки, которая не проникла в клетку, и определить количество оставшейся метки. Обнаружение метки в этом анализе указывает на то, что композиция проникла в клетку.

[0218] Способность композиции к трансцитозу можно проверить путем оценки способности носителя или нагрузки (например, конструкции для доставки) проходить через поляризованную эпителиальную клетку. Например, композиция может метиться, например флуоресцентным маркером, и вступать в контакт с апикальными мембранами слоя эпителиальных клеток. Флуоресценция, обнаруженная на базально-латеральной стороне мембраны, образованной эпителиальными клетками, показывает, что носитель функционирует должным образом.

Анализ расщепления расщепляемого линкера

[0219] Функция расщепляемого линкера обычно может быть исследована в анализе расщепления. Любой подходящий анализ расщепления, известный специалисту в данной области, без ограничения, может быть использован для исследования расщепляемых линкеров. Для исследования способности фермента расщеплять расщепляемые линкеры

можно использовать как клеточный анализ, так и бесклеточный анализ.

[0220] Типичный бесклеточный анализ для исследования расщепления расщепляемых линкеров включает получение экстрактов поляризованных эпителиальных клеток и экспонирование меченной слитой молекулы, несущей расщепляемый линкер, к фракции экстракта, соответствующей мембранаассоциированным ферментам. В указанных анализах, метка может прикрепляться либо к агенту, регулирующему уровень глюкозы, например, доставляемому агенту, снижающему уровень глюкозы, либо к остатку слитой молекулы. В числе этих ферментов присутствуют ферменты расщепления, обнаруживаемые рядом с базально-латеральной мембраной поляризованной эпителиальной клетки, как описано выше. Расщепление можно обнаружить, например, путем связывания слитой молекулы, например, с антителом, и отмывания несвязавшихся молекул. Если метка прикреплена к агенту, регулирующему уровень глюкозы, например, доставляемому агенту, то на молекуле, связанной с антителами, должно быть незначительное количество меток или они должны отсутствовать. Альтернативно, связывающий агент, используемый в анализе, может быть специфичным в отношении агента, регулирующего уровень глюкозы, например, агента, снижающего уровень глюкозы, причем остаток конструкции может быть помеченным. В любом случае расщепление может быть оценено.

[0221] Расщепление также может быть исследовано с помощью клеточных анализов, посредством которых анализируется расщепление поляризованными эпителиальными клетками, собранными в мембраны. Например, меченая слитая молекула или часть слитой молекулы, содержащей расщепляемый линкер, может контактировать либо с апикальной, либо с базолатеральной стороной монослоя подходящих эпителиальных клеток, таких как, например, клетки Caco-2, в условиях которые обеспечивают расщепление линкера. Расщепление можно обнаружить путем обнаружения присутствия или отсутствия метки с использованием реагента, который специфически связывает слитую молекулу или ее часть. Например, антитело, специфичное в отношении слитой молекулы, можно использовать для связывания слитой молекулы, содержащей метку, удаленную от расщепляемого линкера относительно части слитой молекулы, связанной с антителом. Затем может быть оценено расщепление путем обнаружения присутствия метки на молекулах, связанных с антителом. В случае, если произошло расщепление, метки могут наблюдаться в незначительном количестве или полностью отсутствовать на молекулах, связанных с антителом. При проведении таких экспериментов можно идентифицировать ферменты, которые расщепляют преимущественно на базолатеральной мембране, а не апикальной мембране, и, кроме того, можно подтвердить способность таких ферментов расщеплять расщепляемый линкер в слитой молекуле.

[0222] Кроме того, расщепление также можно исследовать с использованием флуоресцентного репортерного анализа, как описано в патенте США № 6759207. Вкратце, в таких анализах, флуоресцентный репортер может вступать в контакт с базолатеральной

стороной монослоя подходящих эпителиальных клеток в условиях, которые позволяют расщепляющему ферменту расщеплять репортер. Расщепление репортера изменяет структуру флуоресцентного репортера, изменяя его конфигурацию с нефлуоресцентной на флуоресцентную. Количество наблюдаемой флуоресценции может указывать на активность расщепляющего фермента, присутствующего на базолатеральной мембране.

[0223] Кроме того, расщепление также можно исследовать с использованием молекулярного зонда с внутримолекулярным гашением, например описанного в патенте США № 6592847. Такие зонды обычно содержат флуоресцентный компонент, испускающий фотоны при возбуждении светом соответствующей длины волны, а также компонент гасителя, который поглощает такие фотоны в непосредственной близости от флуоресцентного компонента. Расщепление зонда отделяет компонент гасителя от флуоресцентного компонента, так что можно обнаружить флуоресценцию, тем самым указывая на то, что расщепление произошло. Таким образом, такие зонды можно использовать для идентификации и оценки расщепления определенными расщепляющими ферментами путем контакта базолатеральной стороны монослоя подходящих эпителиальных клеток с зондом в условиях, позволяющих расщепляющему ферменту расщеплять зонд. Наблюдаемая величина флуоресценции указывает на активность исследуемого расщепляющего фермента.

Х. Способы применения

[0224] Способы и композиции, например, фармацевтические композиции по настоящему изобретению, можно использовать для лечения заболеваний или состояний, например, медицинских состояний. Способы и композиции могут быть пригодны для перорального и/или интраназального введения и доставки. Заболевание или состояние может быть иммунологическим заболеванием, метаболическим заболеванием или заболеванием центральной нервной системы (ЦНС). “Метаболические заболевания или расстройства” могут относиться к сочетанию медицинских расстройств, которые при совместном протекании повышают риск развития диабета и атеросклеротического сосудистого заболевания, т.е. болезни сердца и инсульт. Определяющие медицинские параметры для метаболического синдрома включают сахарный диабет, нарушение толерантности к глюкозе, повышенный уровень глюкозы натощак, инсулинорезистентность, секрецию альбумина с мочой, центральный тип ожирения, гипертензию, повышенный уровень триглицеридов, повышенный уровень холестерина ЛПНП и сниженный уровень холестерина ЛПВП.

[0225] Способы и композиции, например, фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения нервного заболевания, состояния, связанного с иммунологией, и состояния, связанного с эндокринологией, состояния, связанного с иммуноневрологией, состояния, связанного с нейроэндокринологией, или состояние, связанного с иммуноэндокринологией. Способы и композиции, например, фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, можно использовать для лечения сердечно-сосудистого заболевания, редкого

заболевания, заболевания печени, воспалительного заболевания кишечника, респираторного заболевания, неврологического заболевания или желудочно-кишечного расстройства. Композицией, представленной в настоящем документе, может быть вакцина. Заболевания или состояния включают, например, вирусное заболевание или инфекции, злокачественную опухоль, метаболические заболевания, ожирение, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, аллергию, реакцию “трансплантат против хозяина”, системную микробную инфекцию, анемию, сердечно-сосудистые заболевания, психозы, генетические заболевания, нейродегенеративные заболевания, нарушения кроветворных клеток, заболевания эндокринной системы или репродуктивной системы, желудочно-кишечные заболевания. Другие примеры заболеваний включают, но ими не ограничиваются, диабет, диабет вследствие ожирения, гипергликемию, дислипидемию, гипертриглицеридемию, метаболический синдром X, инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическую дислипидемию, гиперлипидемию, жировую болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH), гепатит, ожирение, сосудистые заболевания, болезни сердца, инсульт, нарушение толерантности к глюкозе, повышенный уровень глюкозы натощак, инсулинорезистентность, секреция альбумина с мочой, центральный тип ожирения, гипертензия, повышенный уровень триглицеридов, повышенный уровень холестерина ЛПНП и сниженный уровень холестерина ЛПВП, гипергликемия, гиперинсулинемия, дислипидемия, кетоз, гипертриглицеридемия, метаболический синдром X, инсулинорезистентность, нарушенная гликемия натощак, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическая дислипидемия, глюконеогенез, избыточный гликогенолиз, диабетический кетоацидоз, гипертриглицеридемия, гипертензия, диабетическая нефропатия, почечная недостаточность, декомпенсированная почечная недостаточность, гиперфагия, атрофия мышц, диабетическая невропатия, диабетическая ретинопатия, диабетическая кома, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, заболевание периферических артерий, фиброз и гиперлипидемия. Заболевания или состояния могут представлять собой язвенный колит, болезнь Крона, псориаз, псориатический артрит, ревматоидный артрит или псориаз. Заболевания или состояния могут представлять собой гастроэнтерологическое состояние, например, синдром короткой кишки (SBS). Заболевания или состояния могут представлять собой дефицит гормона роста. В некоторых случаях композиция по настоящему изобретению содержит GLP-2, и композицию вводят, например, перорально, субъекту с гастроэнтерологическим заболеванием, например, синдромом короткой кишки (SBS). В некоторых случаях, композиция по настоящему изобретению содержит GLP-1, причем композицию вводят, например, перорально, субъекту для лечения метаболического заболевания; композиция может быть составлена для пероральной доставки для местного желудочно-кишечного и/или системного воздействия. В некоторых случаях, композиция по настоящему изобретению содержит GLP-1 или аналог GLP-1, причем композиция предоставляется, например, перорально субъекту для лечения метаболического расстройства (например,

диабета, ожирения) или неалкогольного стеатогепатита (NASH) или заболевания центральной нервной системы (CNS). Композиция может быть составлена для пероральной доставки. В некоторых случаях, композиция по настоящему изобретению содержит гормон роста человека, и композиция предоставляется субъекту с дефицитом гормона роста или родственным расстройством для лечения дефицита гормона роста или родственного расстройства. Композиция может быть составлена для пероральной доставки, и целевая локация для нагрузки может соответствовать системное воздействие. В некоторых случаях, нагрузка может достигать печени. В некоторых случаях, композиция по настоящему изобретению содержит инкретин. В некоторых случаях, композицию по настоящему изобретению вводят субъекту для регуляции гликемической функции.

[0226] При многих хронических заболеваниях, пероральные и/или интраназальные композиции по настоящему изобретению могут быть особенно эффективны, поскольку они могут обеспечить долгосрочный уход за пациентом и терапию посредством домашнего применения без использования инъекционного лечения или лекарственных протоколов. Композиции по настоящему описанию можно вводить перорально, пульмонально, интраназально, трансбуккально или сублингвально. Таким образом, в другом аспекте, настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, которая представляет собой самособирающуюся частицу, например, микрочастицу, содержащую носитель, нагрузку (например, гетерологичную нагрузку) и/или неприродную слитую молекулу в качестве лекарственного вещества в пилюле или таблетке для пероральной доставки одной или нескольких нагрузок при лечении заболеваний и состояний, для которых показано применение одной или нескольких нагрузок, содержащихся в таких композициях.

[0227] Фармацевтические композиции, которые представляют собой частицы, например, микрочастицы, содержащие носитель, нагрузку (например, гетерологичную нагрузку) и/или слитые молекулы по настоящему изобретению, могут иметь несколько преимуществ по сравнению с обычными методами локальной или системной доставки макромолекул субъекту. Основным в числе таких преимуществ является возможность доставки одной или нескольких нагрузок субъекту без использования иглы для прокола кожи субъекта. Многим субъектам требуются повторные регулярные дозы макромолекул. Качество жизни таких субъектов было бы значительно улучшено, если бы доставку макромолекулы можно было осуществить без инъекции, при этом избегая боль или возможные осложнения.

[0228] Кроме того, связывание одной или нескольких нагрузок с остатком слитой молекулы с линкером, который расщепляется ферментом, присутствующим на базолатеральной мембране эпителиальной клетки, может обеспечить высвобождение одной или нескольких нагрузок из слитой молекулы и высвобождение из остатков слитой молекулы вскоре после транцитоза через эпителиальную мембрану. Такое высвобождение может снизить вероятность вызывания иммунного ответа против

нагрузки, например, биологически активной нагрузки. Оно также может обеспечить взаимодействие одной или нескольких нагрузок со своей мишенью без остатка слитой молекулы.

[0229] Кроме того, после переноса через эпителий ЖКТ, слитые молекулы по настоящему изобретению будут демонстрировать увеличенный период полужизни в сыворотке, то есть одна или несколько нагрузок слитых молекул могут демонстрировать увеличенный период полужизни в сыворотке по сравнению с одной или несколькими нагрузками в неслитом состоянии, и в результате пероральное введение слитой молекулы может доставить более высокую эффективную концентрацию доставляемой одной или нескольких нагрузок в печень субъекта по сравнению с наблюдаемой в плазме крови субъекта.

[0230] Конструкции по настоящему изобретению могут снижать чувствительность нагрузки к протеолитическому расщеплению, способствовать рефолдингу химеры и улучшать стабильность химеры в процессе хранения. Таким образом, слитые молекулы могут быть использованы в получении нового класса фармацевтических композиций для перорального введения биологически активных терапевтических средств.

[0231] Используемые в настоящем документе термины “совместное введение”, “совместно вводимый” и “в сочетании с”, относящиеся к микрочастицам или наночастицам по настоящему изобретению и одному или нескольким другим терапевтическим средствам, могут включать: одновременное введение такого сочетания микрочастиц или наночастиц по настоящему изобретению и терапевтического средства(средств) пациенту, нуждающегося в лечении, когда такие компоненты объединены в монолитную лекарственную форму, которая высвобождает компоненты у пациента по существу в одно и то же время; по существу одновременное введение такого сочетания микрочастиц или наночастиц по настоящему изобретению и терапевтического средства(средств) пациенту, нуждающемуся в таком лечении, когда такие компоненты получены отдельно друг от друга в виде отдельных лекарственных форм, которые принимаются по существу в одно и то же время пациентом, после чего компоненты высвобождаются у пациента по существу в одно и то же время; последовательное введение такого сочетания микрочастиц или наночастиц по настоящему изобретению и терапевтического средства(средств) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты получены отдельно друг от друга в виде отдельных лекарственных форм, которые последовательно принимаются пациентом со значительным временным интервалом между каждым введением, после чего компоненты высвобождаются у пациента в существенно разное время; и последовательное введение такого сочетания микрочастиц по настоящему изобретению и терапевтического средства(средств) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты объединены в монолитную лекарственную форму, которая высвобождает компоненты контролируемым образом, после чего они высвобождаются одновременно, последовательно и/или высвобождение перекрывается по времени и/или в разное время у пациента, где каждая часть может быть

введена либо одним и тем же, либо другим способом.

[0232] В различных вариантах осуществления, комбинированная терапия включает одновременное введение композиции выделенных микрочастиц или наночастиц и композиции второго средства либо в одной и той же фармацевтической композиции, либо в отдельных фармацевтических композициях. В различных вариантах осуществления, композицию выделенных микрочастиц или наночастиц и композицию второго средства вводят последовательно, то есть композицию выделенных микрочастиц или наночастиц вводят либо до, либо после введения композиции второго средства.

[0233] В различных вариантах осуществления, введение частицы, например, композиции микрочастиц или наночастиц и композиции второго средства является одновременным, то есть период введения композиции выделенной частицы, например, микрочастицы или наночастицы, и композиции второго средства перекрываются друг с другом.

[0234] В различных вариантах осуществления, введение композиции частиц, например микрочастиц или наночастиц, и композиции второго агента не является одновременным. Например, в различных вариантах осуществления введение композиции выделенной частицы, например микрочастицы или наночастицы, прекращают до введения композиции второго средства. В различных вариантах осуществления, введение композиции второго средства прекращается до введения композиции выделенной f-частицы, например, микрочастицы или наночастицы.

[0235] В различных вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество микрочастиц или наночастиц, описанных в настоящем документе, будет вводиться в сочетании с одним или несколькими другими терапевтическими средствами. Такие терапевтические средства могут быть приняты в данной области техники в качестве стандартного лечения конкретного болезненного состояния, как описано в настоящем документе, такого как метаболическое расстройство, воспалительная болезнь печени, воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание, злокачественная опухоль или задержка роста, обусловленная с дефицитом гормона роста (GH). Типичные предполагаемые терапевтические средства включают, но ими не ограничиваются, цитокины, факторы роста, стероиды, нестероидные противовоспалительные препараты, базисные препараты для лечения ревматоидного артрита, противовоспалительные средства, химиотерапевтические средства, радиотерапевтические средства или другие активные и вспомогательные средства.

[0236] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, классифицированного как страдающего ожирением (например, имеющего индекс массы тела (BMI) 30 кг/м^2 или больше), включающим введение субъекту терапевтически эффективного количества композиция, например частицы, содержащей носитель и нагрузку (например, конструкцию для доставки) по настоящему изобретению.

[0237] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта с диагнозом диабет 1 типа (T1D), включающим пероральное введение

композиции, например, частицы, содержащей носитель и нагрузку (например, конструкцию для доставки) по настоящему изобретению, в количестве, достаточном для лечения указанного заболевания, без добавления инсулина.

[0238] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта с диагнозом диабет 1 типа (T1D), включающим (a) пероральное введение композиции, например, частицы, содержащей носитель и нагрузку (например, конструкцию для доставки) по настоящему изобретению, в количестве, достаточном для лечения указанного заболевания, и (b) добавление инсулина. В некоторых вариантах осуществления, добавка инсулина включает введение дозы инсулина, которая может составлять от около 70% до 90%, от около 50% до 70%, от около 30% до 50%, от около 15% до 30%, от около 10 до 15%, примерно от 5 до 10% и от 0 до 5%, включая 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% или 0,1% от нормальной суточной дозы инсулина.

[0239] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта с диагнозом диабета 2 типа (T2D), включающим пероральное введение композиции, например, частицы, содержащей носитель и нагрузку (например, конструкцию для доставки) по настоящему изобретению, в количестве, достаточном для лечения указанного заболевания.

[0240] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего заболеванием печени (например, неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD); неалкогольным стеатогепатитом (NASH)), желудочно-кишечным заболеванием или нейродегенеративным заболеванием, причем указанный способ включает пероральное введение композиции, например, частицы, содержащей носитель и нагрузку (например, конструкцию для доставки) по настоящему изобретению, в количестве, достаточном для лечения указанного заболевания.

XI. Полинуклеотиды, кодирующие носители, нагрузки и слитые молекулы

[0241] В другом аспекте, в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую носитель, нагрузку (например, гетерологичную нагрузку) и неприродные слитые молекулы. Эти полинуклеотиды используются, например, для изготовления носителя, нагрузки (например, гетерологичной нагрузки) и слитых молекул. В еще одном аспекте, в настоящем изобретении предложена система экспрессии, которая содержит рекомбинантную полинуклеотидную последовательность, кодирующую носитель, например, носитель CholiX или PE, и область вставки полилинкера для полинуклеотидной последовательности, кодирующей нагрузку, например, агент, регулирующий уровень глюкозы, например, агент, снижающий уровень глюкозы или катион. В различных вариантах осуществления, система экспрессии может содержать полинуклеотидную последовательность, которая кодирует расщепляемый линкер, вследствие чего расщепление по расщепляемому линкеру отделяет нагрузку, например, агент, кодированный нуклеиновой кислотой, вставленной в область вставки полилинкера, от

остальной части кодированной слитой молекулы. Таким образом, в вариантах осуществления, где область вставки полилинкера находится на конце кодируемой конструкции, полинуклеотид содержит одну нуклеотидную последовательность, кодирующую расщепляемый линкер между областью вставки полилинкера и остатком полинуклеотида. В вариантах осуществления, где область вставки полилинкера не находится на конце кодируемой конструкции, область вставки полилинкера может быть фланкирована нуклеотидными последовательностями, каждая из которых кодирует расщепляемый линкер.

[0242] Различные методы *in vitro*, которые можно использовать для получения полинуклеотида, кодирующего носитель, например, носитель Choliх или PE, нагрузку или слитые молекулы по настоящему изобретению, включают, но ими не ограничиваются, обратную транскрипцию, полимеразную цепную реакцию (PCR), лигазную цепную реакцию (LCR), систему опосредованной транскрипцией амплификации (TAS), систему самоподдерживающейся реакции репликации последовательностей (3SR) и систему амплификации с использованием QP-репликазы (QB)

[0243] Руководство по использованию этих методов клонирования и амплификации *in vitro* описано, например, в патенте США № 4683195; Mullis et al., 1987, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; и Erlich, ed., 1989, PCR Technology, Stockton Press, NY. Полинуклеотиды, кодирующие слитую молекулу или ее часть, также могут быть выделены путем скрининга геномных библиотек или библиотек кДНК с помощью зондов, выбранных из последовательностей желаемого полинуклеотида в жестких, умеренно жестких или высоко жестких условиях гибридизации.

[0244] Конструирование нуклеиновых кислот, кодирующих носители, нагрузки или слитые молекулы по настоящему изобретению, может быть облегчено путем введения в конструкцию сайта встраивания для нуклеиновой кислоты, кодирующей агент, снижающий уровень активности.

[0245] Кроме того, полинуклеотиды также могут кодировать секреторную последовательность на амино-конце кодируемого носителя, нагрузки или слитой молекулы. Такие конструкции используются для получения носителей, нагрузок или слитых молекул в клетках млекопитающих, поскольку они упрощают выделение иммуногена.

[0246] Кроме того, полинуклеотиды по настоящему изобретению также охватывают варианты производных полинуклеотидов, кодирующих носитель, нагрузку или слитую молекулу. Например, производные могут быть получены сайт-специфическим мутагенезом, включая замену, вставку или делецию одного, двух, трех, пяти, десяти или более нуклеотидов полинуклеотидов, кодирующих слитую молекулу. Альтернативно, производные могут быть получены неспецифическим мутагенезом.

[0247] Соответственно, в различных вариантах осуществления в описании предложен полинуклеотид, который кодирует носитель, нагрузку или слитую молекулу. Носитель, нагрузка или слитая молекула могут включать модифицированный носитель и

нагрузку, например агент, регулирующий уровень глюкозы, например агент, снижающий уровень глюкозы, который должен быть доставлен субъекту; и, необязательно, расщепляемый линкер. Расщепление по расщепляемому линкеру может отделить нагрузку, например агент, регулирующий уровень глюкозы, например, агент, снижающий уровень глюкозы, от остальной части слитой молекулы. Расщепляемый линкер может быть расщеплен ферментом, присутствующим на базально-латеральной мембране поляризованной эпителиальной клетки субъекта или в плазме субъекта.

[0248] В различных вариантах осуществления, полинуклеотид гибридизуется в жестких условиях гибридизации с любым полинуклеотидом по настоящему изобретению. В дополнительных вариантах осуществления, полинуклеотид гибридизуется в жестких условиях с нуклеиновой кислотой, которая кодирует любой носитель, нагрузку или слитую молекулу по настоящему изобретению.

[0249] В еще одном аспекте, изобретение относится к векторам экспрессии для экспрессии носителей, нагрузок или слитых молекул. Обычно, векторы экспрессии могут представлять собой рекомбинантные полинуклеотидные молекулы, содержащие последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид. Векторы экспрессии могут быть легко адаптированы для работы у прокариот или эукариот путем включения соответствующих промоторов, последовательностей репликации, селективируемых маркеров и т.д., что обеспечивает стабильную транскрипцию и трансляцию или мРНК. Методы конструирования векторов экспрессии и экспрессии генов в клетках, содержащих векторы экспрессии, хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning--A Laboratory Manual*, 3.sup.rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., а также Ausubel et al., eds., Current Edition, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY.

[0250] Векторы экспрессии могут содержать сигналы экспрессии и репликации, совместимые с клеткой, в которой экспрессируются носители, нагрузки или слитые молекулы. Векторы экспрессии могут быть введены в клетку для экспрессии носителей, нагрузок или слитых молекул любым способом, известным специалисту в данной области, без ограничения. Векторы экспрессии также могут содержать очищающий компонент, упрощающий выделение носителя, нагрузки или слитой молекулы.

[0251] В еще одном аспекте, изобретение относится к клетке, содержащей вектор экспрессии для экспрессии носителей, нагрузок или слитых молекул или их частей. Клетка может быть выбрана, исходя из своей способности экспрессировать высокие концентрации носителя, нагрузки или слитой молекулы для облегчения очистки белка. В различных вариантах осуществления, клетка представляет собой прокариотическую клетку, например, *E. coli*. Как описано, например, в примерах, носители, нагрузки и слитые молекулы могут быть надлежащим образом свернуты и могут содержать соответствующие дисульфидные связи при экспрессии в *E. coli*.

[0252] В других вариантах осуществления, клетка представляет собой

эукариотическую клетку. Используемые эукариотические клетки включают клетки дрожжей и млекопитающих. Любая клетка млекопитающего, известная специалисту в данной области как подходящая для экспрессии рекомбинантного полипептида, без ограничения, может быть использована для экспрессии носителей, нагрузок или слитых молекул. Например, клетки яичника китайского хомячка (СНО) можно использовать для экспрессии носителей, нагрузок или слитых молекул.

[0253] Носитель, нагрузки или слитые молекулы по изобретению могут быть получены путем рекомбинации, как описано ниже. Однако носитель, нагрузки или слитые молекулы также могут быть получены путем химического синтеза с использованием способов, известных специалистам в данной области.

[0254] Способы экспрессии и очистки носителей, нагрузок и слитых молекул по настоящему изобретению подробно описаны в настоящем документе, например, в приведенных ниже примерах. В общем случае, способы могут основываться на введении вектора экспрессии, кодирующего носитель, нагрузку и/или слитую молекулу, в клетку, которая может экспрессировать носитель, нагрузку и/или слитую молекулу из вектора. Затем носитель, нагрузка и/или слитая молекула могут быть очищены для введения субъекту, например, при лечении заболеваний и состояний, для которых показано использование одной или нескольких нагрузок, содержащихся в таких композициях.

ХII. Применение фармацевтических композиций микрочастиц или наночастиц для доставки в легкие

[0255] Композиции частиц, например, фармацевтические композиции микрочастиц, описанные в настоящем документе, можно использовать в качестве лекарственного вещества для пульмональной доставки нагрузки, например, биологически активной нагрузки. Пульмональные методы доставки могут включать распыление или ингаляцию сухого порошка.

[0256] Фармацевтические композиции частиц, например, микрочастиц или наночастиц, могут быть составлены для пульмональной доставки. Фармацевтические композиции, составленные для пульмонального введения, могут быть легко распылены или аэролизированы. В некоторых случаях, фармацевтические композиции, составленные для пульмонального введения, используют способность носителя опосредовать трансцитоз через легочный эпителий. Интраназальное введение может быть использовано для легочной доставки и может включать втягивание или засасывание носом порошка.

ХIII. Применение композиций для перорального введения

[0257] Композиции, например, частицы, например, композиции микрочастиц или наночастиц, например, фармацевтические композиции микрочастиц, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в качестве лекарственного вещества в пилюлях или таблетках для пероральной доставки нагрузки, например, биологически активной нагрузки, индивидууму, например, при лечении заболеваний и состояний, для которых показано использование одной или нескольких нагрузок, содержащихся в таких

композициях.

[0258] Композиции, например, фармацевтические композиции на основе микрочастиц или наночастиц, могут быть составлены для перорального введения. Фармацевтические композиции, составленные для перорального введения, могут быть устойчивыми к разложению в пищеварительном тракте.

[0259] В некоторых случаях, фармацевтические композиции, составленные для перорального введения, используют способность носителя опосредовать транзитоз эпителия желудочно-кишечного тракта (GI). Пероральное введение этих фармацевтических композиций может обеспечить перенос носителя и нагрузки (например, в виде слитой молекулы) через поляризованные эпителиальные клетки слизистой оболочки пищеварительного тракта, например, слизистой оболочки кишечника, с последующим высвобождением нагрузки, например, одной или нескольких нагрузки на базолатеральной стороне слизистой оболочки. Пульмональное введение этих фармацевтических композиций может обеспечить перенос носителя и нагрузки через поляризованные эпителиальные клетки легких и дыхательных путей. Эпителиальная клетка может быть клеткой эпителия полости носа, клеткой эпителия полости рта, клеткой эпителия кишечника, клеткой эпителия прямой кишки, клеткой эпителия влагалища или клеткой эпителия легких. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать добавление усилителя транцитоза для облегчения переноса слитого белка через эпителий ЖКТ или легочный эпителий. Такие усилители известны в данной области, см., например, Xia et al., (2000) *J. Pharmacol. Experiment. Therap.*, 295:594-600; и Xia et al. (2001) *Pharmaceutical Res.*, 18(2):191-195, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

[0260] После переноса через эпителий, композиции, например, фармацевтические композиции в виде микрочастиц или наночастиц по настоящему изобретению, могут проявлять увеличенный период полураспада в сыворотке, то есть нагрузка, например биологически активная нагрузка (например, слитые молекулы), может демонстрировать увеличенный период полужизни в сыворотке по сравнению с нагрузкой, например биологически активной нагрузкой, в ее неслитом состоянии. Пероральные композиции фармацевтических композиций по настоящему изобретению могут быть получены таким образом, чтобы они были пригодны для транспорта в эпителий ЖКТ и защиты носителя, нагрузки или слитой молекулы в желудке. Такие композиции могут включать компоненты носителя и диспергатора и могут быть в любой подходящей форме, включая аэрозоли (для пероральной или пульмональной доставки), сиропы, эликсиры, таблетки, включая жевательные таблетки, твердые или мягкие капсулы, пастилки, леденцы, водные или масляные суспензии, эмульсии, облатки или пеллеты, гранулы и диспергируемые порошки. В различных вариантах осуществления, фармацевтические композиции используются в твердых лекарственных формах, например, в таблетках, капсулах и т.п., подходящих для простого перорального введения точных доз.

[0261] В различных вариантах осуществления, композиция для перорального

применения содержит фармацевтическую композицию в виде микрочастиц и одно или несколько соединений, которые могут защищать носитель, нагрузку или слитую молекулу или неслитые молекулы носителя и нагрузки, пока они находятся в желудке. Например, защитное соединение должно предотвращать кислотный и/или ферментативный гидролиз молекул. В различных вариантах осуществления, пероральная композиция содержит фармацевтическую композицию в виде микрочастиц и одно или несколько соединений, которые могут способствовать прохождению конструкции/конструкций из желудка в тонкую кишку. В различных вариантах осуществления, одно или несколько соединений, которые могут защитить носитель, нагрузку или слитую молекулу от деградации в желудке, также могут способствовать прохождению конструкции из желудка в тонкий кишечник. Например, включение бикарбоната натрия может быть эффективным для облегчения быстрого перемещения веществ, доставляемых внутрижелудочно, из желудка в двенадцатиперстную кишку, как описано в Mrsny et al., Vaccine 17:1425-1433, 1999. Другие способы получения композиций, для того, чтобы носители, нагрузки или слитые молекулы могли проходить через желудок и контактировать с поляризованными эпителиальными мембранами в тонкой кишке, включают, но ими не ограничиваясь, технологии энтеросолюбильного покрытия, как описано в DeYoung, Int J Pancreatol, 5 Suppl:31-6, 1989, а также способы, представленные в патенте США № 6613332, 6174529, 6086918, 5922680 и 5807832, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

[0262] В некоторых случаях, защитное соединение представляет собой катион, который стабилизирует устойчивые к кислоте микрочастицы или наночастицы. В некоторых случаях, частица, содержащая носитель, катион и гетерологичную нагрузку, может быть устойчива к ферментам поджелудочной железы без необходимости в энтеросолюбильном покрытии или другом стабилизирующем соединении. Например, на **фиг.11** показаны результаты анализа переваривания посредством панкреатина, выполненного на композициях, содержащих белок-носитель (SEQ ID NO: 3) вместе с катионом (либо цинк, либо протамин) и гетерологичной нагрузкой (эксенатид). На треках 1-4 **фиг.11A** показано разложение панкреатином композиции белка SEQ ID NO: 3 через 0, 30, 60 и 120 минут, через 120 минут белок полностью разлагается. Однако на треках 5-8 показана композиция белка SEQ ID NO. 3, и соли цинка, полученная путем смешивания компонентов в соотношении 1:1 (масса/масса носитель:соль цинка). На треке 8 **фиг.11A** показано, что эта композиция только частично распадается через 120 минут инкубации с панкреатином. Аналогичные результаты наблюдаются для композиций SEQ ID NO: 3, цинка и эксенатида смешанные в соотношении 1:1:1 или в соотношении 1:2:1. На **фиг.11B** показаны аналогичные результаты с использованием протамина в качестве катиона, но не цинка. На **фиг.11C** показан результат обработки панкреатином композиции, содержащей эксенатид и цинк без SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях, описанная в настоящем документе композиция может быть устойчива к расщеплению панкреатином. В некоторых случаях, описанная в настоящем документе композиция может быть устойчива к

расщеплению панкреатином, так что, по меньшей мере, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% гетерологичной нагрузки и/или белка носителя остаются интактными после инкубации композиции с панкреатином в течение 30 минут при температуре 37°C. В некоторых случаях, композиция, описанная в настоящем документе, может быть устойчива к расщеплению панкреатином, так что, по меньшей мере, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% гетерологичной нагрузки и/или белка-носителя остаются интактными после инкубации композиции с панкреатином в течение 60 минут при 37°C. В некоторых случаях, композиция, описанная в настоящем документе, может быть устойчива к расщеплению панкреатином, так что, по меньшей мере, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% гетерологичной нагрузки и/или белканосителя остаются интактными после инкубации композиции с панкреатином в течение 120 минут при 37°C. В некоторых случаях по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% терапевтического белка остается интактным через 0,5 часа, 1 час или 2 часа в анализе панкреатина; при этом анализ панкреатина включает инкубацию композиции, содержащей 100 мкг терапевтического белка, с 10 мкг панкреатина в 100 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) при 37°C.

[0263] Фармацевтические композиции, предназначенные для перорального применения, могут быть получены в соответствии с любым известным в данной области способом получения фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать один или несколько агентов, выбранных из группы, состоящей из подсластителей, для получения фармацевтически превосходного и приятного на вкус препарата. Например, для получения перорально доставляемых таблеток, фармацевтическую композицию в виде микрочастиц смешивают, по меньшей мере, с одним фармацевтическим вспомогательным веществом, а твердую композицию прессуют известными способами с образованием таблетки для доставки в желудочно-кишечный тракт. Таблеточную композицию обычно составляют с добавками, т.е. сахаридным или целлюлозным носителем, связующим, таким как крахмальная паста или метилцеллюлоза, наполнитель, разрыхлитель или другие добавки, обычно используемые при производстве медицинских препаратов. Для получения капсул для перорального введения, ДГЭА смешивают, по меньшей мере, с одним фармацевтическим вспомогательным веществом и твердую композицию помещают в капсульный контейнер, подходящий для доставки в желудочно-кишечный тракт. Композиции, включающие носители, нагрузки или слитые молекулы, могут быть получены способом, описанным в общих чертах в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. 1990 (Mack Publishing Co. Easton Pa. 18042) в главе 89, которая включена в настоящем документе в качестве ссылки.

[0264] В различных вариантах осуществления, фармацевтические композиции получают в виде таблеток для перорального введения, содержащих фармацевтические композиции микрочастиц в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, которые подходят для изготовления таблеток. Эти вспомогательные вещества могут представлять собой инертные разбавители, такие как

карбонат кальция, карбонат натрия, лактоза, фосфат кальция или фосфат натрия; гранулирующие и разрыхляющие агенты, например кукурузный крахмал, желатин или гуммиарабик, и смазывающие агенты, например стеарат магния, стеариновая кислота или тальк. Таблетки могут быть не иметь покрытие, или они могут быть покрыты известными методами для замедления разложения и всасывания в желудочно-кишечном тракте и, таким образом, обеспечения устойчивое действие в течение более длительного периода времени. Например, может быть использовано обеспечивающее временную задержку вещество, такое как моностеарат глицерина или дистеарат глицерина, отдельно или с воском.

[0265] В различных вариантах осуществления, фармацевтические композиции получают в виде твердых желатиновых капсул, в которых носитель, нагрузка и слитая молекула смешаны с инертным твердым разбавителем, например, карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых носитель, нагрузка или слитая молекула смешаны с водной или масляной средой, например, маслом земляного ореха, арахисовым маслом, жидким парафином или оливковым маслом.

[0266] В различных вариантах осуществления, водные суспензии могут содержать фармацевтическую композицию микрочастиц в смеси со вспомогательными веществами, пригодными для изготовления водных суспензий. Такими вспомогательными веществами являются суспендирующие агенты, например, карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь; диспергирующими или смачивающими агентами могут быть природный фосфатид, например, лецитин, или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например, полиоксиэтиленстеарат, или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например, гептадецилэтилоксицетанол, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гексита, такие как моноолеат полиоксиэтилensorбита, или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гекситола, например полиоксиэтилensorбитанмоноолеат. Водные суспензии также могут содержать один или несколько консервантов, например, этил- или н-пропил-п-гидроксibenзоат, один или несколько красителей, один или несколько ароматизаторов и один или несколько подсластителей, таких как сахароза или сахарин.

[0267] В различных вариантах осуществления, масляные суспензии могут быть получены путем суспендирования фармацевтической композиции микрочастиц в растительном масле, например, арахисовом масле, оливковом масле, кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральном масле, таком как жидкий парафин. Масляные суспензии могут содержать загуститель, например пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Для получения приятного на вкус препарата для перорального применения, могут добавляться подсластители, такие как описанные выше, и

ароматизаторы. Эти композиции могут сохраняться путем добавления антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота.

[0268] В различных вариантах осуществления, фармацевтические композиции могут быть в форме эмульсий типа “масло в воде”. Масляная фаза может представлять собой растительное масло, например, оливковое масло или арахисовое масло, или минеральное масло, например, аравийскую камедь или трагакантовую камедь, природные фосфатиды, например соевый лецитин, и сложные эфиры или неполные сложные эфиры, полученные из жирных кислот и ангидридов гекситола, например сорбитанмоноолеат, и продукты конденсации аналогичных неполных эфиров с этиленоксидом, например полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат. Эмульсии также могут содержать подсластители и ароматизаторы.

[0269] Можно использовать инкапсулированные таблетки или таблетки с покрытием, которые высвобождают одну или несколько нагрузок послойным методом, тем самым высвобождая одну или несколько нагрузок в течение заранее определенного периода времени при перемещении по желудочно-кишечному тракту. Кроме того, таблетки, содержащие одну или несколько нагрузок, могут быть помещены в более крупную таблетку, тем самым защищая внутреннюю таблетку от условий окружающей среды и условий переработки, таких как температура, химические агенты (например, растворители), pH и влажность. Внешняя таблетка и покрытия дополнительно служат для защиты одной или нескольких нагрузок во внутрижелудочной среде. В некоторых случаях, инкапсулированные частицы могут размещаться в более крупной таблетке или капсуле, которые инкапсулированы таким образом, что более крупная таблетка или капсула растворяются в первой окружающей среде, а инкапсулированные частицы растворяются во второй окружающей среде. В некоторых случаях, инкапсулированная частица высвобождает нагрузку в первой среде, но не во второй среде. Например, инкапсулированная частица может высвобождать нагрузку при высоком значении pH, но не при низком pH. В некоторых случаях, инкапсулированная частица имеет кишечнорастворимую оболочку.

[0270] Поверхностно-активные вещества или сурфактанты способствуют абсорбции полипептидов через слизистую оболочку или выстилку. Используемые поверхностно-активные вещества или сурфактанты включают жирные кислоты и их соли, соли желчных кислот, фосфолипиды или алкилсахариды. Примеры жирных кислот и их солей включают натриевые, калиевые и лизиновые соли каприлата (C8), капрата (C10), лаурата (C12) и мирилата (C14). Примеры солей желчных кислот включают холевую кислоту, хенодезоксихолевую кислоту, гликохолевую кислоту, таурохолевую кислоту, гликохенодезоксихолевую кислоту, таурохенодезоксихолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, литохолевую кислоту и урсодезоксихолевую кислоту. Примеры фосфолипидов включают одноцепочечные фосфолипиды, такие как лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилглицерин, лизофосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилинозитол и

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

[0271] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам перорального введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Пероральное введение фармацевтической композиции в виде микрочастиц может обеспечить абсорбцию носителя, нагрузки или слитой молекулы через поляризованные эпителиальные клетки слизистой оболочки пищеварительного тракта, например, слизистой оболочки кишечника, с последующим (в некоторых случаях) расщеплением слитной молекулы и высвобождением одной или нескольких нагрузок на базолатеральной стороне слизистой оболочки. Затем одна или несколько нагрузок могут быть доставлены непосредственно в печень через воротную вену печени. Таким образом, когда одна или несколько нагрузок демонстрируют биологическую активность в печени, такую как, например, активность, опосредованная одной или несколькими нагрузками, связывающимися с родственным рецептором, предполагается, что одна или несколько нагрузок оказывают эффект, превышающий тот, который можно было бы ожидать, исходя из концентраций в плазме, наблюдаемых у субъекта, т.е. пероральное введение носителя, нагрузки или слитой молекулы может обеспечить более высокую эффективную концентрацию доставленной одной или нескольких нагрузок в печень субъекта по сравнению с наблюдаемой в плазме крови субъекта.

[0272] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам перорального введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Такие способы могут включать, но ими не ограничиваясь, стадии перорального введения композиций пациентом или лицом, осуществляющим уход. Такие стадии введения могут включать введение с интервалами, например один или два раза в сутки, в зависимости от носителя, нагрузки или слитой молекулы, заболевания или состояния пациента или конкретного пациента. К таким методам также относится введение различных доз конкретного носителя, нагрузки или слитой молекулы. Например, начальная доза фармацевтической композиции может быть на более высоком уровне для обеспечения желаемого эффекта, такого как снижение уровня глюкозы в крови. Последующие дозы могут быть уменьшены после достижения желаемого эффекта. Такие изменения или модификации протоколов введения могут быть выполнены лечащим врачом или медицинским работником.

[0273] Эти фармацевтические композиции можно вводить субъекту в соответствующей дозе. Режим дозирования будет определяться лечащим врачом на основании конкретных клинических факторов. Как хорошо известно в области медицины, дозы для любого пациента зависят от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, пол и общее состояние здоровья, а также от

конкретного вводимого соединения, времени и способа введения и других лекарственных средств, принимаемых одновременно. Терапевтически эффективное количество для данной ситуации будет легко определено с помощью рутинных экспериментов и находится в пределах навыков и суждений рядового клинициста или врача. Специалисту в данной области техники известно, что эффективное количество фармацевтической композиции, вводимой в конкретный раствор, будет, среди прочего, зависеть от природы биологически активной нагрузки. Продолжительность лечения, необходимая для наблюдения за изменениями, и интервал после лечения для появления терапевтических эффектов, изменяется в зависимости от желаемого эффекта. Конкретные количества могут быть определены обычными тестами, которые хорошо известны специалистам в данной области.

[0274] Количество одной или нескольких нагрузок представляет собой количество, эффективное для достижения цели конкретного активного агента. Количество в композиции обычно представляет собой фармакологически, биологически, терапевтически или химически эффективное количество. Однако количество может быть меньше, чем фармакологически, биологически, терапевтически или химически эффективное количество, когда композицию используют в единичной дозированной форме, такой как капсула, таблетка или жидкость, поскольку единичная дозированная форма может содержать множество композиций носителя/биологически или химически активного агента или может содержать разделенное фармакологически, биологически, терапевтически или химически эффективное количество. Затем общие эффективные количества можно вводить в кумулятивных единицах, содержащих в целом фармакологически, биологически, терапевтически или химически активные количества биологически активной нагрузки.

[0275] В некоторых случаях, интестинальное введение композиции по настоящему изобретению, содержащей 10 мкг эксенатида, может обеспечить максимальную концентрацию в плазме больше, чем примерно 15 нг/мл или больше, чем примерно 30 нг/мл. В некоторых случаях, интестинальное введение композиции по настоящему изобретению, содержащей 10 мкг эксенатида, может обеспечить максимальную концентрацию в плазме, составляющую примерно 17,3 нг/мл или примерно 35,7 нг/мл. В некоторых случаях, интестинальное введение композиции по настоящему изобретению, содержащей 10 мкг эксенатида, может обеспечить время достижения максимальной концентрации в плазме, составляющее примерно 60 минут или примерно 45 минут.

[0276] Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в рамках настоящего описания, должны иметь значения, обычно понятные рядовому специалисту в данной области техники. Кроме того, если иное не предусмотрено контекстом, термины в форме единственного числа должны включать формы множественного числа, и термины в форме множественного числа должны включать формы в единственном числе. В общем случае, номенклатуры, используемые в связи с культурами клеток и тканей, молекулярной биологией, иммунологией,

микробиологией, генетикой, химией белков и нуклеиновых кислот и гибридизацией, описанные в настоящем документе, и способы их применения являются широко используемыми и хорошо известными в данной области техники.

[0277] Используемый в настоящем документе термин “примерно” может означать плюс или минус 1%, 2%, 3%, 4%, 5% или 10% от числа, к которому относится этот термин.

[0278] Как описано в настоящем документе, термин “процент (%) идентичности последовательности” и связанные с ним термины, в контексте аминокислотных последовательностей, представляют собой процентную долю аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в выбранной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как Clustal Omega, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или программного обеспечения Megaalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для определения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

[0279] В этом примере описано получение стабильных самособирающихся микрочастиц, содержащих неприродную слитую молекулу, для использования в качестве лекарственного вещества в пилюлях или таблетках для пероральной доставки биологически активной нагрузки. В частности, неприродную слитую молекулу, содержащую молекулу-носитель Cholix, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, связанную с молекулой гормона роста человека (“hGH”), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, получали с использованием коацерватной системы протамин-цинк, как описано ниже.

[0280] Типичный вектор экспрессии слитой молекулы, содержащий молекулу SEQ ID NO: 2 и молекулу hGH, конструировали следующим образом: сначала полипептидные гены амплифицируют посредством ПЦР, включая пары рестрикционных ферментов NdeI и EcoRI, PstI и PstI, AgeI и EcoRI, или сайты PstI и EcoRI на двух концах продуктов ПЦР. После расщепления рестрикционными ферментами продукты ПЦР клонируют в подходящую плазмиду для клеточной экспрессии, которая расщепляется соответствующими парами рестрикционных ферментов. Полученные конструкции кодируют SEQ ID NO: 2 и hGH, а также мечены мотивом 6-His на N-конце полипептида

для облегчения очистки. Конечные плазмиды контролировали расщеплением рестрикционными ферментами и секвенированием ДНК.

[0281] Слитые молекулы экспрессировали следующим образом: компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen, Madison, Wis.) трансформировали стандартным методом теплового шока в присутствии соответствующей плазмиды с получением клеток экспрессии слитых молекул, отобранных в среде, содержащей ампициллин, и выделяли и выращивали в бульоне Лурия-Бертани (Difco; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) с антибиотиком, затем индуцировали экспрессию белка путем добавления 1 мМ изопропил-D-тиогалактопиранозид (IPTG) при оптической плотности (OD) 0,6. Через два часа после индуцирования, IPTG клетки собирали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин. После лизиса клеток выделяли тельца включения, и белки солюбилизировали в буфере, содержащем 100 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 2 мМ ЭДТА, 6 М гуанидин HCl и 65 мМ дитиотреитола. Солюбилизованную слитую молекулу рефолдировали в присутствии 0,1 М Трис, pH=7,4, 500 мМ L-аргинина, 0,9 мМ GSSG, 2 мМ ЭДТА. Подвергнутые рефолдингу белки очищали посредством ионообменной хроматографии на Q-сефарозе и гель-фильтрационной хроматографии Superdex 200 (Amersham Biosciences, Inc., Sweden). Чистоту белков оценивали посредством ДСН-ПААГ-электрофореза и аналитической ВЭЖХ (Agilent, Inc. Palo Alto, CA). Полученную слитую молекулу получали в концентрации 1 мг/мл и хранили в ФСБ при -80°C.

[0282] Получение микрочастиц на основе протамина осуществляли следующим образом: (а) слитую молекулу, содержащую SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:5, добавляли к 0,1 н HCl до конечной концентрации 1 мг/мл слитой молекулы в микроцентрифужной пробирки объемом 1,5 мл, а затем к раствору слитой молекулы добавляли 0,02 мл ZnCl₂ (10 мг/мл в H₂O); (b) 2,0 мл сульфата протамина (0,6 мг/мл) добавляли к 2,0 мл 0,1 М NaPO₄; и (с) смесь со стадии (а) объединяли со смесью со стадии (b) и объединенную смесь оставляют на ночь при комнатной температуре. Сразу после смешивания (а) и (b) образовался осадок, как показал переход от прозрачного к мутному.

[0283] На следующее утро частицы визуализировали с использованием системы GE Cytel в режиме яркого поля высокой мощности (10×). Частицы имели размер приблизительно 50 мкМ и спонтанно образовывались при комнатной температуре после смешивания реагентов (см. **фиг.1А**). Эти частицы могут быть разбиты на более мелкие единицы размером примерно 5 мкМ при увеличении ионной силы раствора путем добавления по каплям 5М NaCl (см. **ФИГ.1В**). Агрегаты могут быть повторно ассоциированы путем снижения ионной силы добавлением по каплям подготовленной воды Milli-Q (см. **фиг.1С**).

[0284] Эти данные демонстрируют, что протамин-цинковая коацерватная система может быть использована для получения стабильных самособирающихся микрочастиц, содержащих слитую молекулу, полученную на основе носителя, и что система будет собираться в различные виды частиц в зависимости от ионной силы буфера и что процессы ассоциации и диссоциации обратимы для этих конкретных молекулярных

сборок. Полученные с помощью этой “настраиваемой” системы самособирающиеся микрочастицы могут быть использованы в качестве лекарственного вещества для получения пилюли или таблетки для пероральной доставки биологически активной нагрузки.

Пример 2

[0285] Используя метод примера 1, стабильные инсулинсодержащие микрочастицы и микрочастицы, содержащие меченный ФИТЦ инсулин, получали и оценивали способом, описанным ниже.

[0286] В одном препарате, инсулин и ФИТЦ-инсулин добавляли в соотношении 2:1 к 1,0 мл 0,1 н HCl до конечной концентрации 5 мг/мл в микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл, а затем к раствору инсулина добавляли 0,02 мл ZnCl₂ (10 мг/мл в H₂O). Во втором препарате, ФИТЦ-инсулин добавляли в соотношении 2:1 к 1,0 мл 0,1 н HCl до конечной концентрации 5 мг/мл в микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл, а затем к раствору инсулина добавляли 0,02 мл ZnCl₂ (10 мг/мл в H₂O). На определенной стадии, к 2,0 мл 0,1 М NaPO₄ добавляли 2,0 мл сульфата протамина (1 мг/мл). Потом раствор протамина добавляли к раствору, содержащему инсулин, и к раствору, содержащему ФИТЦ-инсулин, и каждую объединенную смесь оставляли отстаиваться в течение ночи при комнатной температуре. Осадок образовывался сразу после перемешивания, что подтверждалось переходом от прозрачного состояния к мутному.

[0287] На следующее утро, частицы, содержащие инсулин и/или ФИТЦ-инсулин, визуализировали посредством системы GE Cytel в режиме яркого поля высокой мощности (10×). Частицы имели размер примерно 50-150 мкм и образовывались спонтанно при комнатной температуре после смешивания реагентов. На **фиг.2А** и **2В** показано изображения яркого и синего фильтров соответственно. Синяя стрелка указывает на частицу размером примерно 150 мкм. На **фиг.2С** показаны объединенные синие и светлопольные изображения микрочастиц. Наблюдаемая синяя флуоресценция указывает на включение ФИТЦ-инсулина в частицы. Свойства флуоресцентного излучения этих микрочастиц согласуются с композицией на белковой основе.

Пример 3

[0288] В этом примере стабильные микрочастицы, содержащие неприродную слитую молекулу, содержащую молекулу-носитель Cholix, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, связанную с молекулой красного флуоресцентного белка ("RFP"), получали и оценивали с использованием протамин-цинковой коацерватной системы, как описано ниже.

[0289] Слитую молекулу, содержащую SEQ ID NO: 6, связанную с красным флуоресцентным белком ("RFP"), получали следующим образом: плазмидную конструкцию, кодирующую SEQ ID NO: 6, получали способом, описанным в настоящем документе. Экспрессию белка осуществляли с использованием клеток E. coli DH5α (Invitrogen, Carlsbad, CA) после трансформации тепловым шоком (1 мин при 42°C) соответствующей плазмидой; трансформированные клетки, отобранные на содержащих

антибиотик средах, выделяли и выращивали в бульоне Лурия-Бертани (Difco); экспрессию белка индуцировали добавлением 1 mM изопропил-D-тиогалактопиранозид (IPTG); через два часа после индукции, IPTG клетки собирали центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин при температуре 4°C; тельца включения выделяли после лизиса клеток, и белки солюбилизировали в 6 M гуанидина HCl и 2 mM ЭДТА (pH 8,0), а также 65 mM дитиотреитола; после рефолдинга и очистки, белки хранили в концентрации ~5 мг/мл в ФСБ (pH 7,4) без Ca^{2+} и Mg^{2+} при температуре -80°C. Было подтверждено, что чистота всех использованных в этих исследованиях белков превышает 90%, что слудует из данных эксклюзионной хроматографии по размеру.

[0290] Белок, в соответствии с SEQ ID NO: 6, затем модифицировали на его С-конце, чтобы сделать возможным прямое химическое связывание через свободный сульфгидрильный остаток, расположенный вблизи С-конца белка. С-концевая модификация включает ограниченную цистеином петлю, содержащую консенсусную последовательность расщепления для высокоселективной протеазы вируса гравировки табака (TEV), второй цистеин и гексагистидиновую (His6) метку. Второй Cys был включен для образования дисульфидного мостика с Cys, который, в конечном итоге, использовали для связывания. Добавление последовательности His6 к белку упрощает очистку, а последовательность расщепления TEV обеспечивает механизм для селективного удаления концевой остатка Cys после мягкого восстановления. Расщепление TEV и мягкое восстановление посредством 0,1 mM дитиотреитола после экспрессии и выделения конструкций SEQ ID NO: 6 обеспечивали прямое химическое связывание одной или нескольких нагрузок посредством малеимидного взаимодействия в качестве общего механизма присоединения нагрузки. После расщепления протеазой TEV, восстановления и связывания RFP посредством малеимидного взаимодействия со свободным сульфгидрилом, удаление свободной С-концевой последовательности достигали на второй стадии хроматографии на колонке с Ni^{2+} . Слитая молекула в дальнейшем будет обозначаться как FM001.

[0291] Получение микрочастиц на основе протамина осуществляли следующим образом: (a) FM001 добавляли к 0,1 н HCl до конечной концентрации 1 мг/мл FM001 в микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл, и затем к раствору FM001 добавляли 0,02 мл ZnCl_2 (10 мг/мл в H_2O); во втором препарате не использовали ZnCl_2 ; (b) к 2,0 мл 0,1 M NaPO_4 добавляли 2,0 мл сульфата протамина (0,6 мг/мл); и (c) каждую из двух смесей, полученную на стадии (a) объединяли со смесью, полученную на стадии (b) и объединенные смеси оставляли отстаиваться в течение ночи при комнатной температуре. Сразу после смешивания смесей (a) и (b) образовался осадок, что подтверждалось переходом от прозрачного состояния к мутному.

[0292] На следующее утро, с помощью системы GE Cytel получали цифровые изображения частиц. Красную флуоресценцию визуализировали путем возбуждения образца при длине волны 481 нм, а также регистрации флуоресцентного излучения при длине волны 535 нм. При 4-кратном увеличении, частицы, содержащие протамин, цинк и

FM001, имеют одинаковый размер, составляющий примерно при 150 мкМ (**фиг.3А**). При возбуждении светом с длиной волны 481 нм частицы излучают красную флуоресценцию (**фиг.3В**). Наблюдаемая красная флуоресценция свидетельствует о включении FM001 в частицы. Флуоресценция была однородной по распределению, что указывало на однородное распределение FM001 и на то, что структура белка не была нарушена в процессе образования частиц. При 10-кратном увеличении, исключение цинка из коацервата обеспечивало образование частиц одинакового размера (~150 мкМ), однако частицы имели более овальную форму (**фиг.4А**). Эти частицы обладали флуоресцентными свойствами, аналогичными свойствам частиц, содержащим цинк (**фиг.4В**), что указывает на то, что цинк не требуется для поддержания структуры белка в процессе коацервации и что композиция коацервата может определять форму частиц.

Пример 4

[0293] В этом примере исследовали ряд различных условий и композиций для получения высушенных распылением частиц с желаемыми свойствами. В этом примере получали несколько различных композиций частиц. Эти частицы обычно состоят из носителя, лекарственного средства, полимерной матрицы, ПЭГ, поверхностно-активных веществ и цинка.

[0294] Пример подробного протокола представлен ниже для композиции 37-49, содержащей hGH/SEQ ID NO: 3/Эудрагит FS30D/Полисорбат 20/ $ZnCl_2$. В пробирку Falcon добавляли 15 мкл полисорбата, затем 7,6 мл раствора SEQ ID NO: 3 (9,5 мг, 0,27 мкмоль). Потом порошкообразный hGH 3,0 мг (0,14 мкмоль) растворяли в 4,0 мл деионизированной воды в отдельной стеклянной сцинтилляционной пробирке объемом 20 мл с получением прозрачного раствора, а затем переносили в указанный выше раствор в пробирке Falcon. К смеси добавляли 15 мкл исходного раствора $ZnCl_2$ (5 мг/мл) (0,075 мг, 0,55 мкмоль), затем 82 мг суспензии Eudragit FS 30D. Суспензию встряхивали на ротационном шейкере в течение 20 минут, затем разбавляли 50 мМ раствором бикарбоната аммония до общего объема, составляющего 25 мл. Перед сушкой распылением на распылительной сушилке Buchi B-90 nano, раствор фильтровали через дисковый фильтр с размером пор 0,4 мкм в лаборатории Pall.

[0295] Распылительную сушку осуществляли в следующих условиях: форсунка среднего размера для распыления/атомизации, температура на входе 110°C, температура на выходе 49°C, расход газа 130 л/мин, производительность насоса 12% и степень распыления 100%. Распылительная сушка завершилась через 2 часа. Продукт собирали в виде белого подвижного порошка. Выход составлял около 56% по массе. Посредством машинной спектрометрии, размер частиц оценивали как равный 300-600 нм. Аналогичным образом получали другие частицы.

[0296] Частицы, полученные в различных условиях составления композиции, первоначально подвергали скринингу посредством гель-электрофореза для подтверждения качества белка после процесса распылительной сушки. Для этого частицы растворяли и выделенный белок анализировали посредством вестерн-блоттинга, чтобы

убедиться, что белок не является поврежденным.

[0297] После этого различные частицы подвергали скринингу на предмет эффективности инкапсуляции и высвобождения при физиологическом значении pH. На **фиг.5A** показаны результаты анализа растворения частицы, содержащей инсулин, SEQ ID NO: 3 и Eudragit FS (37-156). Эта композиция продуцировала частицы с низкой скоростью высвобождения лекарственного средства при значении pH 2 и постепенным высвобождением лекарственного средства при значении pH 7. Повышение значения pH с 2 до 7 индуцировало контролируемое высвобождение ранее инкапсулированного лекарственного средства. В некоторых случаях это может представлять желаемые свойства инкапсуляции и высвобождения. На **фиг.5B** показаны результаты растворения частицы, содержащей инсулин, SEQ ID NO: 3 и Eudragit L30 (37-167). Данная композиция продуцировала частицы с быстрым высвобождением лекарственного средства как при значении pH 2, так и при значении pH 7. В некоторых случаях, это может быть нежелательным свойством инкапсулирования и высвобождения. На **фиг.5C** показаны результаты анализа растворения для дополнительной композиции частиц, содержащей hGH и Eudragit FS. Данная композиция обеспечивала низкое высвобождение лекарственного средства при значении pH 2, постепенное высвобождение лекарственного средства при значении pH 7 и контролируемую индукцию высвобождения лекарственного средства при повышении значения pH с 2 до pH 7. Этот профиль высвобождения указывает на то, что композиция потенциально может быть пригодна для перорального введения, например, посредством желудочного зонда.

[0298] Затем исследовали стабильность композиции в моделируемой кишечной жидкости с панкреатином. Различные частицы подвергали воздействию моделируемой кишечной жидкости с панкреатином, и количество оставшегося лекарственного средства оценивали через 1 час и 14 часов. На **фиг.6** показан процент лекарственного средства, оставшегося через 1 час и 14 часов для стандартного раствора инсулина и пяти различных композиций. Подробные данные композиций, представленных на **фиг.6**, перечислены в **таблице 1**. Все пять высушенных распылением частиц, представленных на **фиг.6**, обеспечивают долговременную лекарственную защиту от панкреатина. Две разные композиции, 37-166 (инсулин/PEG8K/SEQ ID NO: 3/Eudragit FS/Tween-20/ZnCl₂) и 37-224 (инсулин/SEQ ID NO: 3/2x Eudragit L30/ZnCl₂), обеспечивали более высокую концентрацию инсулина через 1 час, чем при использовании только лишь инсулина.

Таблица 1: Композиции, оцененные на **фиг.6**.

Название композиции	Композиция распылительной сушки	Содержание лекарственного средства (масса/масса)
Инсулин	Стандартный раствор инсулина	100%
37-166	Инсулин/PEG8K/SEQ ID NO. 3/Eudragit FS/Tw20/ZnCl ₂	1,54%

37-186	Инсулин/SEQ ID NO. 3/Eud FS/Tw20	1,42%
37-188	Инсулин/PEG8K/SEQ ID NO: 3/Eud L30/Tw20	3,17%
37-219	Инсулин/SEQ ID NO: 3/Eud L30/ ZnCl ₂	6,17%
37-224	Инсулин/SEQ ID NO: 3/2X Eud L30/ ZnCl ₂	4,97%

Пример 5

[0299] В этом примере будет оцениваться абсорбция лекарственного средства *in vivo* из различных композиций частиц. Предполагается, что задержка лекарственного средства в кишечнике будет коррелировать с абсорбцией лекарственного средства и будет модулироваться композициями частиц. Флуоресцентно-меченые лекарственные средства будут преобразовываться в лекарственную форму в виде частиц способом, описанным выше. Частицы будут суспендироваться в подходящем растворе для введения посредством желудочного зонда. В некоторых случаях, раствором может быть вода. Суспензия частиц будет вводиться крысам посредством желудочного зонда. Четырем крысам будет вводиться каждое отдельное сочетание флуоресцентно меченного лекарственного средства и композиции. Еще четырем крысам будет вводиться раствор, содержащий аналогичное суммарное количество флуоресцентно меченого лекарственного средства без преобразования в лекарственную форму в виде частиц. Перед введением флуоресцентно меченого лекарственного средства и через 0,5 часа, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 8 часов, 10 часов, 12 часов и 24 часа после его введения будет осуществляться сканирование всего организма на двух крысах из всех четырех. Оставшиеся две крысы, из каждой обрабатываемой группы, будут умерщвляться через 4 часа и 12 часов, и будут отбирали кишечника для подтверждения концентраций лекарственного средства.

Пример 6

[0300] В этом примере, для оценки транскитоza *in vivo*, частицы композиции 37-49 (hGH/SEQ ID NO: 3/Eudragit FS) вводили в модель *in vivo*. Частицы композиции 37-49 вводили крысам посредством интраюминальной инъекции в дозе 34 мкг/кг.

[0301] Самцов крыс линии Wistar содержали по 3-5 на одну клетку с 12/12-часовым циклом свет/темнота, и на момент начала проведения исследования их масса составляла 225-275 г (примерно 6-8 недель). Все эксперименты проводились во время световой фазы с использованием протокола без восстановления, в котором использовалась непрерывная анестезия изофлураном. Срединный разрез брюшной стенки длиной 4-5 см обнажает средние отделы тощей кишки. Исходный раствор $3,86 \times 10^{-5}$ М частиц композиции 37-49 получали в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) с введением 50 мкл (на 250 г крысы) посредством интраюминальной инъекции (ILI) с использованием иглы 29-го калибра. Помечали перманентным маркером мезентерий участка инъекции. После окончания исследования, выделяли участок размером 3-5 мм, охватывающий отмеченный

сегмент кишечника, и обрабатывали его для оценки с использованием микроскопа.

[0302] Через различные промежутки времени после инъекции инъецированных животных умерщвляли, и отбирали кишечника и делали срезы. Срезы инъецированной области кишечника подготавливали и визуализировали посредством иммунофлуоресценции. Через 15 минут наблюдали поглощение частиц в сравнении с 1-5 минутами, наблюдаемыми для конструкций cholix. Как видно на **фиг.7А**, через 15 минут после инъекции, hGH (зеленый) и cholix (красный) изначально в значительной степени совместно локализованы (желтый) и, как видно на **фиг.7В-D**, наблюдали больше свободного hGH в более поздние моменты времени, через 30, 45 и 60 минут после инъекции соответственно.

[0303] Для дальнейшей оценки доставки лекарственного средства в виде наночастиц hGH SEQ ID NO: 3, трем крысам (животные А, В и С) вводили путем интраеюнальной инъекции в дозе 1,93 нмоль/кг, что обеспечивало дозу примерно 43 мкг/кг hGH, и общее количество, составляющее 11 мкг hGH на крысу. Образцы сыворотки собирали через 0, 30, 45, 60, 75, 90, 105 и 120 минут после инъекции. Через 120 минут животных умерщвляли и отбирали кишечник и печень. На **фиг.8** показана концентрация hGH у животного А. Наблюдали быстрое повышение концентрации hGH в сыворотке, достигающее пикового значения примерно через 40 минут после введения при 4 нг/мл и остающееся выше 3,5 нг/мл, по меньшей мере, в течение 75 минут после введения. Уровни hGH в сыворотке животных В и С не были определяемыми. Обнаруживали hGH в сыворотке и кишечнике животного А, и при этом в кишечнике животного В, но не в сыворотке. Не обнаруживали hGH ни в сыворотке, ни в кишечнике животного С, и не обнаруживали в печени ни одного из животных через 120 минут.

Пример 7

[0304] В этом примере, для оценки транспорта через клетки, частицы, содержащие hGH, наносили на клетки Сасо-2. Клетки Сасо-2 представляют собой клеточную линию эпителиального рака толстой кишки человека, которую можно использовать в качестве модели кишечной абсорбции лекарственных средств и других соединений у человека. При культивировании в виде монослоя, клетки Сасо-2 дифференцируются и образуют плотные контакты между клетками при культивировании в виде монослоя. Этот монослой можно использовать в качестве модели парацеллюлярного перемещения соединений. Клетки Сасо-2 экспрессируют белки-транспортеры, эффлюксные белки и ферменты конъюгации фазы II для моделирования различных трансцеллюлярных путей. В некоторых случаях, монослой клеток Сасо-2 можно использовать в качестве имитации кишечного эпителия человека.

[0305] Клетки Сасо-2 высевали в транслунки в количестве $1,5 \times 10^5$ клеток/мл. Культуральную среду заменяли каждые 2 суток как в апикальной (0,5 мл), так и в базолатеральной (1,5 мл) камерах. Эксперименты проводили после выращивания клеток в течение 21 суток и формирования функционально плотных монослоев, определенного по трансэпителиального электрического сопротивления (TEER). На 21 сутки, трансвеллы

однократно промывали ФСБ. В апикальные камеры добавляли 100 мкл суспензии, содержащей частицы hGH. В базальную камеру добавляли 0,5 мл ФСБ. Через 2 часа при температуре 37°C, раствор из базолатеральных камер собирали и концентрировали. Транспорт hGH через ткани оценивали посредством вестерн-блоттинга. Белки разделяли посредством одномерного гель-электрофореза в 4-12% геле NuPAGE (BioRad, каталожный номер 5678095). Разделенные белки переносили на мембрану из ПВДФ (PVDF) (BioRad, каталожный номер 1704157), инкубировали с козым поликлональным антителом против hGH (1:1000, R&D AF1067), а затем со вторичным кроличьим антикозым антителом, конъюгированным с щелочной фосфатазой (AP) (1:10000, Абкам ab6742). Полосы белков визуализировали с использованием субстрата AP для вестерн-блоттинга (Promega S3841).

Таблица 2: Композиции частиц, изображенные на **фиг.9**.

Номер композиции	Композиция распылительной сушки	Содержание лекарственного средства (масса/масса)
37-49	hGH/Eudragit FS/SEQ ID NO: 3/Tween 20/ZnCl ₂	0,34%
37-155	*hGH/Eudragit FS/SEQ ID NO: 3/Tween 20/ZnCl ₂	0,38%
37-168	37-49 Партия 2	0,30%
37-233	hGH/Eudragit FS/SEQ ID NO: 3/Tween 20/ZnCl ₂	1,77%

Пример 8

[0306] В этом примере, несколько различных микрочастиц получали путем смешивания SEQ ID NO: 3, катиона и эксенатида, как указано в **таблице 3** и **таблице 4**. Для определения фактических количеств каждого компонента в микрочастицах, полученные таким образом частицы анализировали посредством ВЭЖХ.

Таблица 3: Компоненты для получения частиц и анализ частиц

Код композиции	SEQ ID NO: 3 (мг)	Эксенатид (мг)	Катион (мг)	Содержание в % SEQ ID NO: 3	Содержание в % эксенатида	SEQ ID NO: 3 (мольное соотношение)	Эксенатид (мольное соотношение)	Катион (мольное соотношение)
----------------	-------------------	----------------	-------------	-----------------------------	---------------------------	------------------------------------	---------------------------------	------------------------------

1	019-08-E1	5	5	Цинк 1	65,1	4,5	1	7,16	32,68
2	019-08-E2	5	5	Цинк 2	68,9	5,4	1	7,16	65,36
3	019-08-E3	5	5	Цинк 5	59,0	11,3	1	7,16	163,39
4	019-08-E4	5	5	Цинк 10	72,2	0,0	1	7,16	326,79
5	019-08-E5	5	5	Цинк 20	57,5	3,4	1	7,16	653,57
6	019-08-E6	2,5	2,5	Протамин 0,2	19,7	2,1	1	7,16	0,04
7	019-08-E7	2,5	2,5	Протамин 0,4	7,3	2,8	1	7,16	0,09
8	019-08-E8	2,5	2,5	Протамин 0,8	23,5	5,2	1	7,16	0,18
9	019-08-E9	2,5	2,5	Протамин 2	17,1	3,1	1	7,16	0,45
10	019-08-E10	2,5	2,5	Протамин 4	4,9	1,0	1	7,16	0,89

Таблица 4: Компоненты для получения и анализа частиц

	Код композиции	Количество SEQ ID NO: 3 (мг)	Количество эксенатида (мг)	Количество Zn/Pro (мг)	% SEQ ID NO: 3	% Exc	SEQ ID NO: 3 (мольное соотношение)	Эксенатид (мольное соотношение)	Zn/Протамин (мольное соотношение)
11	019-	0,058	5	Цинк	0,42	13,58	1	617,06	28171,33

	08- E11			10					
12	019- 08- E12	0,116	5	Цинк 10	0,61	12,75	1	308,53	14085,67
13	019- 08- E13	0,29	5	Цинк 10	1,42	14,25	1	123,41	5634,27
14	019- 08- E14	0,58	5	Цинк 10	19,08	27,83	1	61,71	2817,13
15	019- 08- E15	1,16	5	Цинк 10	11,67	12,25	1	30,85	1408,57
16	019- 08- E16	0,058	5	Протам ин 10	20,75	14,11	1	617,05	1,12
17	019- 08- E17	0,116	5	Протам ин 10	0,43	12,00	1	14,32	1,12
18	019- 08- E18	0,29	5	Протам ин 10	3,25	19,75	1	14,32	1,12
19	019- 08- E19	0,58	5	Протам ин 10	0,90	11,17	1	14,32	1,12
20	019- 08- E20	1,16	5	Протам ин 10	17,83	9,17	1	14,32	1,12

[0307] Высвобождение эксенатида *in vitro* из полученных выше частиц оценивали путем инкубации частиц в растворах с различными значениями pH в течение до 18 часов. Количество высвобожденного эксенатида определяли количественно посредством жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ ВЭЖХ, **фиг.10А** и **10В**) или эксклюзионной хроматографии (SEC, **фиг.10С** и **10D**). Композиции образовывали pH-стабильную смесь, что видно на **фиг.10А-D**.

Пример 9

[0308] Для определения стабильности панкреатина различных SEQ ID NO: 3 и эксенатидные комплексы инкубировали с ферментами панкреатина в течение 0, 30, 60 или 120 минут, как описано ранее. На **фиг.11А-С** показаны количества SEQ ID NO: 3 (~30162 да), эксенатида (~7000 да) и протамина (~4186 да), оставшиеся для разных композиций в разные моменты времени. В **таблице 5**, **таблице 6** и **таблице 7** ниже показаны композиции и моменты времени каждого трека на **фиг.11А-С**.

Таблица 5: Описание треков на фиг.11А

Трек	Композиция: соотношение носитель:цинк:эксен атид	Момент времени (минуты)	Трек	Композиция: соотношение носитель:цинк:эксе натид	Момент времени (мин)
1	1:0:0	0	9	1:1:1	0
2		30	10		30
3		60	11		60
4		120	12		120
5	1:1:0	0	13	1:2:1	0
6		30	14		30
7		60	15		60
8		120	16		120

Таблица 6: Описание треков на фиг.11В

Трек	Композиция: соотношение носитель:протамин:э ксенатид	Момент времени (минуты)	Трек	Композиция: соотношение носитель:протамин :эксенатид	Момент времени (минуты)
1	0:0:1	0	9	1:0,16:1	0
2		30	10		30
3		60	11		60
4		120	12		120
5	0:1:1	0	13	1:0,8:1	0
6		30	14		30
7		60	15		60
8		120	16		120

Таблица 7: Описание треков на фиг.11С

Трек	Композиция: соотношение	Момент времени
------	-------------------------	----------------

	носитель:цинк:эксенатид	(минуты)
1	0:1:1	0
2		30
3		60
4		120

[0309] На **фиг.12А-С** показаны конфокальные изображения микрочастиц, полученных из cholix, ФИТЦ-меченного эксенатида и цинка. На каждом изображении показана линейка масштабом 20 мкм. Распределение по размерам примерно 100 частиц показано на **фиг.13**. Средний размер микрочастиц составлял $\sim 5 \text{ мкм} \pm 2 \text{ мкм}$.

[0310] Для определения способности частиц к трансцитозу через клетки SMI-100 человека, частицы получали способом, указанным в таблице 8. Полученные частицы растворяли в 10 мл ФСБ и наносили 100 мкл раствора на апикальную сторону клеток и в базальную камеру добавляли 500 мкл ФСБ. Через 1 час при температуре 37°C, белки в базальном растворе концентрировали и анализировали посредством вестерн-блоттинга. Эксенатид в базальном растворе количественно определяли посредством ВЭЖХ. Как видно на **фиг.14** и представлено в таблице 8, трансцитоз наблюдался в 6 исследуемых композициях. Е0 соответствует контролю без белков, причем ЕР9 не растворялся в ФСБ. Более высокие уровни переноса эксенатидов наблюдали у частиц, содержащих цинк, а не протамин (Е11, Е13 и Е14).

Таблица 8: Композиции, используемые в анализе трансцитоза

Композиция	SEQ ID NO: 3 (мг)	Эксенатид (мг)	Катион (мг)	% SEQ ID NO: 3	Эксенатид в %	Базолатеральная концентрация эксенатида (нг/мл)
Е0	0	35	Цинк 2	0	35	0
Е9	2,5	2,5	Протамин 2	17,1	3,1	0
Е6	2,5	2,5	Протамин 0,2	19,7	2,1	0
Е16	0,058	5	Протамин 10	20,8	14,1	3
Е18	0,29	5	Протамин 10	3,25	19,8	3
Е11	0,058	5	Цинк 10	0,42	13,6	4

E13	0,29	5	Цинк 10	1,42	14,3	7
E14	0,58	5	Цинк 10	19,1	27,8	8

Пример 10: Исследование in vivo

[0311] Композиции отбирали для исследования in vivo. Эти композиции получали в большем масштабе, и образцы анализировали на содержание и чистоту описанным выше способом. Данные о композиции и результаты аналитических исследований представлены в таблице 9. В типичном препарате, раствор, содержащий носитель Cholix SEQ ID NO:3 (или, если Cholix не был заменен водой), смешивали с раствором эксенатида в течение одной минуты в смесительном устройстве. К перемешиваемому раствору по каплям добавляли раствор цинка или протамина. После перемешивания в течение 15 мин, весь раствор/суспензию лиофилизировали. Аналогичным способом получали три дополнительные композиции с использованием эксенатида, меченного флуоресцеином; данные композиций приведены в **таблице 10**. Флуоресцеин на боковой цепи лизина добавляли к N-концу эксенатида посредством твердофазного пептидного синтеза.

Таблица 9: Композиции эксенатида, Cholix (SEQ ID NO: 3) и катиона

	Код композиции	Количество о SEQ ID NO: 3 (мг)	Количество о эксенатида (мг)	Количество Zn/Pro (мг)	% SEQ ID NO: 3	Эксенатид в %	Чистота в %
0	019-08-E10	0	10	Цинк 20	0	13,45	>95
13	019-08-E13	0,58	10	Цинк 20	3,10	37,68	>95
14	019-08-E14	1,16	10	Цинк 20	4,57	24,7	>95
18	019-08-E18	0,58	10	Протамин 20	2,75	35,65	>95
10	019-08-E10	0	10	Цинк 20			

Таблица 10: Композиции, полученные с эксенатид-флуоресцеином.

Композиция	Компоненты	% SEQ ID NO: 3	% Эксенатид
019-10-E0 ФИТЦ	Ехе-флуоресцеин+Zn (1:2)	0	13,45
019-10-E14 ФИТЦ	SEQ ID NO: 3+Ехе-флуоресцеин+Zn	4,57	24,7

	(0,116:1:2)		
019-10-E18 ФИТЦ	SEQ ID NO: 3+Ехе- флюоресцеин+Pro (0,058:1:2)	2,75	35,65

Чистота каждого порошка, использованного при получении композиций, соответствовала следующему: процентное содержание эксенатида ~ 89,0% и процентное содержание SEQ ID NO: 3 ~ 71,8%, определенная путем вычисления выраженной в процентах относительной площади пика, наблюдаемой на хроматограмме, получаемой в результате эксклюзионной хроматографии (SEC).

[0312] Анализ панкреатина проводили для определения стабильности различных композиций; результаты можно увидеть на **фиг.17А** и **17В**. Образцы анализировали с использованием 4-20% готовых гелей Citerion TGX STAIN-FREE (Bio-Rad, 5678094), неокрашенного стандарта Precision Plus (Bio-Rad, 161-0375) и анализировали посредством сканера гелей ThermoFisher Gel Scanner. Композиции E14, E18, E14-ФИТЦ и E18-ФИТЦ показали очень незначительное расщепление SEQ ID NO: 3 даже после 2 ч воздействия ферментами панкреатина. На **фиг.18** показана хроматограмма, полученная методом хроматографии с обращенной фазой (ОФ ВЭЖХ), показывающая присутствие SEQ ID NO: 3 при времени удерживания 6,8 мин и эксенатида при времени удерживания 7,5 мин. Эти композиции также оценивали на растворимость в воде при различных значениях pH. Как видно на **фиг.19**, композиции ФИТЦ были в меньшей степени растворимы, чем композиции без ФИТЦ. Композиция E14 показала низкую растворимость при значении pH 1 и высокую растворимость при значении pH 7 и выше. Композиция E0 также показала низкую растворимость при значении pH 1 и высокую растворимость при значении pH 5 и выше.

Для оценки фармакокинетики и фармакодинамики *in vivo* частицы суспендировали в ФСБ и по 100 мкл каждой взвеси вводили в просвет кишечника крысы. Для каждой композиции использовали четырех крыс, и композиции суспендировали для получения дозы 10 мкг эксенатида для E14 и E18, и 0 мкг эксенатида для E0. Образцы крови по 100 мкл брали через 15, 30, 45, 60 и 90 минут после инъекции. Крови давали свернуться, а затем центрифугировали для получения сыворотки, концентрацию эксенатида определяли посредством иммуноферментного анализа (ИФА). Как видно на **фиг.20**, эксенатид обнаруживали в сыворотке животных, которым вводили как E14, так и E18. Композиция E18 обеспечивала более высокую максимальную концентрацию в сыворотке и большую площадь под кривой. Максимальная концентрация C_{max} для композиции E14 составляла 17,3 нг/мл, а для композиции E18 составляла 35,7 нг/мл. Время достижения максимальной концентрации в плазме крови T_{max} составляла 60 минут для E14 и 45 минут для E18. Никаких изменений по сравнению с исходным уровнем в уровнях глюкозы в крови не наблюдали ни у одного животного. Для сравнения, крысам внутривенно вводили эквивалентное количество эксенатида и оценивали концентрацию в сыворотке, см.

фиг.21. Фармакокинетика введенного в кишечник E14, E18 и эксенатида, введенного внутривенно, сравнивается в **таблице 11**.

Таблица 11. Фармакокинетика.

Композиция	C _{max} (нг/мл)	AUC (нг/мл × мин)	Относительная доступность (%)
IV	465,0	27250	100
E14	20,2	996,3	3,66
E18	40,6	1386	5,09

Пример 11: Получение композиций, содержащих эксенатид

[0314] Эксенатид (SEQ ID NO: 11) представляет собой пептид, обладающий GLP-1-подобной биологической активностью, который стабилизирован С-концевым амином и N-концевым Н. В этом примере, две неприродные выделенные конструкции, содержащие: 1) носитель, имеющий SEQ ID NO: 78, преобразованный в носитель, имеющий SEQ ID NO: 70 и сшитый с SEQ ID NO: 11, и 2) носитель, имеющий SEQ ID NO: 77, преобразованный в носитель, имеющий SEQ ID NO: 80 и сшитый с SEQ ID NO: 11, получали и исследовали на перенос через кишечный эпителий *in vivo*. Носители, имеющие SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 70, получали способом, описанным в настоящем документе, а эксенатид (SEQ ID NO: 11) (кат. № HOR-246) приобретали у компании ProSpec-Tany Technogene Ltd. PO Box 6591, East Brunswick, NJ 08816. Набор для сшивания белков PierceTM Controlled Protein-Protein Crosslinking Kit (кат. № 23456), содержащий сшивающий агент сульфосмЦК(SMCC), приобретали у компании ThermoFisher.

Активация нагрузки и носителя, и поперечное сшивание:

[0315] Эксенатид (10 мг) растворяли в 5 мл H₂O с образованием раствора с концентрацией 2 мг/мл. СульфосмЦК (2 мг) растворяли в 2 мл ФСБ. Непосредственно после этого, к 1,0 мл раствора эксенатида добавляли 0,088 мл (~ 5-кратный молярный избыток) раствора сульфосмЦК и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Непрореагировавший сульфосмЦК удаляли, нанося 1,0 мл реакционной смеси малеимид-эксенатид на обессоливающую колонку, уравновешенную ФСБ, элюируя ФСБ и собирая фракции по 0,5 мл. Для локализации белкового пика, измеряли оптическую плотность каждой фракции при длине волны 280 нм. Объединяли пиковые фракции, содержащие большую часть белка. Концентрацию объединенного активированного эксенатида определяли путем сравнения его оптической плотности при длине волны 280 нм с оптической плотностью исходного раствора белка.

[0316] Носители, имеющие SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78, имеют С-концевое удлинение, содержащее сайт расщепления TEV, фланкированный двумя цистеиновыми остатками, образующими дисульфидную связь, и С-концевую His₆ метку. Носители, имеющие SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78, очищали на колонке HisTrap стандартными способами. Активировали 2 мг белка (200 мкл 10 мг/мл) в ФСБ при значении pH 7,4 обработкой 2 мкл 0,1 М дитиотреитола и 5 мкл протеазы TEV в течение двух часов при

температуре 30°C. Расщепленный и восстановленный белок наносили на колонку HisTrap объемом 1 мл, уравновешенную ФСБ. С-концевой фрагмент, связанный с колонкой, и активированный N-концевой продукт SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 70 со свободным цистеином рядом с С-концом собирали в проточном режиме.

[0317] Активированный малеимидом эксенатид и носители (белок, содержащий сульфгидрил-SEQ ID NO: 80, или белок, содержащий сульфгидрил-SEQ ID NO: 7 белок) смешивали в равных молярных количествах и затем инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре. Чистоту сшитого СМЦК комплекса SEQ ID NO: 70 - эксенатид оценивали в окрашенном кумасси геле в присутствии додецилсульфата натрия. Комплекс имел приблизительно правильную молекулярную массу и чистоту >90% (фиг.22). Затем сшитую конструкцию для доставки хранили при температуре 4°C.

Пример 12: Трансцитоз конструкций для доставки эксенатида in vivo:

[0318] Конструкции для доставки из примера 11 исследовали на перенос через эпителий следующим образом: крыс линии Спраг-Дуули (Sprague Dawley®) дикого типа (~200-250 граммов, возраст ~6 недель, приобретенные у компании Charles River) не кормили в течение ночи для очистки их кишечника. Подготавливали следующие материалы: микроцентрифужные пробирки, содержащие 4% формальдегида, пробирки для консервации тканей, микроцентрифужные пробирки для сбора крови, микроцентрифужные пробирки для сбора сыворотки, ФСБ и исследуемый образец. Животных готовили к эксперименту путем анестезии изофлораном и бритья брюшка. Для каждого животного подготавливали четыре инъекции (2 в тощую кишку и 2 в толстую кишку). Брюшную полость вскрывали. Участки инъекций локализовывали и отмечали отличительными цветами. Исследуемые образцы медленно вводили в просвет в течение 10 минут для толстой кишки и 40 минут для тощей кишки. Животные получали 35 мкг белка на инъекцию в концентрации 1 мкг/мкл. Эвтаназию животных осуществляли через 50 минут. Терминальный образец крови собирали посредством пункции сердца. Тощую кишку и толстую кишку удаляли и помещали на рабочую поверхность с пластиковым покрытием. Содержимое тощей кишки и толстой кишки смывали ФСБ и выбрасывали. Из участка инъекции вырезали отрезок кишки длиной 1 см. Иссеченную ткань разрезали пополам. Один срез помещали в 4% формальдегид. Затем оставшуюся ткань разрезали вдоль и немедленно помещали в микроцентрифужную пробирку и замораживали. Этот процесс повторяли в отношении всех участков инъекций. Печень (~1 см³) удаляли и разделяли на 2 части. Для хранения один срез печени помещали в формальдегид, а второй сразу же замораживали. Образцы кишечника, печени и сыворотки крови собирали через 40 минут после инъекции. Образцы крови центрифугировали и полученную сыворотку переносили в контейнер для хранения. Образцы переносили на сухой лед и хранили при -80°C. Способ дозирования был следующим:

SEQ ID NO: 70-Эксенатид 100 мкл, 490 пмоль/29,4 мкг (4,9 мкМ)

SEQ ID NO: 80-Эксенатид 100 мкл, 490 пмоль/30,9 мкг (4,9 мкМ)

SEQ ID NO: 11 100 мкл, 490 пмоль/2 мкг (4,9 мкМ)

[0319] Биоаналитический анализ кишечного эпителиального транспорта SEQ ID NO: 70-Эксенатид, SEQ ID NO: 80-Эксенатид и SEQ ID NO: 11 (Эксенатид) проводили с использованием набора Эксендин-4 для иммуноферментного анализа (Phoenix Pharma, Cat# EK-070-94) следующим образом: образцы тканей получали из Brains On-line; В каждую пробирку, содержащую образец ткани, добавляли 300 мкл буфера для анализа (1×); ткань удаляли из буфера для анализа и помещали на стерильный чистый планшет с крышкой для клеточных культур; кишечные образцы осторожно удаляли клеточным скребком, стараясь не задеть брыжейку; образцы печени обрабатывали аналогичным образом с дополнительной мацерацией и гомогенизацией; полученный клеточный гомогенат переносили обратно в исходную пробирку; оставшиеся образцы ткани и рабочую область промывали 100 мкл буфера (2×); раствор клеточного гомогената центрифугировали с максимальным усилием в течение 5 минут; супернатант наносили на планшет для ИФА, который обрабатывали в соответствии с инструкциями производителя; оставшийся супернатант хранили при температуре -20°C для последующего применения.

[0320] Как показано на фиг.23, перенос как SEQ ID NO: 70-эксенатида, так и SEQ ID NO: 80-эксенатида через эпителиальные клетки кишечника наблюдался через 10 и 40 минут. Кроме того, как SEQ ID NO: 70-эксенатид, так и SEQ ID NO: 80-эксенатид переносились с более высокой скоростью, чем только SEQ ID NO: 11 (эксенатид), в частности через 40 минут.

Пример 13: Глюкозорегулирующая активность конструкции доставки с эксенатидной нагрузкой

[0321] Модель теста с глюкозной нагрузкой, используемая для тестирования SEQ ID NO: 70 - эксенатида, была разработана для изучения возможности GLP-1-подобной активности повышать скорость восстановления после скачка уровня глюкозы. Внутривентрикулярную инъекцию глюкозы использовали для инициирования скачка уровня глюкозы, и эксенатид, вводимый путем внутривентрикулярной инъекции, использовался в качестве положительного контроля для определения времени и степени эффекта по сравнению с эффектом, наблюдаемым при контроле внутривентрикулярной инъекции плацебо.

[0322] Самцы мышей линии CD1, использованные в тесте с глюкозной нагрузкой, имели возраст 9-16 недель. Для того, чтобы свести к минимуму вызванный процедурой стресс, животных акклиматизировали к окружающей среде, взятию проб крови и процедурам дозирования в течение 1 недели до начала экспериментов, поскольку уровень глюкозы в плазме может адаптироваться к стрессу, вызванному процедурой. Перед проведением исследования, мыши не получали корм в течение 18 часов. Перед проведением исследования, животных взвешивали. У всех животных определяли исходный уровень сахара в крови перед введением дозы 2 мг/кг раствора D-глюкозы (в 50 мкл стерильного ФСБ) путем внутривентрикулярной (IP) инъекции. Затем животным вводили внутривентрикулярную инъекцию 10 мг SEQ ID NO: 14 (положительный контроль), желудочный зонд для экспериментальной обработки, содержащий 10 мг SEQ ID NO: 14 в

200 мкл 0,2 М NaHCO_3 (pH 8,5), или желудочный зонд 200 мкл 0,2 М NaHCO_3 (отрицательный контроль). Образцы крови брали в моменты времени $t=0, 15, 30, 45, 60$ мин; 2, 3 и 4 часа. Измерения уровня глюкозы в крови проводили с использованием взятого из хвоста образца крови объемом 5 мкл с помощью коммерческого глюкометра, который перед началом исследования был откалиброван по глюкозным стандартам.

[0323] Профиль временной зависимости уровня глюкозы в крови у животных, получавших три разных препарата, представлен на фиг.24. Коррекция уровня глюкозы в крови наступала уже через 15 мин после внутривентриального введения 10 мкг коммерческого эксенатида (1-40)-Gly, и профиль коррекции, завершался на 120 мин. Желудочный зонд с SEQ ID NO: 70-эксенатид (10 мг) приводил к аналогичной зависимости концентрации глюкозы в крови от времени. Для сравнения, у мышей с отрицательным контролем уровень сахара в крови был в 2 раза выше, и для полного восстановления до исходного уровня требовалось около 4 часов. Эти результаты свидетельствуют о том, что последовательность носителя SEQ ID NO: 70 была способна облегчать транзитоз эпителиальных клеток биологически активного эксенатида, количество которого было достаточно для получения фармакодинамического эффекта в данной модели исследования с глюкозной нагрузкой.

Пример 14: Активация рецептора GLP-1 конструкцией доставки с эксенатидной нагрузкой

[0324] SEQ ID NO: 71 представляет собой конструкцию для доставки слитого белка, содержащую N-концевой домен экстендина-4 (SEQ ID NO: 14), спейсер (SEQ ID NO: 79) и C-концевой носитель (SEQ ID NO: 73). SEQ ID NO: 83 представляет собой конструкцию для доставки слитого белка, содержащую N-концевой носитель (SEQ ID NO: 67), спейсер (SEQ ID NO: 79) и C-концевой домен экстендина-4 (SEQ ID NO: 14). Анализ взаимодействий β -аррестина и рецепторов, сопряженных с G-белком PathHunter® (GPCR) (DiscoverRx) использовали для анализа способности SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 11 (Эксенатид) и M+SEQ ID NO: 65 связывать рецептор GLP-1. В анализе PathHunter, связывание лиганда активирует рецептор GLP-1 и обеспечивает рекрутирование β -аррестина к рецептору. Статус активации рецептора определяется посредством анализа усиления сигнала, основанного на ферментной комплементации фрагментов. Фермент β -галактозидаза (β -gal) расщепляется на два фрагмента: донор фермента (ED) и акцептор фермента (EA). Самостоятельно эти фрагменты не обладают активностью. Однако они дополняют друг друга с образованием активного фермента β -gal, при объединении путем сборки белкового комплекса. Рецептор GLP-1 метили фрагментом ED и коэкспрессировали в клетках, стабильно экспрессирующих β -аррестин, меченный EA. Рекрутирование EA-меченного β -аррестина активированным ED-меченым рецептором GLP-1, объединяет домены EA и ED с восстановлением активности фермента β -gal, которую можно обнаружить по высвобождению люминесцентного продукта. На фиг.25 показано, что SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 71 связываются с рецептором. SEQ ID NO: 83 демонстрировала пониженную активность по сравнению с SEQ ID NO: 71.

[0325] Хотя в настоящем документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены только в качестве примера. Специалистам в данной области техники будут очевидны многочисленные варианты, изменения и замены без отхода от сущности изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении изобретения. Предполагается, что следующая формула изобретения определяет объем изобретения и что способы и структуры, а также их эквиваленты, включены в объем настоящей формулы изобретения.

Таблица 12. Последовательности

SEQ ID NO		Последовательность
1		VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSD VVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENG KTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVD ELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCT LGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARS RKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSH LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP MVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG AQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES RSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATH QALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPV PRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASL ERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFT GPESAGGEDET VIGWDMIAHVAIPSTIPGNA YEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
2		VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSD VVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENG

		KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD ELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCT LGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARS RKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP MVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG AQA
3		MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPS DVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESII TIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDELQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQK PVEQRIHFSKGGSGGGGGSGGGGSPRRRRSS SRPVRRRRRRPRVSRRRRRRRGRRRRRHHHHHH
4		GGGGSGGGGSGGGG
5		MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEF EEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNRE ETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFA NSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLE DGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNY GLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
6		VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSD VVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD ELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCT LGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV

		EQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARS RKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP MVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG AQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES
7		X1-E-X3-X4-L-X6-I-F-D-E-C-R-S-P-C-X16-L-T- P-E-X21-G-K-X24-I-Q-S-K-L-X30-I-P-X33-D-V- V-L-D-E-G-V-L-Y-Y-S-M-T-I-N-D-E-Q-N-D-I- X56-D-E-X59-K-G-E-S-I-I-T-X67-G-E-F-A-T- X73-R-A-T-R-H-Y-V-X81-Q-D-A-P-F-G-V-I- X90-L-D-I-T-T-E-N-G-T-K-X101-Y-S-X104-N-R- K-X108-X109-E-F-X112-I-X114-W-L-V-X118- X119-G-E-D-S-P-A-S-I-K-I-S-X131-D-E-X134-D- Q-X137-R-N-I-I-E-V-P-K-L-Y-S-I-D-L-D-N-Q-T- L-E-Q-W-X160-X161-Q-G-N-V-X166-F-X168-V- T-R-P-E-X174-X175-I-A-I-S-W-P-S-V-S-Y-X186- A-A-X189-K-X191-G-X193-R-H-K-R-W-A-X200- W-X202-T-X204-X205-X206-X207-X208-X209- L-X211-X212-X213-X214-X215-X216-X217- X218-X219-X220-X221-X222-X223-X224-C-T- X227-G-X229-X230-W-X232-G-G-X235-Y-X237- T-V-A-G-X242-P-X244-X245-I-X247-V-K-Q-G- X252-E-Q-K-X256-V-E-Q-R-I-H-F-S-X265-X266- N-A-X269-X270-X271-L-A-A-H-R-V-C-G-V-P-L- E-T-L-A-R-X288-R-K-P-R-X293-L-X295-D-D-L- X299-C-X301-Y-X303-A-Q-X306-I-V-S-L-F- X312-A-T-R-X316-L-F-X319-H-X321-D-S-X324- F-T-L-N-L-X330-X331-Q-X333-P-X335-V-X337- E-R-L-X341-X342-X343-R-X345-I-N-E-X349-N- P-G-X353-V-X355-Q-V-L-T-X360-A-R-Q-I-Y-N- D-Y-V-T-X371-H-P-X374-L-X376-P-E-Q-T-S-A- X383-A-Q-A-A-D-I-L-S-L-X393-X394-P-D-X397- D-X399-X400-C-V-A-X404-X405-X406-D-Q-A- N-I-N-X413-E-S-R-S-G-R-S-Y-L-X423-E-N-R-A- V-I-T-X431-Q-G-V-T-N-W-T-Y-Q-E-L-X443-

		X444-X445-H-Q-X448-L-T-X451-E-X453-Y-V-F-V-G-Y-H-G-T-N-H-X465-A-A-Q-X469-I-V-N-R-I-X475-P-V-P-R-G-X481-X482-T-E-X485-E-X487-X488-W-G-G-X492-Y-V-X495-T-X497-A-X499-X500-X501-X502-X503-Y-X505-R-X507-X508-X509-G-T-X512-X513-X514-X515-X516-X517-T-X519-X520-X521-X522-X523-X524-R-G-V-M-L-X530-V-Y-X533-X534-X535-A-S-L-E-R-F-Y-R-X544-N-X546-X547-L-E-X550-X551-X552-X553-X554-X555-X556-X557-V-I-G-H-X562-L-P-L-R-N-E-A-F-T-G-X573-X574-X575-X576-X577-G-X579-X580-E-T-X583-I-G-W-D-X588-A-I-X591-X592-V-A-I-P-S-T-I-P-G-N-X603-Y-X605-X606-L-X608-X609-X610-E-E-A-X614-A-X616-E-Q-S-I-S-X622-K-P-P-Y-K-E-X629-X630-D-E-L-K; где X1 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 А и Т; X114 выбран из группы, состоящей из N и H; X118 выбран из группы, состоящей из Р и I; X119 выбран из группы, состоящей из I и Р; 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 Т и N; X166 выбран из группы, состоящей из S и F; X168 выбран из группы, состоящей из S и A; X174 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 Т; X205 выбран из группы, состоящей из L и S; X206 выбран из группы, состоящей из А и Р; X207 выбран из группы, состоящей из L, E и K; X208 выбран из группы, состоящей из С и V; X209 выбран из группы, состоящей из W, V и Т; X211 выбран из группы, состоящей из V и не содержащей аминокислоту; X212 выбран из группы, состоящей из Р и не содержащей аминокислоту; X213 выбран из группы, состоящей из М, I, L и не содержащей аминокислоту; X214 выбран из группы, состоящей из D и не содержащей аминокислоту; X215 выбран из группы, состоящей из А и не содержащей аминокислоту; X216 выбран из группы, состоящей из I и не содержащей
--	--	---

		аминокислоту; 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 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 H и D; X499 выбран из группы, состоящей из E и S; X500 выбран из группы, состоящей из V и L; X501 выбран из группы, состоящей из A и N; X502 выбран из группы, состоящей из H и Y; X503 выбран из группы, состоящей из G и R; X505 выбран из группы, состоящей из A 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 E 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 A и E; X521 выбран из группы, состоящей из E 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 A, 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 A 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 H 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 E и D; X575 выбран из группы, состоящей из S, A и R; X576 выбран из группы, состоящей из A, 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 H и Y; X592 выбран из группы, состоящей из A и G; X603 выбран из группы, состоящей из A и S; X605 выбран из группы, состоящей из E 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;
--	--	--

		и X629 выбран из группы, состоящей из R, Q и H; и X630 выбран из группы, состоящей из K и не содержащей аминокислоту.
8		VLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFATV RATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQ RNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSV TRPEHNIAISWPSVSYKA
9		GVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITIGEFAT VRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYS YNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQ QRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFS VTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGL
10		VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSD VVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG TKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD ELDQQRNIIIEVPKLYSIDL
11	Эксенатид (Byetta)	H- HisGlyGluGlyThrPheThrSerAspLeuSerLysGlnMet GluGluGluAlaValArgLeuPheGluTrpLeuLysAsn GlyGlyProSerSerGlyAlaProProProSer-NH ₂
12		LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSD VVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG TKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCT LGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARS RKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP MVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG

		AQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES RSGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQELEATH QALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPV PRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI KEGTGEYGLPTRAEARDARGVMLRVYIPRASL ERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFT GPESAGGEDETFIGWDMIAHAVAIPSTIPGNA YEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
13		LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSD VVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENG KTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVD ELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCT LGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARS RKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP MVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG AQA
14	Эксендин-4	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGP SSGAPPPS
15	Ликсисенатид (Adlyxin)	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGP SSGAPPSKKKKKK
16	Лираглутид	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIAWLVRGR G (гамма-Е-пальмитоил на E21)
17	Дулаглутид	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEEFIAWLKGGG GGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGSSFLYSRLTVDKSRWQEG

		NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
18	Тедуглутид	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKIT D
19	Тедуглутид	H- HisGlyAspGlySerPheSerAspGluMetAsnThrIleLeu AspAsnLeuAlaAlaArgAspPheIleAsnTrpLeuIleGln ThrLysIleThrAsp-OH
20	hGH	FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFE EAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREE TQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFAN SLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLED GSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYG LLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
21	IL-22	APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASL ADNNTDVRLLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVL NFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNR LSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGE IKAIGELDLLFMSLRNACI
22	IL-10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSR VKTFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGCC ALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSL GENLKTLLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVK NAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMK IRN
23	Препроглюкагон	MKSIYFVAGLFVMLVQGSWQSLQDTEEKSR SFSASQADPLSDPDQMNEKDRHSQGTFTSDY SKYLDSSRAQDFVQWLMNTRNRNNIAKRH DEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIWLV KGRGRRDFPEEVAIVEELGRRHADGSFSDEM NTILD NLAARDFINWLIQTKITDRK
24	Пропропротеин глюкагона	RSLQDTEEKSRFSASQADPLSDPDQMNEK RHSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT KRNRNNIAKRHDEFERHAEGTFTSDVSSYLEG QAAKEFIWLVKGRGRRDFPEEVAIVEELGR

		RHADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKI TDRK
25	Пептид глюкагона	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT
26	Глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR
27	Глюкагоноподобный пептид 2 (GLP-2)	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKIT D
28	Эксендин-3	HSDGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPS SGAPPPS
29	Эфпегленатид	4-имидазоацетил- GEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWL-(K-PEG- Fc)-NGGPSSGAPPPS-NH ₂
30	Семаглутид (Оземпик)	HXEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG (acylated)
31	Агонист GLP- 1R(аминокислоты 1-37 GIP)	YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKG KKNDWK
32	Агонист GLP- 1R(аминокислоты 7-36 GIP)	ISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDW
33	Тирзепатид	YXEGTFTSDYSIXLDKIAQKAFVQWLIAGGPS SGAPPPS
34	Оксинтомодулин	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTK RNKNINIA
35	Препротеин гастроингибиторного полипептида	MVATKTFALLLSLFLAVGLGEKKEGHFSAL PSLPVGSHAKVSSPQPRGPRYAEGTFISDYSIA MDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ REARALELASQANRKEEEAVEPQSSPAKNPSD EDLLRDLLIQELLACLLDQTNLCRLRSR
36	Гастроингибиторный полипептид (GIP)	YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKG KKNDWKHNITQ
37	Агонист GIPR (Des- Ala ² -GIP1-30)	YEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQK
38	Агонист GIPR -	YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQK

	укороченный GIP1-30	
39	Глицентин	RSLQDTEEKSRFSASQADPLSDPDQMNE DK RHSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT KRNRNNIA
40	Глицентин-родственный полипептид	RSLQDTEEKSRFSASQADPLSDPDQMNE D
41	Двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов	Ac- CSNLSTCMLGRLSQDLHRLQTYPKTDVGANA P
42	Препроинсулин	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHL CGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDL QVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIV EQCCTSICSLYQLENYCN
43	А-цепь инсулина	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
44	В-цепь инсулина	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
45	А-цепь инсулин аспарта	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
46	В-цепь инсулин аспарта	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT
47	А-цепь инсулин гларгина	GIVEQCCTSICSLYQLENYCG
48	В-цепь инсулин гларгина	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTR R
49	А-цепь инсулин лизпро	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
50	В-цепь инсулин лизпро	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT
51	Субстрат рецептора инсулина 1	MASPPESDGFSDVRKVGYLRLKPKSMHKRFFV LRAASEAGGPAREYYENEKKWRHKSSAPKR SIPLESCFNINKRADSKNHLVALYTRDEHFAI AADSEAEQDSWYQALLQLHNRAKGHHGDA AALGAGGGGGSCSGSSGLGEAGEDLSYGDVP PGPAFKEVWQVILKPKGLGQTKNLIGIYRLCL TSKTISFVKLNSEAAAVVLQLMNIRRCGHSN FFFIEVGRSAVTGPGEFWMQVDDSVVAQNM HETILEAMRAMSDEFPRRSKSQSSSNCSNPISV PLRRHHLNNPPPSQVGLTRRSRTESITATSPAS

		MVGGKPGSFRVRASSDGEGTMSRPASVDGSP VSPSTNRTHAHRHRGSARLHPPLNHSRSIPMP ASRCSPSATSPVSLSSSSTSGHGSTSDCLFPRRS SASVSGSPSDGGFISSDEYGSSPCDFRSSFRSV TPDSLGHTPPARGEEELSNIYICMGGKGPSTLT APNGHYILSRGGNGHRCTPGTGLGTSPALAG DEAASAADLDNRFRKRTHSAGTSPTITHQKTP SQSSVASIEEYTEMMPAYPPGGGSGGRLPGHR HSAFVPTRSYPEEGLEMHPLERRGGHHRPDSS TLHTDDGYMPMSPGVAPVPSGRKKGSGDYMP MSPKSVSAPQQIINPIRRHPQRVDPNGYMMM SPSGGCSPDIGGGPSSSSSSSSNAVPSGTSYGKL WTNGVGGHHSHVLPHPKPPVESSGGKLLPCT GDYMNMSPVGDSNTSSPSDCYYGPEDPQHKP VLSYYSLPRSFKHTQRPGEPEEGARHQHLRLS TSSGRLLYAATADDSSSSTSSDSLGGGYCGAR LEPSLPHPHHQLVLPQHLPRKVDTAQAQTNRL ARPTRLSLGDPKASTLPRAREQQQQQQPLLHP PEPKSPGEYVNIEFGSDQSGYLSGPVAFHSSPS VRCPSQLQPAPREEETGTEEYMKMDLGPGRR AAWQESTGVEMGRLGPAPPGAASICRPTRAV PSSRGDYMTMQMSCPRQSYVDTSPAAPVSYA DMRTGIAAEEVSLPRATMAAASSSSAASASPT GPQGAAELAAHSSLLGGPQGPGGMSAFTRVN LSPNRNQSAKVIRADPQGCRRRHSSETFSSTPS ATRVGNTVPFGAGAAVGGGGGSSSSSEDVKR HSSASFENVWLRPGELGGAPKEPAKLCGAAG GLENGLNYIDLDLVKDFKQCPQECTPEPQPPP PPPPHQPLGSGESSSTRRSSDLSAYASISFQK QPEDRQ
52	Аполипопротеин А-II	MKLLAATVLLLTICSLEGALVRRQAKEPCVES LVSQYFQTVTDYGKDLMEKVKSPELQAEAKS YFEKSKEQLTPLIKKAGTELVNFLSYFVELGT QPATQ
53	Гликогенсинтаза 1	MPLNRTLMSSSLPGLEDWEDEFDLENVLFEE

		VAWEVANKVGGIYTVLQTKAKVTGDEWGD NYFLVGPYTEQGVRTQVELLEAPTPALKRTL DSMNSKGCKVYFGRWLIIEGGPLVVLLDVGAS AWALERWKGELWDTCNIGVPWYDREANDA VLFGFLTTFWLGEFLAQSEEKPHVVAHFHEW LAGVGLCLCRARRLPVATIFTTHATLLGRYLC AGAVDFYNNLENFNVDKEAGERQIYHRYCM ERAAAHCAHVFTTVSQITAIEAQHLLKRKPD I VTPNGLNVKKFSAMHEFQNLHAQSKARIQEF VRGHFYGHLDNFNDKTLYFFIAGRYEFSNKG ADVFLEALARLNYLLRVNGSEQTVVAFFIMP ARTNNFNVETLKGQAVRKQLWDTANTVKEK FGRKLYESLLVGSLPDMNKMLDKEDFTMMK RAIFATQRQSFPPVCTHNMLDDSSDPILTTRRI GLFNSSADRVKVIFHPEFLSSTSPLLPVDYEEF VRGCHLGVFPSY YEPWGYTPAECTVMGIPSIS TNLSGFGCFMEEHIADPSAYGIYILDRRFRSLD DSCSQLTSFLYSFCQQSRRQRRIQRNRTERLS D LLDWKYLGRYYMSARHMALSKAFPEHFTE PNEADAAQGYRYPRPASVPPSPSLSRHSSPHQ SEDEEDPRNGPLEEDGERYDEDEEAAKDRRNI RAPEWPRRASCTSSSTSGSKRNSVDTATSSSL S TPSEPLSPTSSLGEERN
54	Гликогенсинтаза 2	MLRGRSLSVTSLGGLPQWEVEELPVEELLFE VAWEVTKVGGIYTVIQTKAKTTADEWGEN YFLIGPYFEHNMKTQVEQCEPVNDAVRRADV AMNKHGCQVHFGRWLIIEGSPYVVLFDIGYSA WNLDRWKGDLWEACSVGIPYHDREANDMLI FGSLTAWFLKEVTDHADGKYVVAQFHEWQA GIGLILSRARKLPIATIFTTHATLLGRYLCAANI DFYNHLDKFNIDKEAGERQIYHRYCMERASV HCAHVFTTVSEITAIEAEHMLKRKPDVTPNG LNVKKFSAVHEFQNLHAMYKARIQDFVRGHF YGHLDLFDLEKTLFLFIAGRYEFSNKGADIFLES LSRLNLLRMHKSDITVMVFFIMPAKTNNFNV

		ETLKGQAVRKQLWDVAHSVKEKFGKKLYDA LLRGEIPDLNDILDRDDLTIMKRAIFSTQRQSL PPVTTHNMIDDSTDPISTIRRIGLFNNRTDRV KVILHPEFLSSTSPLLPMDYEEFVRGCHLGVPF SYYEPWGYTPAECTVMGIPSVTTNLSGFGCF MQEHVADPTAYGIYIVDRRFRSPDDSCNQLT KFLYGFCCKQSRRQRRIQRNRTERLSDLLDWRY LGRYYQHARHLTLSRAFPDKFHVELTSPPTTE GFKYPRPSSVPPSPSGSQASSPQSSDVEDEVED ERYDEEEEAERDRLNIKSPFSLSHVPHGKKKL HGEYKN
55	Протеиновая тирозинфосфатаза, рецепторный тип 1	MEMEKEFEQIDKSGSWAAIYQDIRHEASDFPC RVAKLPKNKNRNRVYRDVSPFDHSRIKLHQED NDYINASLIKMEEAQRSYILTQGPLPNTCGHF WEMVWEQKSRGVVMLNRMVEKGSCLKCAQY WPQKEEKEMIFEDTNLKLTLISEDIKSYITVR QLELENLTTQETREILHFHYTTWPDFGVPEP ASFLNFLFKVRESGSLSPHGPVVVHCSAGIG RSGTFCLADTCLLLMDKRKDPSSVDIKKVLLE MRKFRMGLIQTADQLRFSYLA VIEGAKFIMG DSSVQDQWKELSHEDLEPPPEHIPPPRPPKRI LEPHNGKCREFFPNHQWVKEETQEDKDCPIK EEKGSPLNAAPYGIESMSQDTEVRSRVVGGSL RGAQAASPAKGEPSSLPEKDEDHALSYWKPF VNMCVATVLTAGAYLCYRFLFNSNT
56	RAC-альфа треониновая протеинкиназа	серин- MSDVAIVKEGWLHKGGEYIKTWRPRYFLLKN DGTFIGYKERPDVDQREAPLNNFSVAQCQL MKTERPRPNTFIIRCLQWTTVIERTFHVETPEE REEWTTAIQTVADGLKKQEEEEMDFRSGSPS DNSGAEEMEVS LAKPKHRVTMNEFEYLKLLG KGTFGKVILVKEKATGRYYAMKILKKEVIVA KDEVAHTLTENRVLQNSRHPFLTALKYSFQT HDLRCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSEDRA RFYGAEIVSALDYHSEKNVVYRDLKLENLM LDKDGHIKITDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTP

		EYLAPEVLEDNDYGRAVDWWGLGVVMYEM MCGRLPFYNQDHEKLFELILMEEIRFPRTLGP EAKSLLSGLLKKDPKQRLGGGSEDAKEIMQH RFFAGIVWQHVVYEKKLSPPFKPQVTSETDTRY FDEEFTAQMITITPPDQDDSMECVDSERRPHF PQFSYSASGTA
57	Гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом	MGETLGDSPIDPESDSFTDTLSANISQEMTMV DTEMPFWPTNFGISSVDLSVMEDHSHSFDIKP FTTVDFSSISTPHYEDIPFTRTDPVVADYKYDL KLQEYQSAIKVEPASPPYYSEKTQLYNKPHEE PSNSLMAIECRVCGDKASGFHYGVHACEGCK GFFRRTIRLKLIDRCDLNCRHKKSRNKCQY CRFQKCLAVGMSHNAIRFGRMPQAEKEKLLA EISSDIDQLNPESADLRALAKHLYDSYIKSFPL TKAKARAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMGE DKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGCQFRSVEA VQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLLKYGVHE IIYTMLASLMNKDGVLISEGQGFMTREFLKSL RKPFQDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFI AVIILSGDRPGLLNVKPIEDIQDNLLQALELQL KLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQL LQVIKKTETDMSLHPLLQEIYKDLY
58	Гексокиназа 3	MDSIGSSGLRQGEETLSCSEGLPGPSDSSELV QECLQQFKVTRAQLQQIQASLLGSMEQALRG QASPAPAVRMLPTYVGSTPHGTEQGDFVVLE LGATGASLRVLWVTLTGIEGHRVEPRSQEFVI PQEVMLGAGQQLFDFAAHCLSEFLDAQPVNK QGLQLGFSFSFPCHQTGLDRSTLISWTKGFRC SGVEGQDVVQLLRDAIRRQGAYNIDVVAVV NDTVGTMMGCEPGVRPCEVGLVVDGTGNAC YMEEARHVAVLDEDRGRVCVSVEWGSFSDD GALGPVLTTFDHTLDHESLNPGAQRFEKMIG GLYLGELVRLVLAHLARCGVLFGGCTSPALL SQGSILLEHVAEMEDPSTGAARVHAILQDLGL SPGASDVELVQHVCAAVCTRAAQLCAAALA

		AVLSCQLQHSREQQTLQVAVATGGRVCERHPR FCSVLQGTVMLLAPECVSLIPSDGGGRGV AMVTAVAARLAAHRRLLLEETLAPFRLNHDQL AAVQAQMRKAMAKGLRGEASSLRMLPTFVR ATPDGSEGRDGLALDLGGTNFRVLLVRVTTG VQITSEIYSIPETVAQGSGQQLFDHIVDCIVDF QKQGLSGQSLPLGFTFSFPCRQLGLDQGILL NWTKGFKASDCEGQDVVSLREAITRRQAVE LNVVAIVNDTVGTMMSCGYEDPRCEIGLIVG TGTNACYMEELRNVAGVPGDSGRMCINMEW GAFGDDGSLAMLSTRFDASVDQASINPGKQR FEKMISGMYLGEIVRHILLHLTSLGVLFRGQQI QRLQTRDIFKTKFLSEIESDSLALRQVRAILED LGLPLTSDDALMVLEVCAVSQRAAQLCGA GVAAVVEKIRENRGLEELAVSVGVDGTLYKL HPRFSSLVAATVRELAPRCVVTFLQSEDGSGK GAALVTAVACRLAQLTRV
59	Фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатаза и белок двойной специфичности	MTAIIKEIVSRNKRRYQEDGFDLDTYIYPNII AMGFPAERLEGVYRNNIDDVVRFLDSKHKNH YKIYNLCAERHYDTAKFNCRVAQYPFEDHNP PQLELIKPFCELDLQWLSEDDNHVAAIHCKA GKGRTGVMICAYLLHRGKFLKAQEALDFYGE VRTRDKKGV TIPSQRRYVYYYSYLLKNHLDY RPVALLFHKMMFETIPMFSGGTCNPQFVVCQ LKVKIYSSNSGPTRREDKFMFYFEFPQPLPVC GDIKVEFFHKQNKMLKKDKMFHFWVNTFFIPG PEETSEKVENGSLCDQEIDSICSIERADNDKEY LVLTLTKNDLDKANKDKANRYFSPNFKVKLY FTKTVEEPSNPEASSSTSVTPDVSDNEPDHYR YSDTTSDPENEPFDEDQHTQITKV
60	Киназа пируватдегидрогеназы 1	MRLARLLRGAALAGPGPLRAAGFSRSFSSD SGSSPASERGVPGQVDFYARFSPSPLSMKQFL DFGSVNACEKTSFMFLRQELPVRLANIMKEIS LLPDNLLRTPSVQLVQSWYIQLQELLDFKDK SAEDAKAIYDFTDTVIRIRNRHNDVIPTMAQG

		VIEYKESFGVDPVTSQNVQYFLDRFYMSRISIR MLLNQHSLLFGGKGKGSPPSHRKHIGSINPNCN VLEVIKDGyenARRLCDLYYINSPELELEELN AKSPGQPIQVVYVPSHLYHMFELFKNAMRA TMEHHANRGVYPPIQVHVTLGNEDLTVKMS DRGGGVPLRKIDRLFNYMYSTAPRPRVETSR AVPLAGFGYGLPISRLYAQYFQGDLKLYSLEG YGTDAVIYIKALSTDSIERLPVYNKAAWKHY NTNHEADDWCVPSREPKDMTTFRSA
61	Белок 1, связывающий кальций и содержащий суперспиральный домен	MEESPLSRAPSRGGVNFLNVARTYIPNTKVEC HYTLPPGTMPASDwigIFKVEAACVRDYHTF VWSSVPESTTDGSPiHTSVQFQASYLPKPGAQ LYQFRYVNRQGGVCGQSPPFQFREPRPMDL VTLEEADGGSDILLVVPKATVLQNQLDESQQ ERNDLMLQLKLQLEGQVTELRSRVQELERALA TARQEHTELMEQYKGISRSHGEITEERDILSRQ QGDHVARILELEDDIQTISEKVLTKVELDRL RDTVKALTREQEKLKGQLKEVQADKEQSEAE LQVAQQENHHLNLDLKEAKSWQEEQSAQAQ RLKDKVAQMKDTLGQAQQRVAELEPLKEQL RGAQELAASSQQKATLLGEELASAAAARDRT IAELHRSRLEVAEVNGRLAELGLHLKEEKCCQ WSKERAGLLQSVEAEKDKILKLSAEILRLEKA VQEERTQNQVFKTELAREKDSSLVQLSESKRE LTELRSALRVLQKEKEQLQEEKQELLEMYMRK LEARLEKVADEKWNEDATTEDEEAAVGLSCP AALTDSEDESPEDMRLPPYGLCERGDPGSSPA GPRESPLVVISQPAPISPHLSGPAEDSSSDSEA EDEKSVLMAAVQSGGEEANLLLPELGSAFYD MASGFTVGTLSETSTGGPATPTWKECPICKER FPAESDKDALEDHMDGHFFFSTQDPFTFE
62	Мах-подобный белок X	MTEPGASPEDPWVKASPVGAHAGEGRAGRA RARRGAGRRGASLLSPKSPTLSVPRGCREDS HPACAKVEYAYS DNSLDPGLFVESTRKGSVV SRANSIGSTSASSVPNTDDEDSYHQEAYKES

		YKDRRRRAHTQAEQKRRDAIKRGYDDLQTV PTCQQQDFSIGSQKLSKAIVLQKTIDYIQFLHK EKKKQEEEVSTLRKDV TALKIMKVNIEQIVK AHQDNPHGEDQVSDQVKFNVFQGIMDSL FQ SFNASISVASFQELSACVFSWIEEHCKPQTLRE IVIGVLHQLKNQLY
63	Фруктозо- бисфосфата альдоза А	MPYQYPALTPEQKKELSDIAHRIVAPGKGILA ADESTGSI AKRLQSIGTENTENRRFYRQLLLT ADDRVNPCIGGVILFHETLYQKADDGRPF PQV IKSKGGVVG I KVDKGVVPLAGTNGETTTQGL DGLSERCAQYKKDGADFAKWRCVLKIGEHT PSALAIMENANVLARYASICQQNGIVPIVEPEI LPDGDHDLKRCQYVTEKVLAAVYKALSDHHI YLEGTLLKPNMVT PGHACTQKFSHEEIAMAT VTALRRTVPPAVTGITFLSGGQSEEEASINLNA INKCPLLKPWALTFSYGRALQASALKAWGGK KENLKAAQEEYVKRALANSLACQGKYTPSG QAGAAASESLFVSNHAY
64	Дипептидилпептидаза 4	MKTPWKVLLGLLGAAALVTIITVPVLLNKG TDDATADSRKTYTLTDYLNKTYRLKLYSLRW ISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLENST FDEFGHSINDYSISPDGQFILLEYNVVKQWRH SYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWS PVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWTG KEDIYNGITDWVYEEEVFSAYSALWWSPNG TFLAYA QFNDTEVPLIEYSFYSDSLQYPKTV RVPYPKAGAVNPTVKFFVNTDSLSSVTNAT SIQITAPASMLIGDHLYLCDVTWATQERISLQW LRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLVARQHI EMSTTGWVGRFRPSEPHFTLDGNSFYKIISNE EGYRHICYFQIDKKDCTFITKGTWEVIGIEALT SDYLYYISNEYKGMPPGGRNLYKIQLSDYTKV TCLSCELNPERCQYYSVSFSKEAKYYQLRCSG PGLPLYTLHSSVNDKGLRVLEDNSALDKMLQ NVQMPSKKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKS

		KKYPLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWATYL ASTENIIVASFDGRGSGYQGDKIMHAINRRLG TFEVEDQIEAARQFSKMGFVDNKRIAIWGWWS YGGYVTSMVLGSGSGVFKCGIAVAPVSRWE YYDSVYTERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMS RAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQSAQISK ALVDVGVDVFQAMWYTDEDHGIASSTAHHQHI YTHMSHFIKQCFSLP
65	носитель Cholix ¹⁻²⁶⁶	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSD VVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG KTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVD ELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCT LGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKG
66	носитель Cholix ¹⁻²⁶⁶	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSD VVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG KTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVD ELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCT LGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKG
67	носитель Cholix ¹⁻²⁶⁶	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSD VVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG KTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVD ELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCT LGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKG

68	Ген экзотоксина А синегнойной палочки	GTCGAAGAAGCTTTAAACATCTTTGATGAA TGCCGTTTCGCCATGTTTCGTTGACCCCGGAAC CGGGTAAGCCGATTCAATCAAAACTGTCTA TCCCTAGTGATGTTGTTCTGGATGAAGGTGT TCTGTATTACTCGATGACGATTAATGATGA GCAGAATGATATTAAGGATGAGGACAAAG GCGAGTCCATTATCACTATTGGTGAATTTGC CACAGTACGCGCGACTAGACATTATGTAA TCAAGATGCGCCTTTTGGTGTCATCCATTTA GATATTACGACAGAAAATGGTACAAAACG TACTCTTATAACCGCAAAGAGGGTGAATTT GCAATCAATTGGTTAGTGCCTATTGGTGAA GATTCTCCTGCAAGCATCAAAATCTCCGTTG ATGAGCTCGATCAGCAACGCAATATCATCG AGGTGCCTAAACTGTATAGTATTGATCTCG ATAACCAAACGTTAGAGCAGTGGAAAACCC AAGGTAATGTTTCTTTTTCGGTAACGCGTCC TGAACATAATATCGCTATCTCTTGCCAAG CGTGAGTTACAAAGCAGCGCAGAAAGAGG GTTACGCCATAAGCGTTGGGCTCATTGGC ATACAGGCTTAGCACTGTGTTGGCTTGTGCC AATGGATGCTATCTATAACTATATCACCCA GCAAAATTGTACTTTAGGGGATAATTGGTT TGGTGGCTCTTATGAGACTGTTGCAGGCAC TCCGAAGGTGATTACGGTTAAGCAAGGGAT TGAACAAAAGCCAGTTGAGCAGCGCATCCA TTTCTCCAAGGGGAATGCGATGAGCGCACT TGCTGCTCATCGCGTCTGTGGTGTGCCATTA GAACTTTGGCGCGCAGTCGCAAACCTCGT GATCTGACGGATGATTTATCATGTGCCTATC AAGCGCAGAATATCGTGAGTTTATTTGTCG CGACGCGTATCCTGTTCTCTCATCTGGATAG CGTATTTACTCTGAATCTTGACGAACAAGA ACCAGAGGTGGCTGAACGTCTAAGTGATCT TCGCCGTATCAATGAAAATAACCCGGGCAT
----	--	---

			GGTTACACAGGTTTTAACCGTTGCTCGTCAG ATCTATAACGATTATGTCACTCACCATCCGG GCTTAACCTCCTGAGCAAACCAGTGCGGGTG CACAAGCTGCCGATATCCTCTCTTTATTTTG CCCAGATGCTGATAAGTCTTGTGTGGCTTCA AACAAACGATCAAGCCAATATCAACATCGAG TCTCGTTCTGGCCGTTTCATATTTGCCTGAAA ACCGTGCGGTAATCACCCCTCAAGGCGTCA CAAATTGGACTTACCAGGAACTCGAAGCAA CACATCAAGCTCTGACTCGTGAGGGTTATG TGTTTCGTGGGTTACCATGGTACGAATCATGT CGCTGCGCAAACCATCGTGAATCGCATTGC CCCTGTTCCGCGCGGCAACAACACTGAAAA CGAGGAAAAGTGGGGCGGGTTATATGTTGC AACTCACGCTGAAGTTGCCCATGGTTATGC TCGCATCAAAGAAGGGACAGGGGAGTATG GCCTTCCGACCCGTGCTGAGCGCGACGCTC GTGGGGTAATGCTGCGCGTGTATATCCCTC GTGCTTCATTAGAACGTTTTTATCGCACGAA TACACCTTTGGAAAATGCTGAGGAGCATAT CACGCAAGTGATTGGTCATTCTTTGCCATTA CGCAATGAAGCATTTACTGGTCCAGAAAGT GCGGGCGGGGAAGACGAAACTGTCATTGGC TGGGATATGGCGATTCATGCAGTTGCGATC CCTTCGACTATCCCAGGGAACGCTTACGAA GAATTGGCGATTGATGAGGAGGCTGTTGCA AAAGAGCAATCGATTAGCACAAAACCACCT TATAAAGAGCGCAAAGATGAACTTAAG
69	Экзотоксин синегнойной палочки	A	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSMSV DPAIADTNGQGV LHYSMVLEGGNDALKLAID NALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQA RGSWSLNLVPIGHEKPSNIKVFIELNAGNQ LSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHE SNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRW SEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCLND

		DTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLH FPEGGSALAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRG WEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQ VIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTL AAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCP VAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDG GDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERGYV FVGYPHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDLDAIW RGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGA LLRVYVPRSSLPGFYRTGLTLAAPEAAGEVER LIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAE RTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAIS ALPDYASQPGKPPREDLK
70	Продукт расщепления TEV варианта Cholix	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPS DVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESII TIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKIS VDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVP DAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK VITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHR VCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSLDVSFTLNLDEQEPEVAERL SDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH HPGLTPEQTSAGAQACENLFQ
71	Эксенатид - Вариант Cholix	MHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNG PSSGAPPPSGGGGGSGGGGGSGGGGSVEEALNI FDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG VLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATV RATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVDELDDQ RNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSV TRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAH WHTGLA

72	N-конец природного варианта Cholix	VEDE
73	Вариант Cholix	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSD VVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENG KTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVD ELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLA
74	Вариант Cholix	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPS DVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESII TIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQK PVEQRIHFSGKNAMSALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILF SHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTS AGAQA
75	Вариант Cholix	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSD VVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENG KTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKISVD ELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCT LGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSGKNAMSALAAHRVCGVPLETLARS RKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPG MVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG AQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES

		RSGRSYLPENRAVITPQGVNTWNTYQELEATH QALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPV PRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASL ERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFT GPESAGGEDET VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNA YEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
76	Вариант Cholix	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGD VVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI GEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENG KTYSFNRKESEFAINWLVPAGEDSPASIKISIDE LDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNV SFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHHR WAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLG DNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMALAAHRVCGVPLETLARSRK PRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSI FTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAD DILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIES
77	TEV варианта Cholix	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPS DVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESII TIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQK PVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILF SHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTS AGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINI ESCENLFQSGTCHHHHHH
78	TEV варианта Cholix	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPS

		DVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESII TIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKIS VDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQK PVEQRIHFSGKNAMSALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILF SHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTS AGAQAACENLFQSGTCHHHHHH
79	(G5S)(G4S)2 спейсер	GGGGGSGGGGSGGGGS
80	Продукт расщепления TEV варианта Cholix	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPS DVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDEKGESII TIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPAGEDSPASIKIS VDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQK PVEQRIHFSGKNAMSALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILF SHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTS AGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINI ESCENLFQ
81	Вариант Cholix	V-E-X3-X4-L-X6-I-F-D-E-C-R-S-P-C-X16-L-T-P- E-X21-G-K-X24-I-Q-S-K-L-X30-I-P-X33-D-V-V- L-D-E-G-V-L-Y-Y-S-M-T-I-N-D-E-Q-N-D-I-X56- D-E-X59-K-G-E-S-I-I-T-X67-G-E-F-A-T-X73-R- A-T-R-H-Y-V-X81-Q-D-A-P-F-G-V-I-X90-L-D-I- T-T-E-N-G-T-K-X101-Y-S-X104-N-R-K-X108- X109-E-F-X112-I-X114-W-L-V-X118-X119-G-E- D-S-P-A-S-I-K-I-S-X131-D-E-X134-D-Q-X137-R-

		N-I-I-E-V-P-K-L-Y-S-I-D-L-D-N-Q-T-L-E-Q-W- X160-X161-Q-G-N-V-X166-F-X168-V-T-R-P-E- X174-X175-I-A-I-S-W-P-S-V-S-Y-X186-A-A- X189-K-X191-G-X193-R-H-K-R-W-A-X200-W- X202-T-X204-X205-X206-X207-X208-X209-L- X211-X212-X213-X214-X215-X216-X217-X218- X219-X220-X221-X222-X223-X224-C-T-X227-G- X229-X230-W-X232-G-G-X235-Y-X237-T-V-A- G-X242-P-X244-X245-I-X247-V-K-Q-G-X252-E- Q-K-X256-V-E-Q-R-I-H-F-S-X265-X266-N-A- X269-X270-X271-L-A-A-H-R-V-C-G-V-P-L-E-T- L-A-R-X288-R-K-P-R-X293-L-X295-D-D-L- X299-C-X301-Y-X303-A-Q-X306-I-V-S-L-F- X312-A-T-R-X316-L-F-X319-H-X321-D-S-X324- F-T-L-N-L-X330-X331-Q-X333-P-X335-V-X337- E-R-L-X341-X342-X343-R-X345-I-N-E-X349-N- P-G-X353-V-X355-Q-V-L-T-X360-A-R-Q-I-Y-N- D-Y-V-T-X371-H-P-X374-L-X376-P-E-Q-T-S-A- X383-A-Q-A-A-D-I-L-S-L-X393-X394-P-D-X397- D-X399-X400-C-V-A-X404-X405-X406-D-Q-A- N-I-N-X413-E-S-R-S-G-R-S-Y-L-X423-E-N-R-A- V-I-T-X431-Q-G-V-T-N-W-T-Y-Q-E-L-X443- X444-X445-H-Q-X448-L-T-X451-E-X453-Y-V-F- V-G-Y-H-G-T-N-H-X465-A-A-Q-X469-I-V-N-R- I-X475-P-V-P-R-G-X481-X482-T-E-X485-E- X487-X488-W-G-G-X492-Y-V-X495-T-X497-A- X499-X500-X501-X502-X503-Y-X505-R-X507- X508-X509-G-T-X512-X513-X514-X515-X516- X517-T-X519-X520-X521-X522-X523-X524-R-G- V-M-L-X530-V-Y-X533-X534-X535-A-S-L-E-R- F-Y-R-X544-N-X546-X547-L-E-X550-X551- X552-X553-X554-X555-X556-X557-V-I-G-H- X562-L-P-L-R-N-E-A-F-T-G-X573-X574-X575- X576-X577-G-X579-X580-E-T-X583-I-G-W-D- X588-A-I-X591-X592-V-A-I-P-S-T-I-P-G-N-
--	--	---

		X603-Y-X605-X606-L-X608-X609-X610-E-E-A-X614-A-X616-E-Q-S-I-S-X622-K-P-P-Y-K-E-X629-X630-D-E-L-K; wherein 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 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 К 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 не содержащей аминокислоту; X212 выбран из группы, состоящей из P и не содержащей аминокислоту; X213 выбран из группы, состоящей из M, I, L, и не содержащей аминокислоту; X214 выбран из группы, состоящей из D и не содержащей аминокислоту; X215 выбран из группы, состоящей из A и не содержащей аминокислоту; X216 выбран из группы, состоящей из I и не содержащей аминокислоту; 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 Е и К; X242 выбран из группы, состоящей из Т и I; X244 выбран из группы, состоящей из К, Е и G; X245 выбран из группы, состоящей из V и А; X247 выбран из группы, состоящей из Т и М; X252 выбран из группы, состоящей из I и М; X256 выбран из группы, состоящей из Р, Т и А; X265 выбран из группы, состоящей из К, Q и N; X266 выбран из группы, состоящей из G и К; X269 выбран из группы, состоящей из М и I; X270 выбран из группы, состоящей из S и Е; X271 выбран из группы, состоящей из А и Т; X288 выбран из группы, состоящей из S и G; X293 выбран из группы, состоящей из D и Y; X295 выбран из группы, состоящей из Т, Р и Q; X299 выбран из группы, состоящей из S и Q; X301 выбран из группы, состоящей из А 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 М; X319 выбран из группы, состоящей из S и Т; 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, Е и Н; X331 выбран из группы, состоящей из Е и G; X333 выбран из группы, состоящей из Е и А; X335 выбран из группы, состоящей из Е и А; X337 выбран из группы, состоящей из А и Т; X341 выбран из группы, состоящей из S, D и Т; X342 выбран из группы, состоящей из D и А; 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 М и V; X355 выбран из
--	--	---

		группы, состоящей из Т и I; X360 выбран из группы, состоящей из V и I; X371 выбран из группы, состоящей из Н и Е; X374 выбран из группы, состоящей из G и L; X376 выбран из группы, состоящей из Т 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 С и Y; X397 выбран из группы, состоящей из А и Т; X399 выбран из группы, состоящей из К, Е и G; X400 выбран из группы, состоящей из S, Р и Н; 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 Р и L; X431 выбран из группы, состоящей из Р и Q; X443 выбран из группы, состоящей из Е и D; X444 выбран из группы, состоящей из А и Т; X445 выбран из группы, состоящей из Т и К; X448 выбран из группы, состоящей из А и Т; 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 Т, S и N; X475 выбран из группы, состоящей из А, S и Т; 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 А и S; X497 выбран из группы, состоящей из Н и D; X499 выбран из группы, состоящей из E и S; X500 выбран из
--	--	--

		группы, состоящей из V и L; X501 выбран из группы, состоящей из A и N; X502 выбран из группы, состоящей из H и Y; X503 выбран из группы, состоящей из G и R; X505 выбран из группы, состоящей из A 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 E 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 A и E; X521 выбран из группы, состоящей из E 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 A, 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 A 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 H 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 E и D; X575 выбран из группы, состоящей из S, A и R; X576 выбран из группы, состоящей из A, 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 H и Y; X592 выбран из группы, состоящей из A и G; X603 выбран из группы, состоящей из A и S; X605 выбран из группы, состоящей из E 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; и X629 выбран из группы, состоящей из R, Q и H; и X630 выбран из группы, состоящей из K и не содержащей аминокислоту.
82	Вариант экзотоксина A синегнойной палочки	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMVS DPAIADTNGQGVLHYSMVLEGGNDALKLAID NALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQA RGWSLNLWLVPIGHEKPSNIKVFHIELNAGNQ LSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHE SNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRW SEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCNLD DTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLH FPE
83		MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPS DVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESII

		TIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ GNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQK PVEQRIHFSKGGGGGSGGGGSGGGGSHGEGT FTSDLISKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPP PS
84		MAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMS VDPAIADTNGQGV LHYSMVLEGGNDALKLAI DNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQ ARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGN QLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAH ESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKR WSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCNL DDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRL HFPEG

[0326] Таблица 13 - Примеры транзитизирующих носителей, идентифицирующих аминокислотные остатки SEQ ID NO: 69

АА остатки	АА остатки	АА остатки
1-252	1-291	1-330
1-253	1-292	1-331
1-254	1-293	1-332
1-255	1-294	1-333
1-256	1-295	1-334
1-257	1-296	1-335
1-258	1-297	1-336
1-259	1-298	1-337
1-260	1-299	1-338
1-261	1-300	1-339
1-262	1-301	1-340
1-263	1-302	1-341
1-264	1-303	1-342

1-265	1-304	1-343
1-266	1-305	1-344
1-267	1-306	1-345
1-268	1-307	1-346
1-269	1-308	1-347
1-270	1-309	1-348
1-271	1-310	1-349
1-272	1-311	1-350
1-273	1-312	1-350
1-274	1-313	1-351
1-275	1-314	1-352
1-276	1-315	1-353
1-277	1-316	1-354
1-278	1-317	1-355
1-279	1-318	1-356
1-280	1-319	1-357
1-281	1-320	1-358
1-282	1-321	1-359
1-283	1-322	1-360
1-284	1-323	1-361
1-285	1-324	1-362
1-286	1-325	1-363
1-287	1-326	1-364
1-288	1-327	1-365
1-289	1-328	1-366
1-290	1-329	1-367

Таблица 14 - Примеры транцитозирующих носителей, идентифицирующих аминокислотные остатки SEQ ID NO: 7

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

Таблица 15 - Примеры аминокислотных остатков носителей Cholix SEQ ID NO: 7

Остатки Cholix AA	Остатки Cholix AA
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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая носитель, способный проникать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку; и гетерологичную нагрузку, причем молярное отношение гетерологичной нагрузки к носителю больше, чем 1:1.
2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что композиция содержит катион переходного металла.
3. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что катион переходного металла выбран из группы, состоящей из Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} .
4. Композиция по п.3, отличающаяся тем, что катионом переходного металла является Zn^{2+} .
5. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что композиция содержит поликатион.
6. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что поликатионом является протамин.
7. Композиция по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что носитель содержит часть полипептида Cholix.
8. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что носитель состоит из части экзотоксина А синегной палочки.
9. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что носитель состоит из части полипептида Cholix.
10. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 206-425 в SEQ ID NO: 7.
11. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 150-205 в SEQ ID NO: 7.
12. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом на любой из аминокислот 150-195 в SEQ ID NO: 7.
13. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 1-41 в SEQ ID NO: 7.
14. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 35-40 в SEQ ID NO: 7.
15. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, начиная с аминокислотного положения 40 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, до любого из аминокислотных положений 150-205 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.
16. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что полипептид Cholix имеет С-конец в

любом из аминокислотных положений 150-187 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

17. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8.

18. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

19. Композиция по любому из пп.10-14, отличающаяся тем, что аминокислотные положения пронумерованы на основе выравнивания полипептида Cholix с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, где аминокислотные положения пронумерованы от N-конца до С-конца и начинаются с положения 1 на N-конце.

20. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка выбрана из группы, состоящей из макромолекулы, малой молекулы, пептида, полипептида, нуклеиновой кислоты, мРНК, миРНК, мшРНК, миРНК, антисмысловой молекулы, антитела, ДНК, плазмиды, вакцины, полимерной наночастицы и каталитически активного материала.

21. Композиция по п.20, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка является терапевтической нагрузкой.

22. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка выбрана из группы, состоящей из красителя и радиофармацевтического средства, гормона, цитокина, ингибитора ФНО, средства, снижающего уровень глюкозы, опухолеассоциированного антигена, пептида и полипептида.

23. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка представляет собой полипептид, являющийся модулятором воспаления в желудочно-кишечном тракте.

24. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка представляет собой аналог глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2).

25. Композиция по п.24, отличающаяся тем, что аналогом GLP-2 является тедуглутид.

26. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичной нагрузкой является цитокин.

27. Композиция по п.26, отличающаяся тем, что цитокин выбран из группы, состоящей из 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 и IL-30.

28. Композиция по п.27, отличающаяся тем, что цитокин представляет собой IL-10.

29. Композиция по п.28, отличающаяся тем, что цитокин представляет собой IL-22.

30. Композиция по п.26, отличающаяся тем, что у цитокина отсутствует нативный сигнал секреции.

31. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что терапевтическая нагрузка представляет собой гормон.

32. Композиция по п.31, отличающаяся тем, что гормон представляет собой гормон роста человека (hGH).

33. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка представляет собой агент, снижающий уровень глюкозы.

34. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка представляет собой инкретин, пропротеин глюкагона, пептид глюкагона, глюкагоноподобный пептид 1, глюкагоноподобный пептид 2, глицентин, родственный глицентину полипептид, препропротеин гастроингибиторного полипептида, гастроингибиторный полипептид, дипептидилпептидаза 4, глюкозный транспортер тип 4, препроглюкагон, субстрат рецептора инсулина 1, инсулин, аналог инсулина, аполиппротеин А-II, семейство носителей растворенных веществ 2, глюкозный транспортер тип 1, гликогенсинтазу 1, гликогенсинтазу 2, протеин-тирозиновая фосфатаза нерецепторного типа 1, RAC-альфа серин-треониновая протеинкиназа, гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, гексокиназу 3, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатазу и белок двойной специфичности, киназа пируватдегидрогеназы 1, белок 1, связывающий кальций и содержащий суперспиральный домен, Мах-подобный белок X, фруктозо-бисфосфаталядолаза А, рецептор глюкагоноподобного пептида 1, рецептор глюкагоноподобного пептида 2, рецептор гастроингибиторного полипептида, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1, рецептор инсулиноподобного фактора роста 2, инсулиновый рецептор, агонист ГПП-1 - эксенатид, агонист ГПП-1 - лираглутид, эксенатид, эксендин-4, эксендин-3, агонист GIPR (Des-Ala2-GIP1-30), агонист GIPR - укороченный GIP1-30, агонист GLP-1R(аминокислоты 1-37 GIP), агонист GLP-1R(аминокислоты 7-36 GIP), ликсисенатид (торговые марки Adlyxin® и Lixumia®, Sanofi), лираглутид (торговое наименование Victoza®, Novo Nordisk A/S), семаглутид (торговое наименование Ozempic®, Novo Nordisk A/S), альбиглутид (торговое наименование Tanzeum®, GlaxoSmithKline; димер GLP-1, слитый с альбумином), дулаглутид (торговое наименование Trulicity®, Eli Lilly), глюкозозависимый инсулинотропный полипептид, мультиспецифический пептидный агонист, тирзепатид (Eli Lilly), SAR425899 (Sanofi), двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов DACRA-089, гларгин/Lantus®, глюлизин/Apidra®, гларин/Toujeo®, Insuman®, детемир/Levemir®, лизпро/Humalog®/Liprolog®, Деглудек/ДеглудекПлюс, инсулин аспарт, инсулин и аналоги (например, LY-2605541, LY2963016, NN1436), инсулин пегилированный лизпро, Humulin®, Линджета, SuliXen®, NN1045, инсулин плюс SymlinTM, PE0139, инсулины быстрого и короткого действия (например, Линджета, PH20, NN1218, HinsBet), (APC-002) гидрогелевые, пероральные, ингаляционные, трансдермальные и сублингвальные инсулины (например, Exubera®, Nasulin®, Afrezza®, Tregopil®, TPM 02, капсулин, Oral-lyn®, Cobalamin®, пероральный инсулин, ORMD-0801, NN1953, NN1954, NN1956, VIAtab и пероральный инсулин Oshadi), или аналог эксендина-4, где аналог эксендина-4 представляет собой desPro36-эксендин-4(1-39)-Lys6NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys4-NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys5-NH₂;

desPro36[Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Trp(O2) 26, Asp28]эксендин-4 (1-39); или desPro36[Trp(O2) 25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, Asp28]эксендин-4 (1-39); или desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39).

35. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичной нагрузкой является инсулин или аналог инсулина.

36. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичной нагрузкой является эксенатид.

37. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка содержит флуоресцентную метку.

38. Композиция по п.37, отличающаяся тем, что флуоресцентная метка представляет собой флуоресцеин.

39. Композиция по п.38, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка представляет собой эксенатид-флуоресцеиновый комплекс.

40. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что композиция устойчива к расщеплению ферментом поджелудочной железы.

41. Композиция по п.40, отличающаяся тем, что по меньшей мере 50% носителя остается интактным через 2 часа в анализе панкреатина, причем анализ панкреатина включает инкубацию композиции, содержащей 100 мкг носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) при температуре 37°C.

42. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что молярное отношение катиона переходного металла к носителю составляет от примерно 100:1 до примерно 300000:1.

43. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что молярное отношение катиона переходного металла к носителю составляет от примерно 1000:1 до примерно 30000:1.

44. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что молярное отношение катиона переходного металла к носителю составляет от примерно 1000:1 до примерно 10000:1.

45. Композиция по п.6, отличающаяся тем, что молярное соотношение протамина к носителю составляет от примерно 10:1 до примерно 0,01:1.

46. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что молярное соотношение гетерологичной нагрузки к носителю составляет от примерно 2:1 до примерно 6000:1.

47. Композиция по п.6, отличающаяся тем, что молярное соотношение протамина к носителю составляет примерно 1:1.

48. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что молярное соотношение гетерологичной нагрузки к носителю составляет примерно от 2:1 до примерно 10:1.

49. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что молярное соотношение гетерологичной нагрузки к носителю составляет примерно 7:1.

50. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что молярное соотношение гетерологичной нагрузки к носителю составляет примерно 7,16:1.

51. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка

представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 14.

52. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

53. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 20.

54. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 21.

55. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 22.

56. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что композиция инкапсулирована.

57. Композиция по п.56, отличающаяся тем, что инкапсулированная композиция предназначена для высвобождения гетерологичной нагрузки при первом условии, но не при втором условии.

58. Композиция по п.56, отличающаяся тем, что инкапсулированная композиция предназначена для высвобождения гетерологичной нагрузки при высоком значении pH, но не при низком значении pH.

59. Композиция по п.56, отличающаяся тем, что инкапсулированная композиция содержит кишечнорастворимую оболочку.

60. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что композиция является частицей.

61. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что композиция содержит поликатион.

62. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что носитель способен переносить гетерологичную нагрузку в поляризованную эпителиальную клетку или осуществлять трансцитоз гетерологичной нагрузки через поляризованную эпителиальную клетку.

63. Композиция по п.61, отличающаяся тем, что носитель связан с поликатионом.

64. Композиция по п.61, отличающаяся тем, что поликатион представляет собой протамин, полилизин, полиорнитин, полиэтиленимин (PEI), проламин, протамин, поливинилпирролидон (PVP), полиаргинин, поливиниламин или их сочетание.

65. Композиция по п.61, отличающаяся тем, что поликатион является солью протамина.

66. Композиция по п.65, отличающаяся тем, что солью протамина является сульфат протамина, ацетат протамина, бромид протамина, хлорид протамина, капроат протамина, трифторацетат протамина, бикарбонат протамина, пропионат протамина, лактат протамина, формиат протамина, нитрат протамина, цитрат протамина, моногидрофосфат протамина, дигидрофосфат протамина, тартрат протамина или перхлорат протамина.

67. Композиция по п.66, отличающаяся тем, что солью протамина является сульфат протамина.

68. Композиция, содержащая носитель, отличающаяся тем, что носитель способен проникать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через

поляризованную эпителиальную клетку, причем, по меньшей мере, 60% носителя остается интактным через 0,5 часа в анализе панкреатина, при этом анализ панкреатина включает инкубацию композиции, содержащей 100 мкг носителя с 10 мкг панкреатина в 100 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) при температуре 37°C.

69. Композиция по п.68, отличающаяся тем, что по меньшей мере 90% носителя остается интактным через 2 часа в анализе панкреатина.

70. Композиция по п.68, дополнительно содержащая катион.

71. Композиция по п.70, отличающаяся тем, что катион представляет собой катион металла или поликатион.

72. Композиция по п.71, отличающаяся тем, что катион является катионом металла.

73. Композиция по п.72, отличающаяся тем, что катион металла является катионом переходного металла.

74. Композиция по п.68, отличающаяся тем, что носитель состоит из части экзотоксина А синегнойной палочки.

75. Композиция по п.68, отличающаяся тем, что носитель состоит из части полипептида Cholix.

76. Композиция по п.74, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 206-425 в SEQ ID NO: 7.

77. Композиция по п.74, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 150-205 в SEQ ID NO: 7.

78. Композиция по п.74, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом на любой из аминокислот 150-195 в SEQ ID NO: 7.

79. Композиция по п.74, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 1-41 в SEQ ID NO: 7.

80. Композиция по п.74, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 35-40 в SEQ ID NO: 7.

81. Композиция по п.74, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, начиная с аминокислотного положения 40 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, до любого из аминокислотных положений 150-205 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

82. Композиция по п.74, отличающаяся тем, что полипептид Cholix имеет С-конец в любом из аминокислотных положений 150-187 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

83. Композиция по п.74, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8.

84. Композиция по п.74, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

85. Композиция по любому из пп.76-84, отличающаяся тем, что аминокислотные положения пронумерованы на основе выравнивания полипептида Cholix с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, где аминокислотные положения пронумерованы от N-конца до С-конца и начинаются с положения 1 на N-конце.

86. Композиция, содержащая вариант Cholix, оканчивающийся в положениях 195-347, и гетерологичную нагрузку, причем гетерологичная нагрузка представляет собой агент, регулирующий уровень глюкозы.

87. Композиция по п.86, отличающаяся тем, что конечное положение варианта Cholix определяется относительно SEQ ID NO: 7.

88. Композиция по п.86, отличающаяся тем, что носитель способен транскитировать гетерологичную нагрузку через поляризованную эпителиальную клетку.

89. Композиция по п.86, отличающаяся тем, что агент, регулирующий уровень глюкозы, является агентом, снижающим уровень глюкозы.

90. Композиция по п.89, отличающаяся тем, что средство, снижающее уровень глюкозы, представляет собой инкретин, пропротеин глюкагона, пептид глюкагона, глюкагоноподобный пептид 1, глюкагоноподобный пептид 2, глицентин, родственник глицентину полипептид, препропротеин гастроингибиторного полипептида, гастроингибиторный полипептид, дипептидилпептидаза 4, глюкозный транспортер тип 4, препроглюкагон, субстрат рецептора инсулина 1, инсулин, аналог инсулина, аполипопротеин А-II, семейство носителей растворенных веществ 2, глюкозный транспортер тип 1, гликогенсинтазу 1, гликогенсинтазу 2, протеин-тирозиновая фосфатаза нерцепторного типа 1, RAC-альфа серин-треониновая протеинкиназа, гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, гексокиназу 3, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатазу и белок двойной специфичности, киназа пируватдегидрогеназы 1, белок 1, связывающий кальций и содержащий суперспиральный домен, Мах-подобный белок X, фруктозо-бисфосфатальдолоза А, рецептор глюкагоноподобного пептида 1, рецептор глюкагоноподобного пептида 2, рецептор гастроингибиторного полипептида, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1, рецептор инсулиноподобного фактора роста 2, инсулиновый рецептор, агонист ГПП-1 - эксенатид, агонист ГПП-1 - лираглутид, эксенатид, эксендин-4, эксендин-3, агонист GIPR (Des-Ala2-GIP1-30), агонист GIPR - укороченный GIP1-30, агонист GLP-1R(аминокислоты 1-37 GIP), агонист GLP-1R(аминокислоты 7-36 GIP), ликсисенатид (торговые марки Adlyxin® и Lixumia®, Sanofi), лираглутид (торговое наименование Victoza®, Novo Nordisk A/S), семаглутид (торговое наименование Ozempic®, Novo Nordisk A/S), альбиглутид (торговое наименование Tanzeum®, GlaxoSmithKline; димер GLP-1, слитый с альбумином), дулаглутид (торговое наименование Trulicity®, Eli Lilly), глюкозозависимый инсулинотропный полипептид, мультиспецифический пептидный агонист, тирзепатид (Eli Lilly), SAR425899 (Sanofi), двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов

DACRA-089, гларгин/Lantus®, глюлизин/Apidra®, гларин/Toujeo®, Insuman®, детемир/Levemir®, лизпро/Humalog®/Liprolog®, Деглудек/ДеглудекПлюс, инсулин аспарт, инсулин и аналоги (например, LY-2605541, LY2963016, NN1436), инсулин пегилированный лизпро, Humulin®, Линджета, SuliXen®, NN1045, инсулин плюс SymlinTM, PE0139, инсулины быстрого и короткого действия (например, Линджета, PH20, NN1218, HinsBet), (APC-002) гидрогелевые, пероральные, ингаляционные, трансдермальные и сублингвальные инсулины (например, Exubera®, Nasulin®, Afrezza®, Tregopil®, TPM 02, капсулин, Oral-lyn®, Cobalamin®, пероральный инсулин, ORMD-0801, NN1953, NN1954, NN1956, VIAtab и пероральный инсулин Oshadi), или аналог эксендина-4, где аналог эксендина-4 представляет собой desPro36-эксендин-4(1-39)-Lys6NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys4-NH₂; H-des(Pro36, 37)-эксендин-4-Lys5-NH₂; desPro36[Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, Asp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Trp(O2) 26, Asp28]эксендин-4 (1-39); или desPro36[Trp(O2) 25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39); desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, Asp28]эксендин-4 (1-39); или desPro36[Met(O)14 Trp(O2)25, IsoAsp28]эксендин-4 (1-39).

91. Композиция по п.86, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка содержит инкретин.

92. Композиция по п.86, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка включает эксенатид или инсулин.

93. Композиция по п.86, отличающаяся тем, что композиция содержит частицу.

94. Композиция по п.86, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка представляет собой эксендин-3, эфпегленатид, семаглутид, агонист GLP-1R(аминокислоты 1-37 GIP), агонист GLP-1R(аминокислоты 7-36 GIP), тирзепатид, оксинтомодулин, агонист GIPR - укороченный GIP1-30, двойной агонист амилиновых и кальцитониновых рецепторов, препроинсулин, инсулин аспарт, инсулин гларгин или инсулин лизпро.

95. Композиция, содержащая носитель, полученный из бактериального токсина, способный проникать в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку; и

катион переходного металла или поликатион, причем поликатион представляет собой молекулу или химический комплекс, имеющий более 2 положительных зарядов.

96. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что композиция содержит катион переходного металла.

97. Композиция 96, отличающийся тем, что катион переходного металла выбран из группы, состоящей из Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ и Cu²⁺.

98. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что катионом переходного металла является Zn²⁺.

99. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что композиция содержит поликатион.

100. Композиция по п.99, отличающаяся тем, что поликатион представляет собой протамин, полилизин, полиорнитин, полиэтиленимин (PEI), проламин, протамин, поливинилпирролидон (PVP), полиаргинин, поливиниламин или их сочетание.

101. Композиция по п.99, отличающаяся тем, что поликатион представляет собой соль протамина.

102. Композиция по п.99, отличающаяся тем, что солью протамина является сульфат протамина, ацетат протамина, бромид протамина, хлорид протамина, капроат протамина, трифторацетат протамина, протамина бикарбоната, пропионат протамина, лактат протамина, формиат протамина, нитрат протамина, цитрат протамина, моногидрофосфат протамина, дигидрофосфат протамина, тартрат протамина или перхлорат протамина.

103. Композиция по п.99, отличающаяся тем, что солью протамина является сульфат протамина.

104. Композиция по п.95, дополнительно содержащая гетерологичную нагрузку.

105. Композиция по п.103, отличающаяся тем, что гетерологичная нагрузка включает эксенатид, инсулин или человеческий гормон роста.

106. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что носитель состоит из экзотоксина А синегнойной палочки или части экзотоксина А синегнойной палочки.

107. Композиция по п.104, отличающаяся тем, что носитель состоит из полипептида SEQ ID NO: 69 или части SEQ ID NO: 69.

108. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что носитель состоит из части полипептида Cholix.

109. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 206-425 в SEQ ID NO: 1.

110. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом в любом из аминокислотных положений 150-205 в SEQ ID NO: 1.

111. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с С-концом на любой из аминокислот 150 to 195 of SEQ ID NO: 1.

112. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 1 to 41 of SEQ ID NO: 1.

113. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности с N-концом в любом из аминокислотных положений 35-40 в SEQ ID NO: 1.

114. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, начиная с аминокислотного положения 40 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, до любого из аминокислотных

положений 150-205 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

115. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что полипептид Cholix имеет С-конец в любом из аминокислотных положений 150-187 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

116. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8.

117. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что полипептид Cholix состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

118. Композиция по любому из пп.107-115, отличающаяся тем, что аминокислотные положения пронумерованы на основе выравнивания полипептида Cholix с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, где аминокислотные положения пронумерованы от N-конца до С-конца и начинаются с положения 1 на N-конце.

119. Композиция по п.95, отличающаяся тем, что композиция содержит частицу.

120. Композиция, содержащая инсулин, отличающаяся тем, что по меньшей мере 20% инсулина остается интактным через 1 час в анализе панкреатина, включающем инкубацию композиции, содержащей инсулин, с панкреатином в ФСБ при температуре 37°C.

121. Композиция по п.118, дополнительно содержащая носитель, полученный из бактериального токсина, причем носитель способен транспортироваться в поляризованную эпителиальную клетку или трансцитозировать через поляризованную эпителиальную клетку.

122. Композиция по п.119, отличающаяся тем, что носитель состоит из части полипептида Cholix.

123. Композиция по п.118, отличающаяся тем, что композиция содержит катион переходного металла.

124. Композиция по п.121, отличающаяся тем, что катион переходного металла выбран из группы, состоящей из Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} .

125. Композиция по п.121, отличающаяся тем, что катионом переходного металла является Zn^{2+} .

126. Композиция по п.118, отличающаяся тем, что композиция содержит поликатион.

127. Композиция по п.125, отличающаяся тем, что поликатионом является протамин.

128. Композиция по любому из пп.1-125, отличающаяся тем, что композиция содержит частицу.

129. Композиция по п.126, отличающаяся тем, что частица состоит из микрочастицы.

130. Композиция по п.127, отличающаяся тем, что микрочастицы образуются распылительной сушкой.

131. Композиция по п.126, отличающаяся тем, что частица имеет диаметр от

примерно 50 нм до примерно 20 мкм.

132. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп.1-129.

133. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп.1-129 и консервант.

134. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп.1-130 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

135. Способ, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из пп.130-132.

136. Способ по п.133, отличающийся тем, что субъект страдает воспалительным заболеванием, аутоиммунным заболеванием, злокачественной опухолью или метаболическим расстройством.

137. Способ по п.134, отличающийся тем, что субъект страдает метаболическим расстройством.

138. Способ по п.135, метаболическое расстройство представляет собой сахарный диабет, диабет вследствие ожирения, гипергликемию, дислипидемию, гипертриглицеридемию, метаболический синдром X, инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическую дислипидемию, гиперлипидемию, жировую болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH), гепатит, ожирение, сосудистые заболевания, болезни сердца, инсульт, нарушение толерантности к глюкозе, повышенный уровень глюкозы натощак, инсулинорезистентность, секрецию альбумина с мочой, центральный тип ожирения, гипертонию, повышенный уровень триглицеридов, повышенный уровень холестерина ЛПНП и пониженный уровень холестерина ЛПВП, гипергликемию, гиперинсулинемию, дислипидемию, кетоз, гипертриглицеридемию, метаболический синдром X, инсулинорезистентность, нарушенную гликемию натощак, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическую дислипидемию, глюконеогенез, избыточный гликогенолиз, диабетический кетоацидоз, гипертриглицеридемию, артериальную гипертензию, диабетическую нефропатию, почечную недостаточность, декомпенсированную почечную недостаточность, гиперфагию, атрофию мышц, диабетическую невропатию, диабетическую ретинопатию, диабетическую кому, атеросклероз, ишемическую болезнь сердца, заболевание периферических артерий или гиперлипидемию.

139. Способ, включающий комбинирование носителя бактериального происхождения с гетерологичной нагрузкой и катионом для получения частицы.

140. Способ по п.137, отличающийся тем, что гетерологичная нагрузка выбрана из группы, состоящей из красителя, радиофармацевтического средства, гормона, цитокина, ингибитора ФНО, средства, снижающего уровень глюкозы, опухолеассоциированного антигена, пептида и полипептида.

141. Способ по п.137, дополнительно включающий распылительную сушку носителя бактериального происхождения, гетерологической нагрузки и катиона.

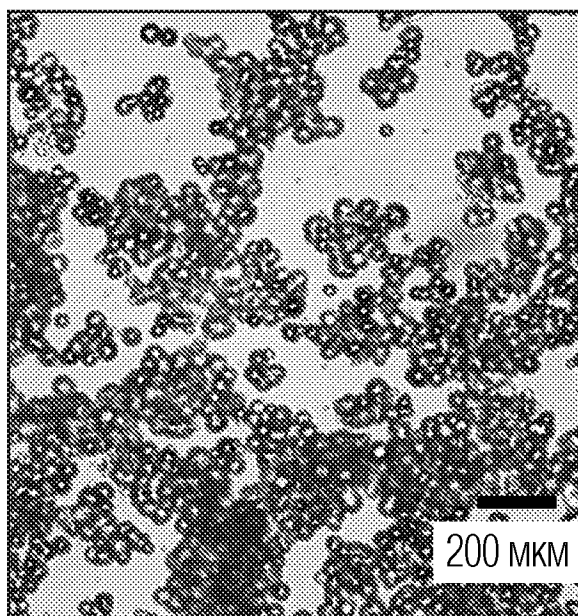
142. Способ по п.137, отличающийся тем, что способ включает (a) приготовление смеси, состоящей из выделенного носителя и нагрузки; (b) приготовление смеси, содержащей сульфат протамина и NaPO_4 ; и (c) объединение смеси (a) со смесью (b) и выдерживание объединенной смеси в течение ночи при комнатной температуре.

143. Способ по п.140, отличающийся тем, что способ дополнительно включает стадию (d) расщепления частиц со стадии (c) на более мелкие частицы путем увеличения ионной силы объединенной смеси со стадии (c).

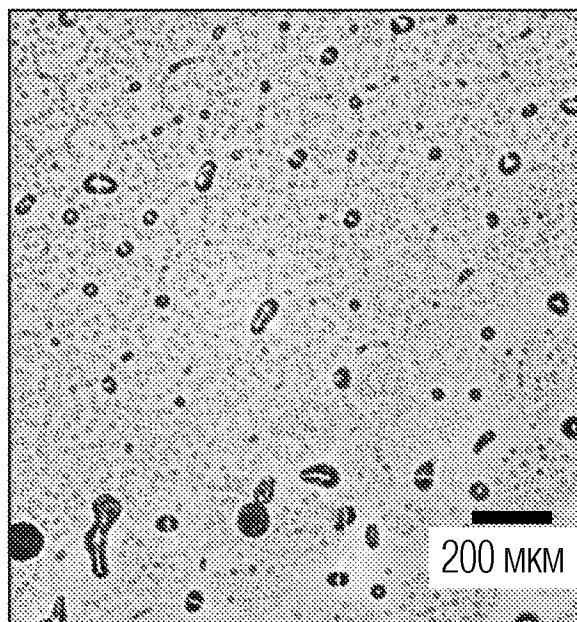
144. Способ по п.140, отличающийся тем, что препарат стадии (a) не содержит ZnCl_2 .

145. Способ по п.140, отличающийся тем, что препарат стадии (a) содержит ZnCl_2 .

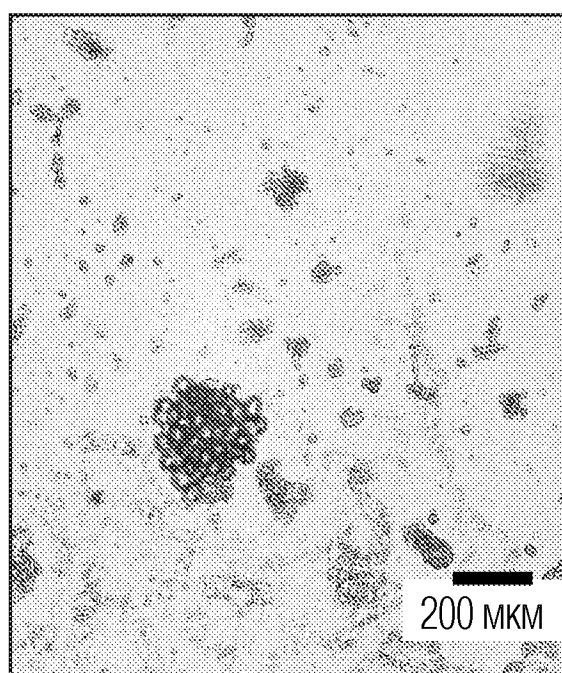
По доверенности



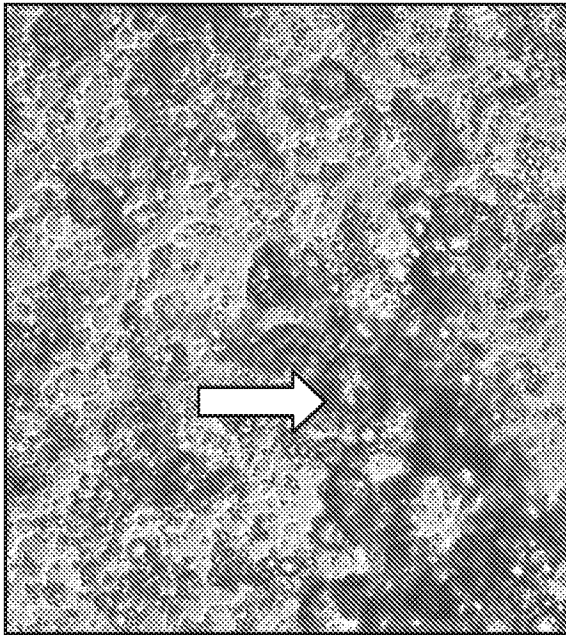
ФИГ. 1А



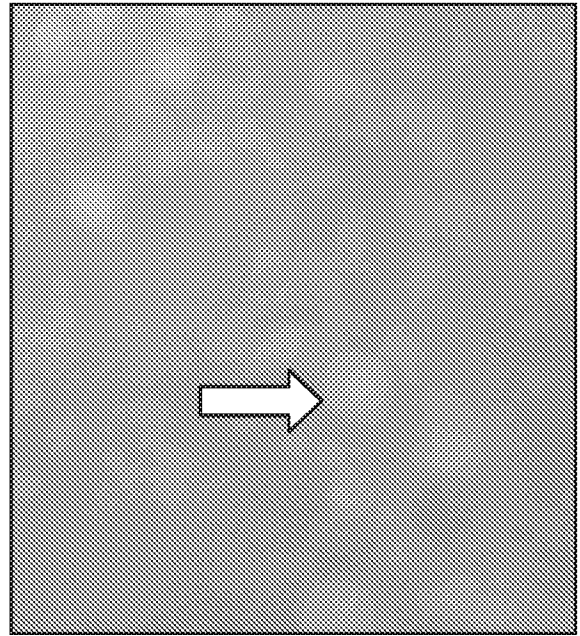
ФИГ. 1В



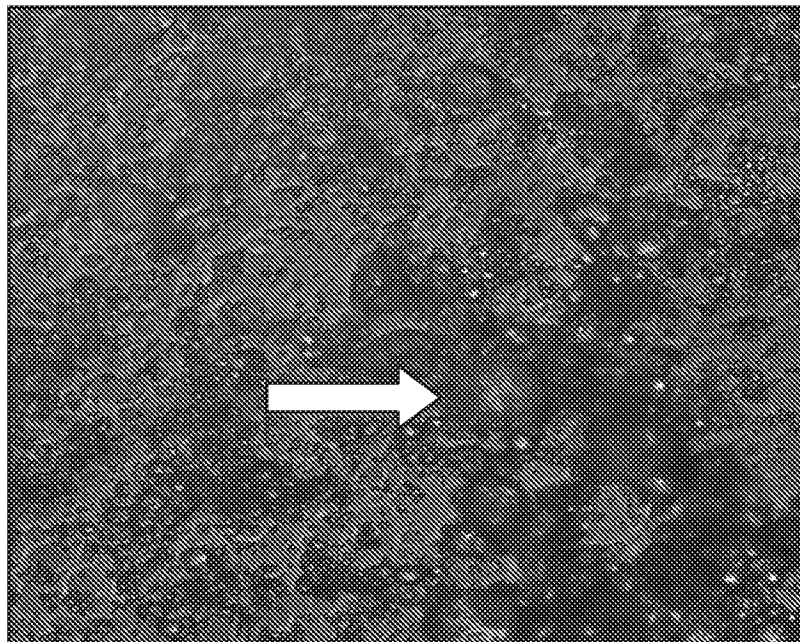
ФИГ. 1С



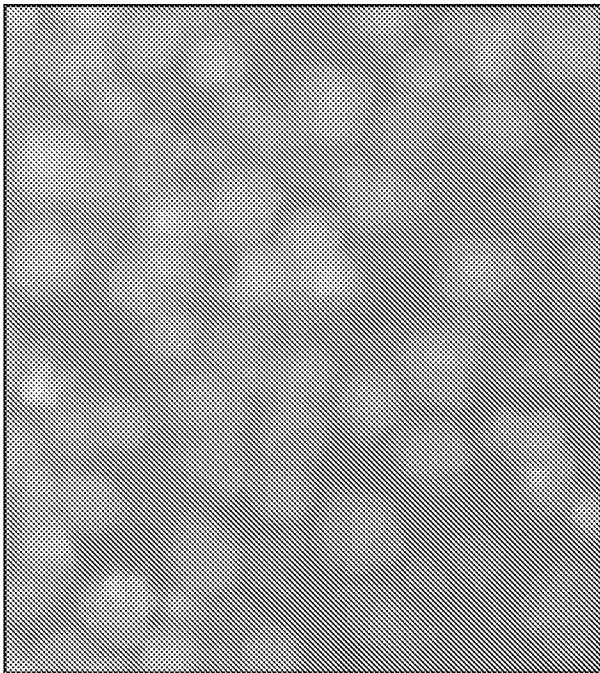
ФИГ. 2А



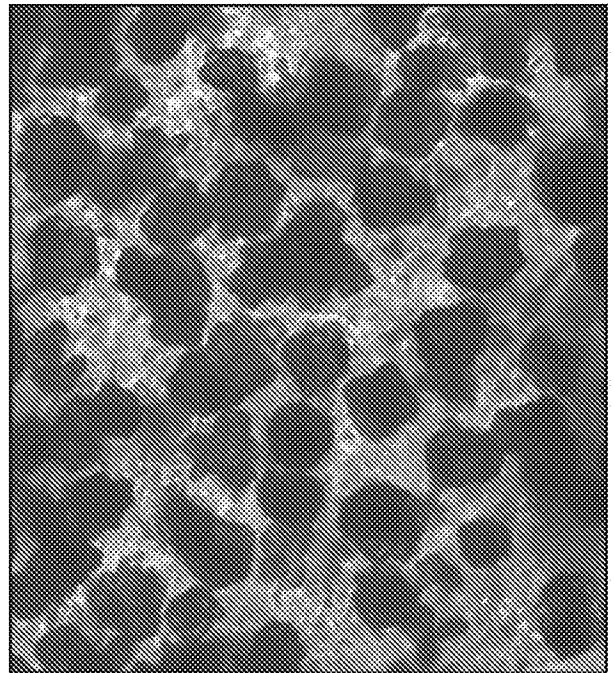
ФИГ. 2В



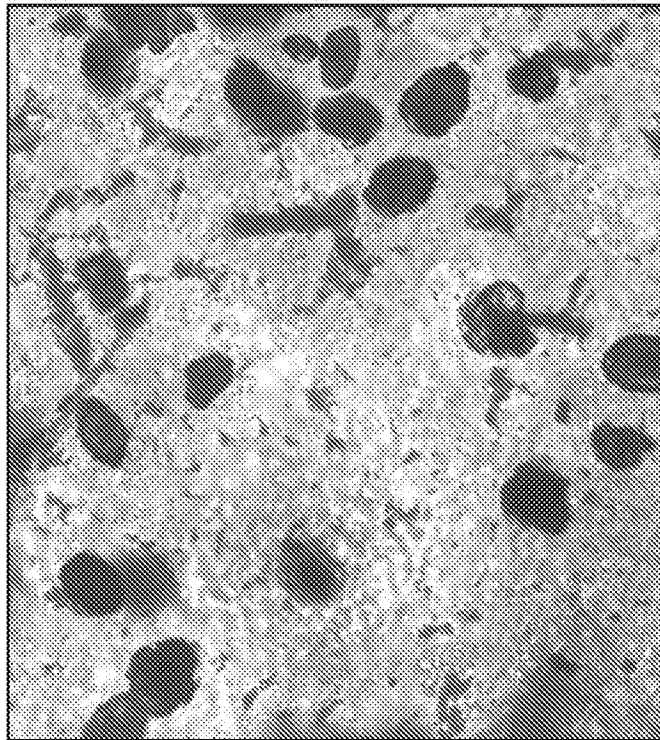
ФИГ. 2С



ФИГ. 3А



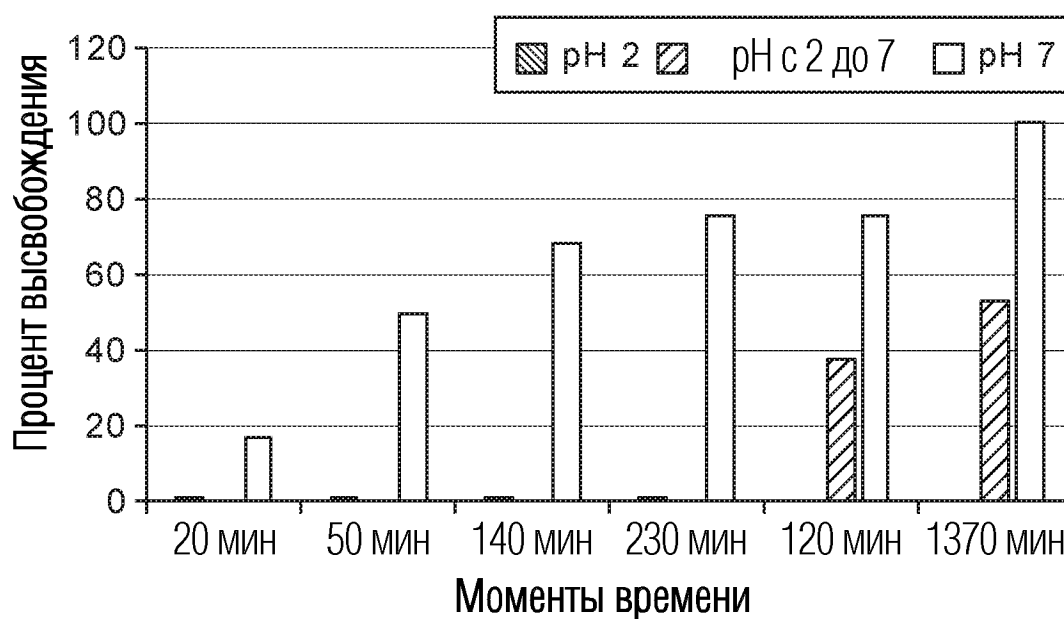
ФИГ. 3В



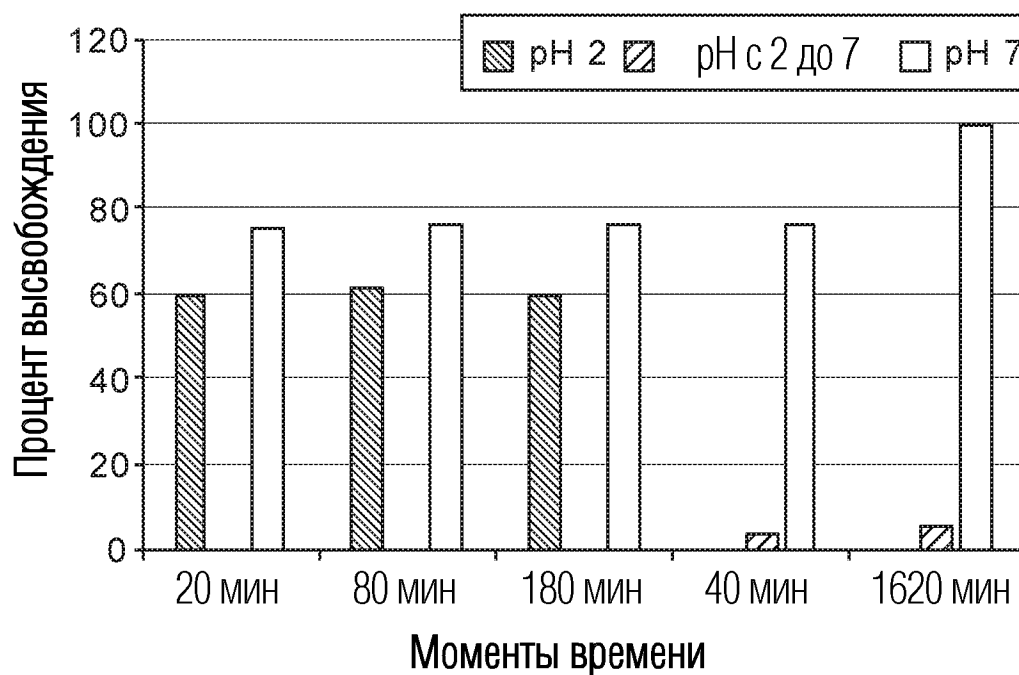
ФИГ. 4А



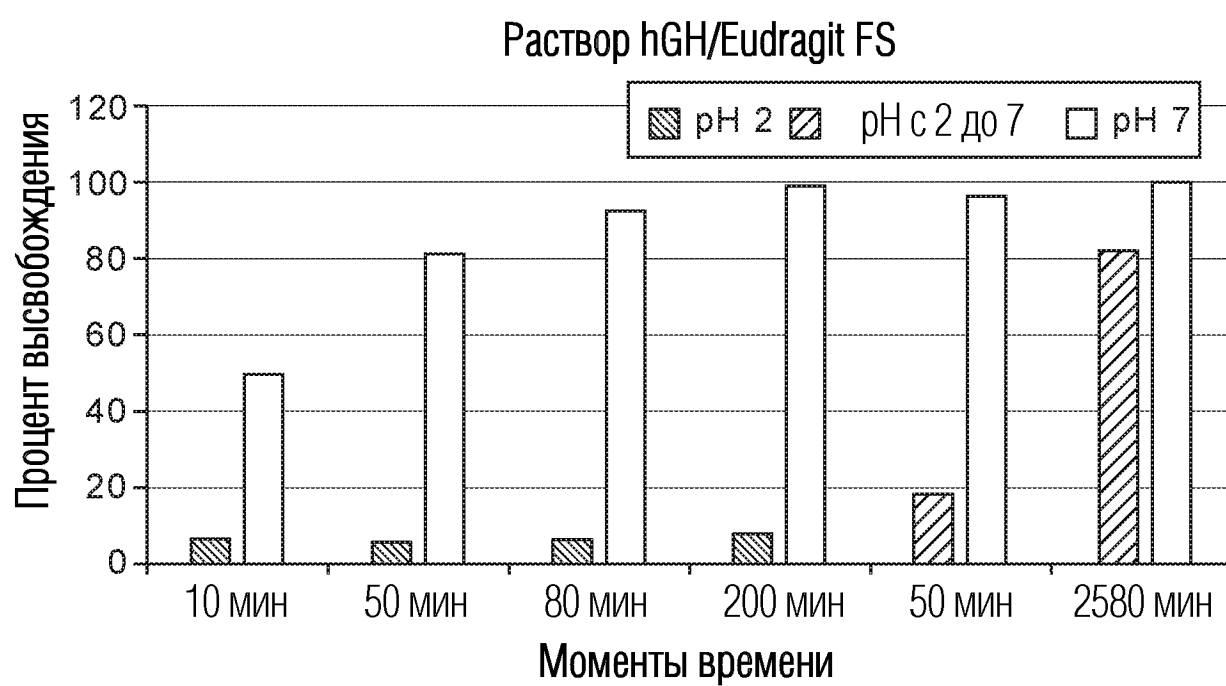
ФИГ. 4В



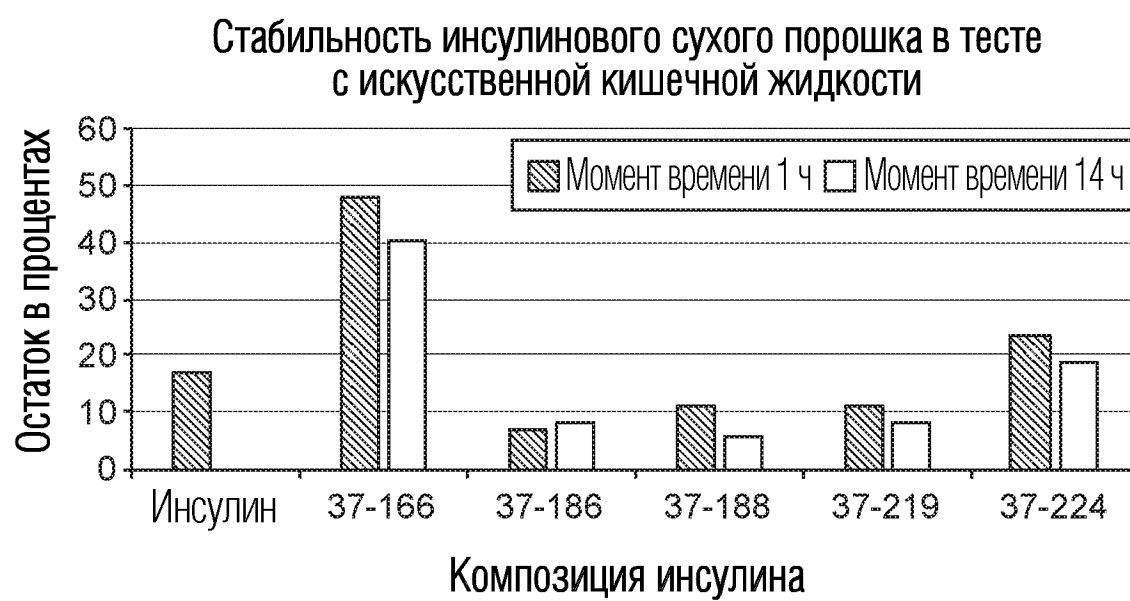
ФИГ. 5А



ФИГ. 5В

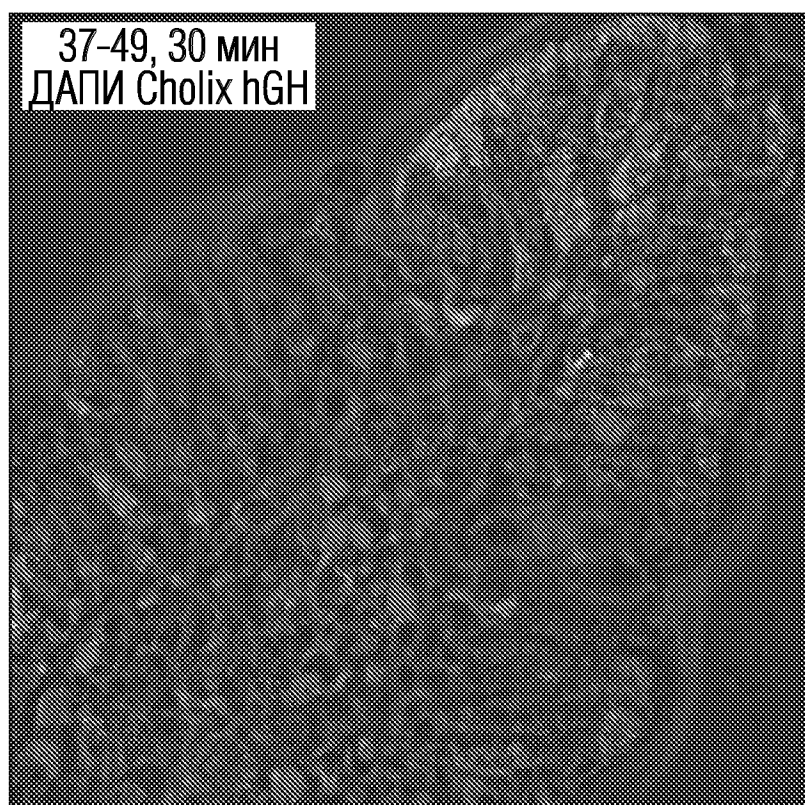


ФИГ. 5С

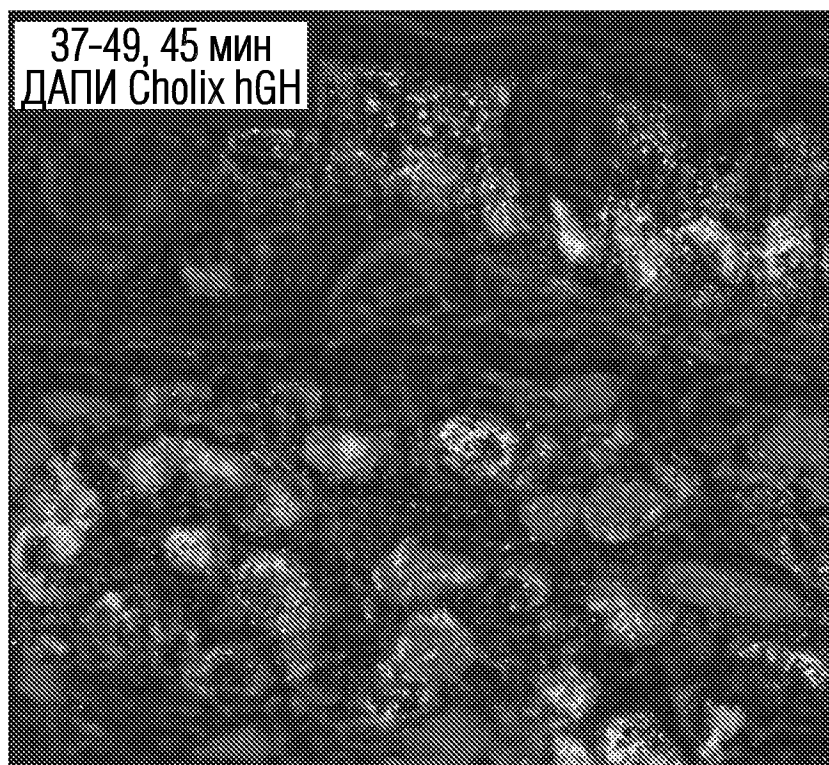
**ФИГ. 6**



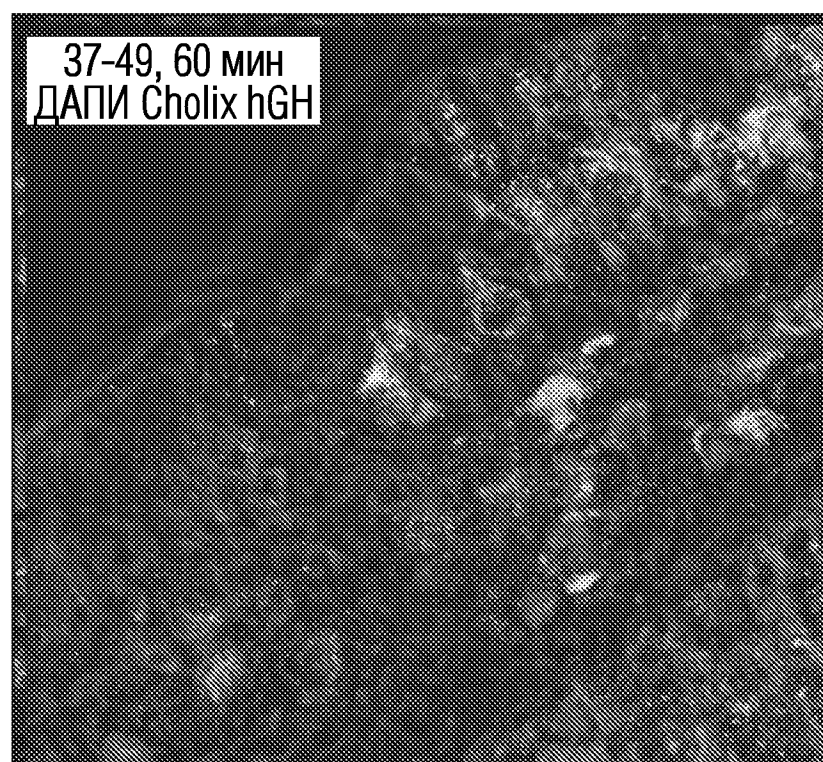
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

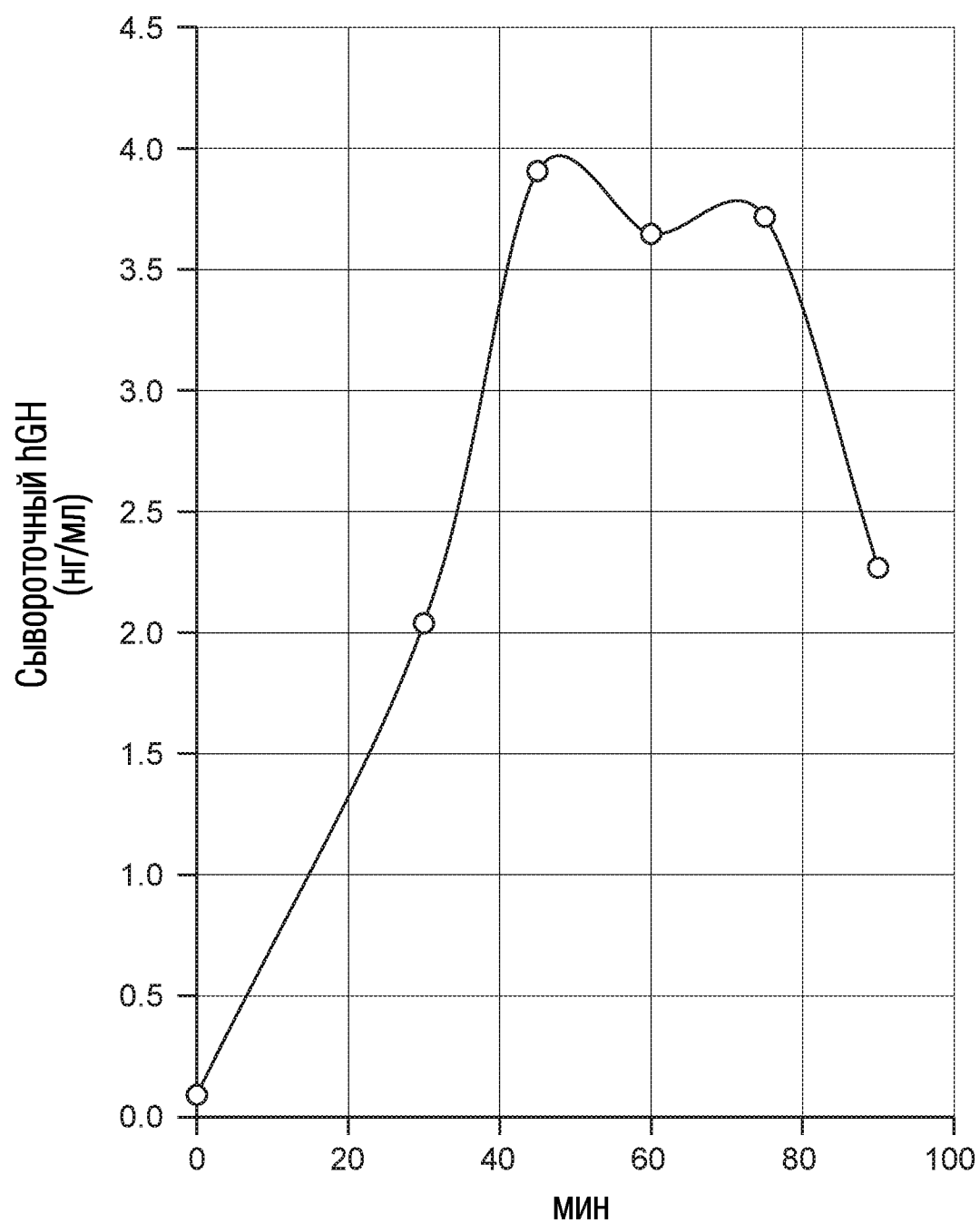


ФИГ. 7С

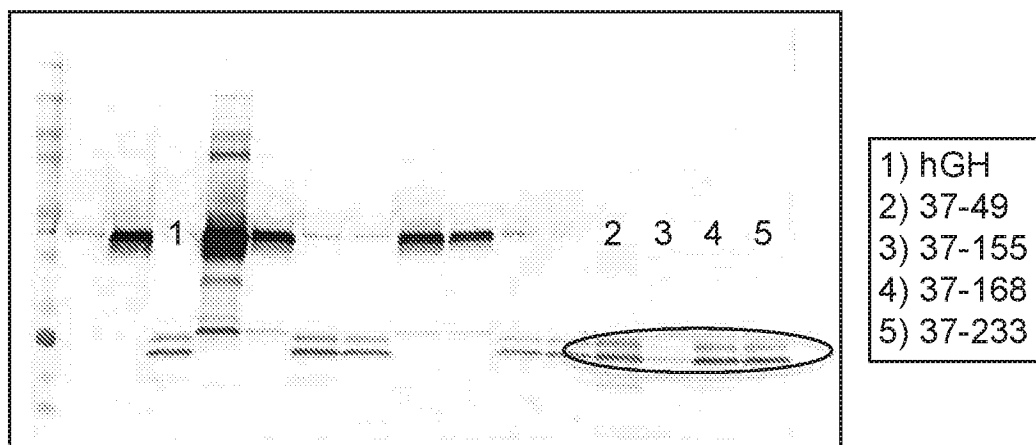


ФИГ. 7D

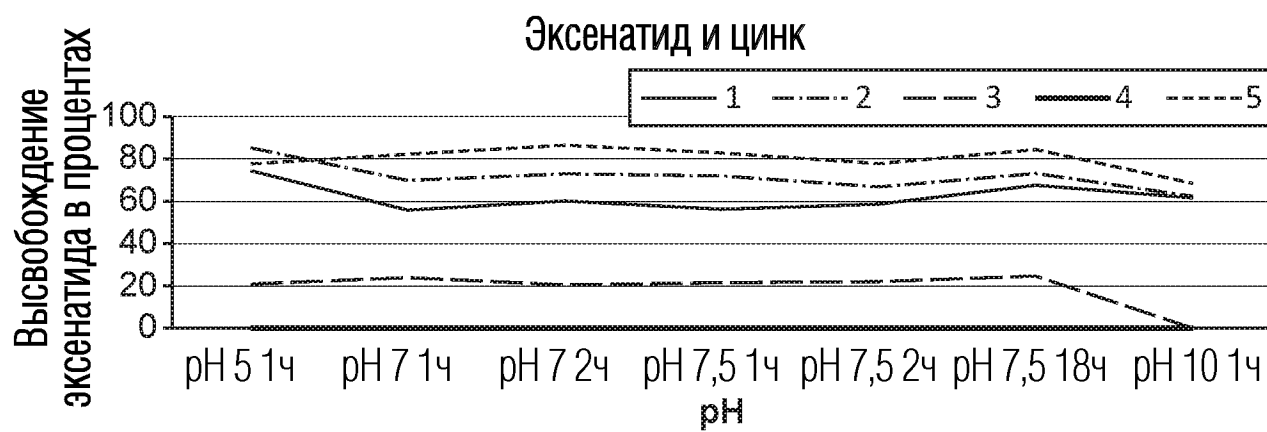
10/24



ФИГ. 8

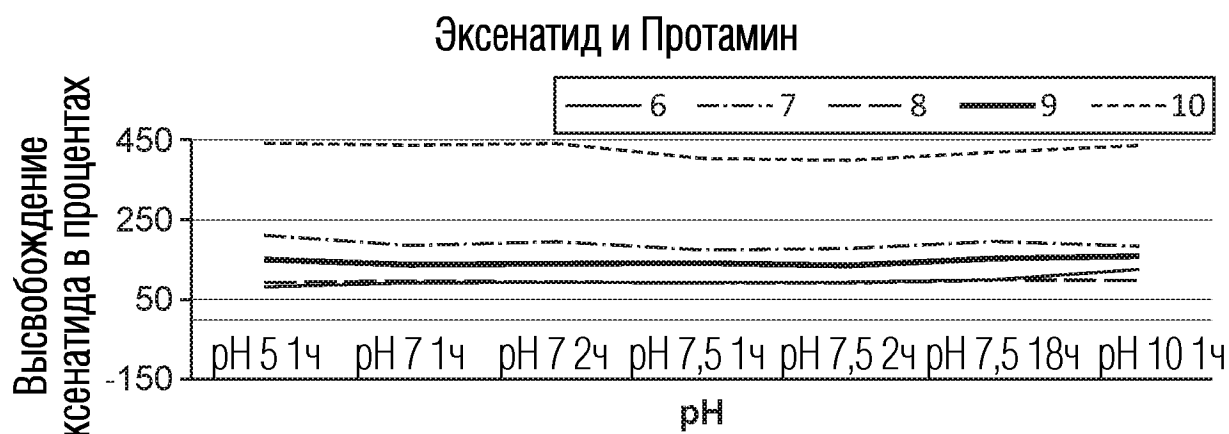


ФИГ. 9

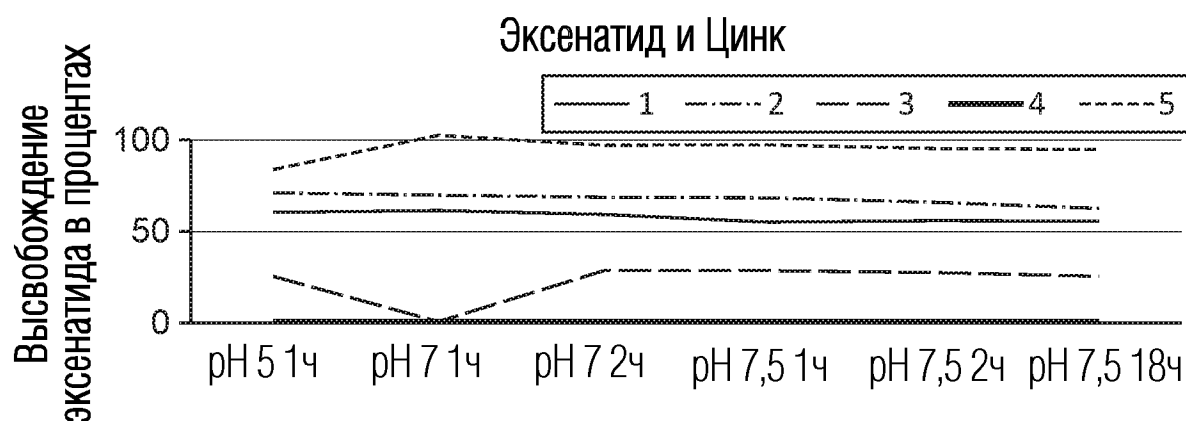


ФИГ. 10А

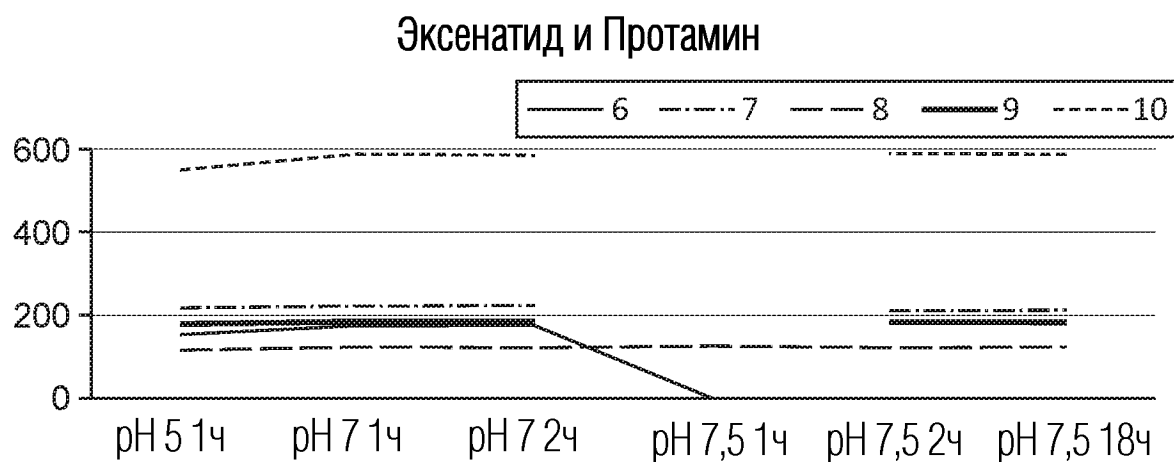
12/24



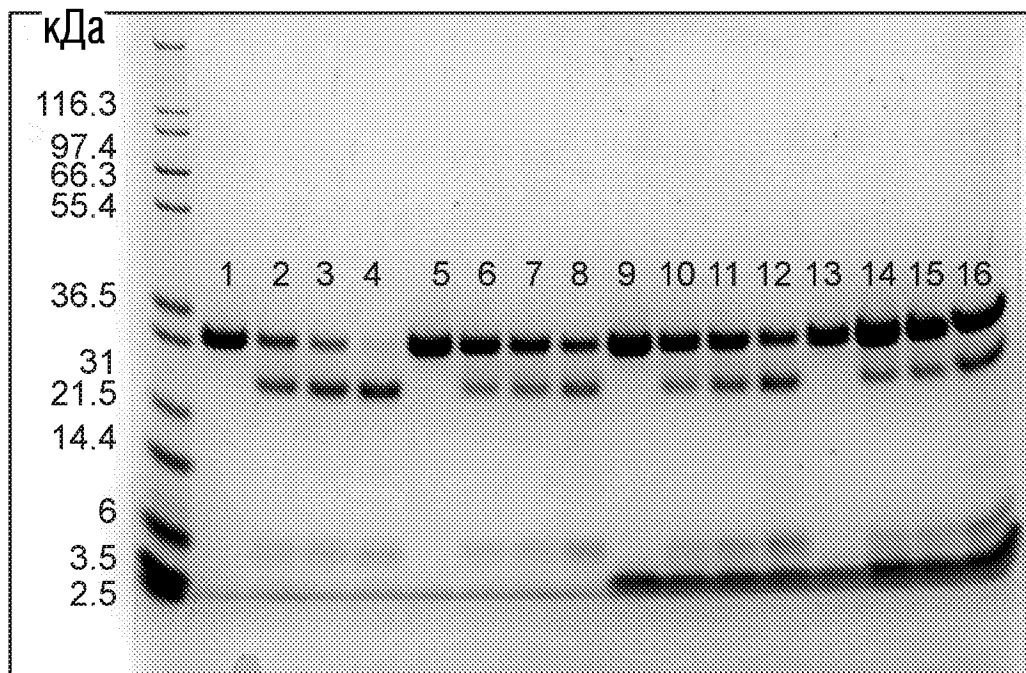
ФИГ. 10В



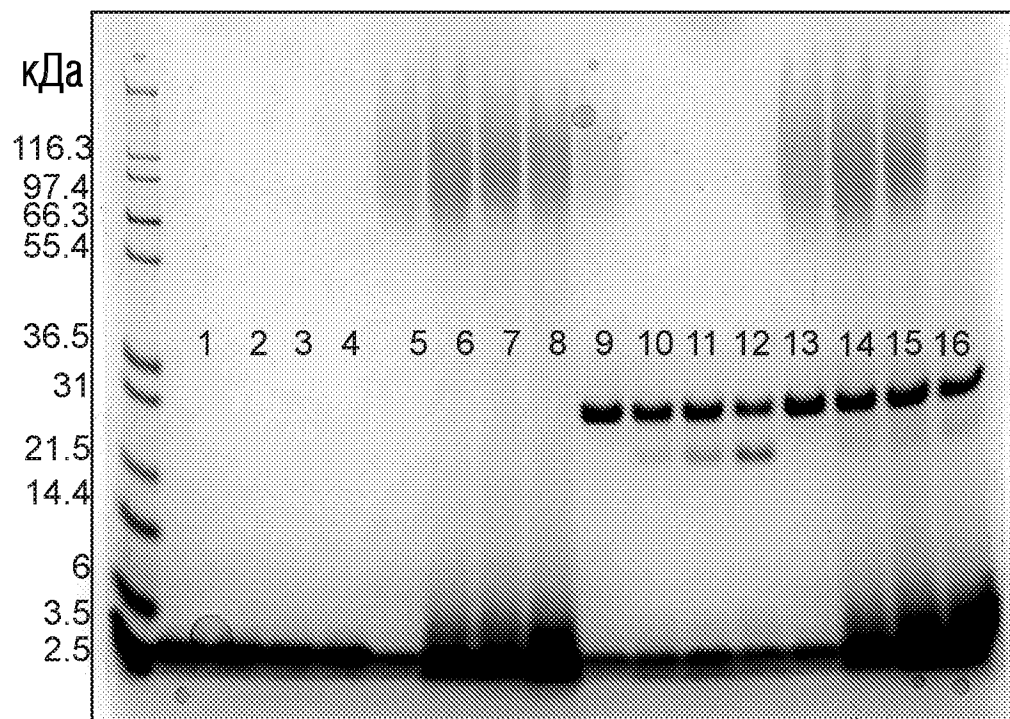
ФИГ. 10С



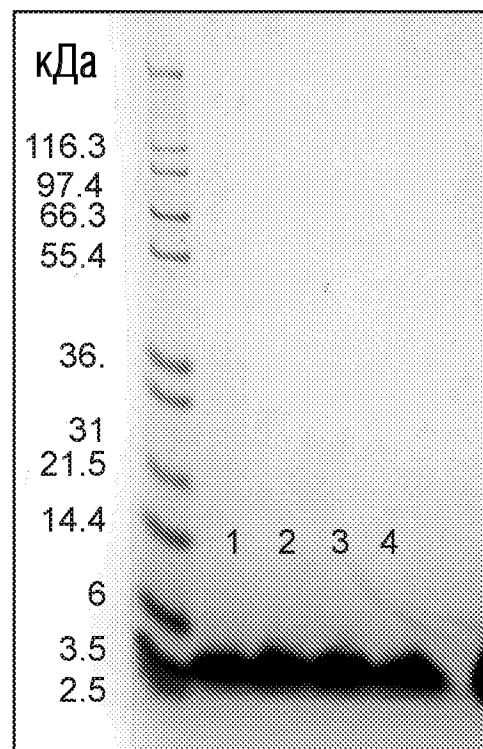
ФИГ. 10С



ФИГ. 11А

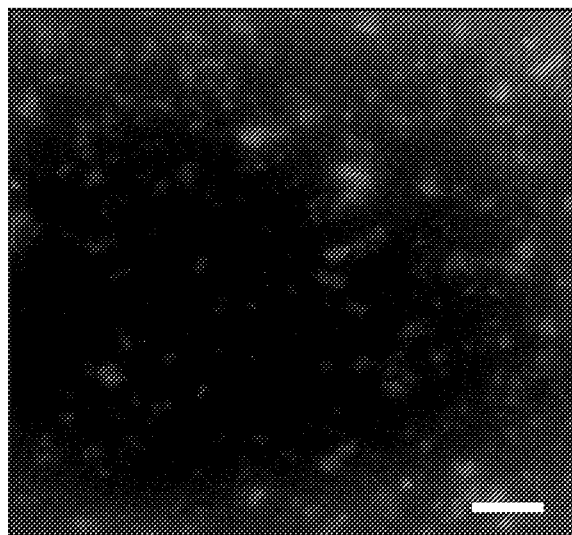


ФИГ. 11В



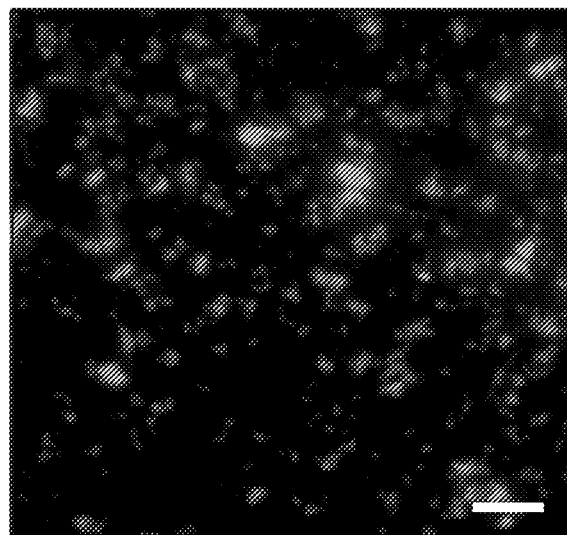
ФИГ. 11С

SEQ ID NO. 3-Zn-Exe-ФИТЦ

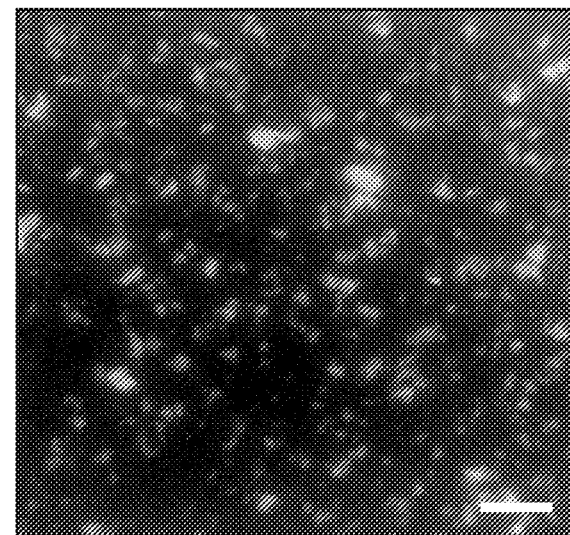


ФИГ. 12А

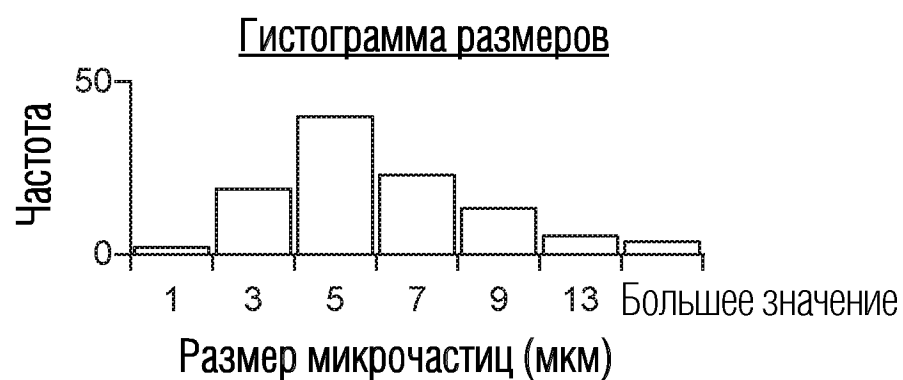
Меченный Alexa 647 анти-SEQ ID NO. 3



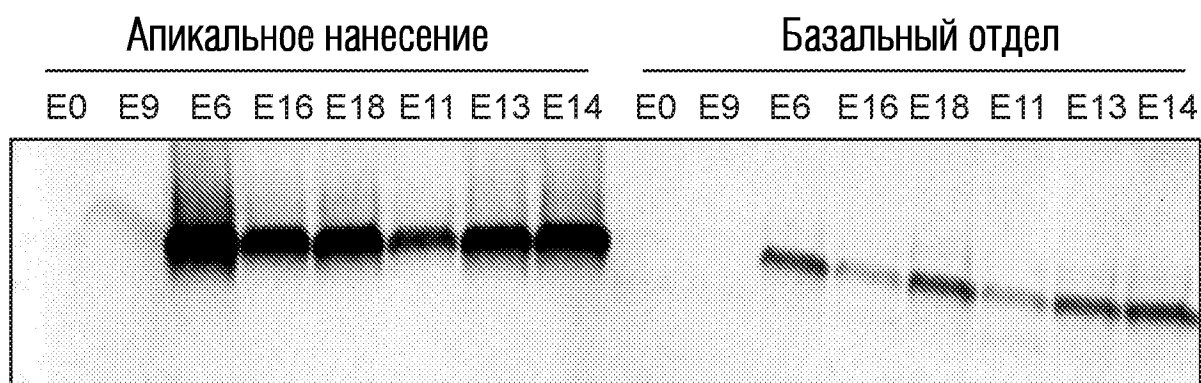
ФИГ. 12В



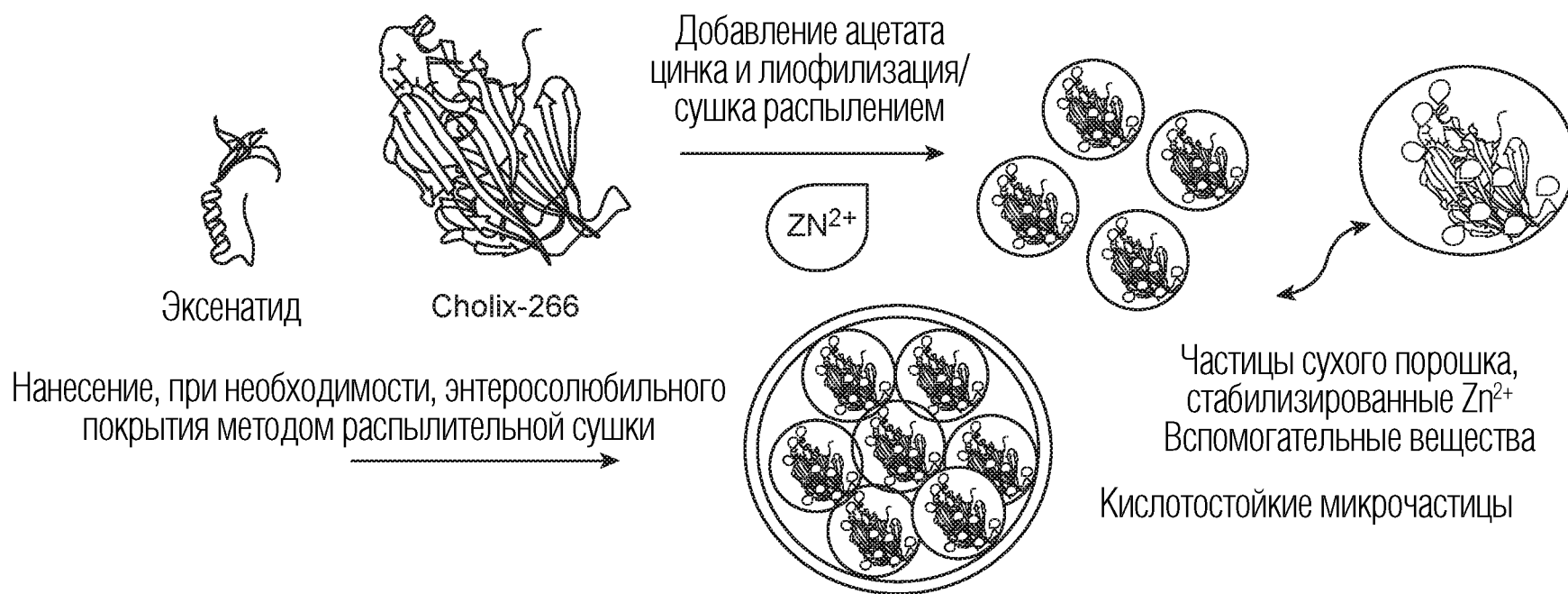
ФИГ. 12С



ФИГ. 13

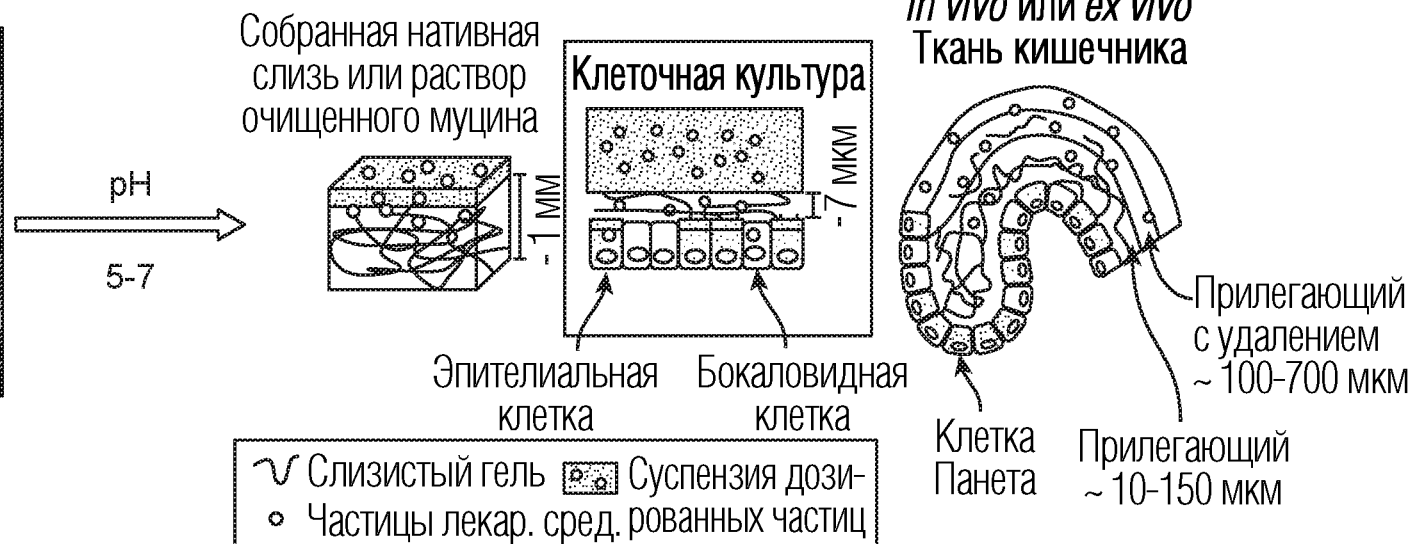
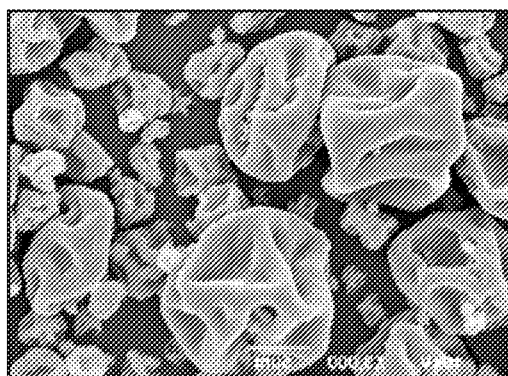


ФИГ. 14

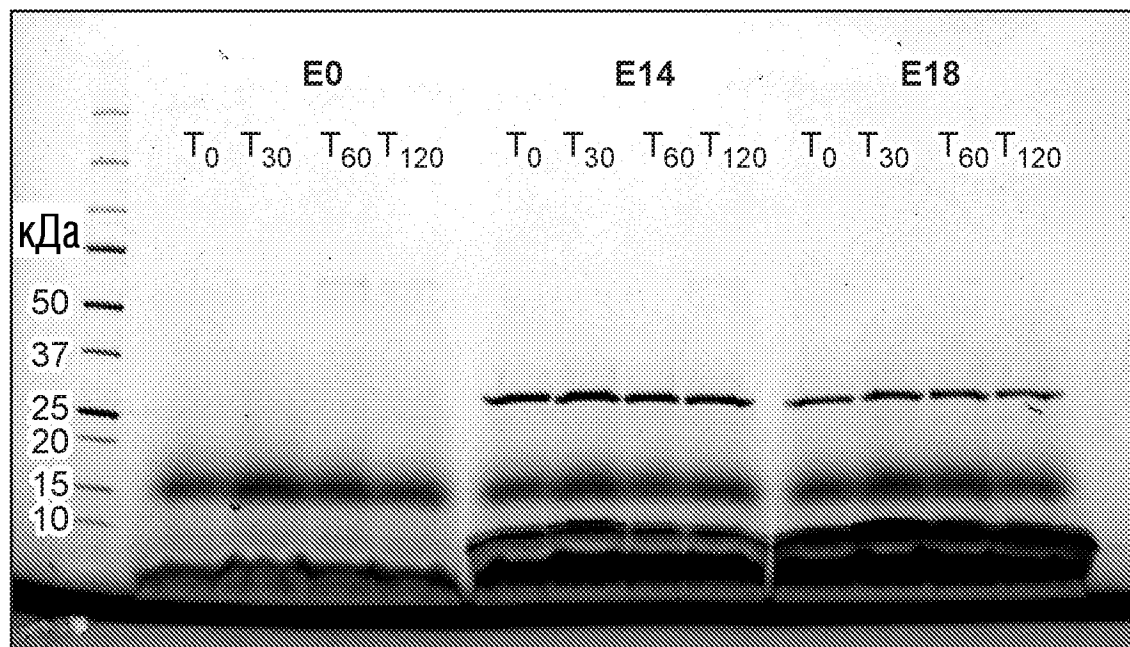


ФИГ. 15

Микрочастицы

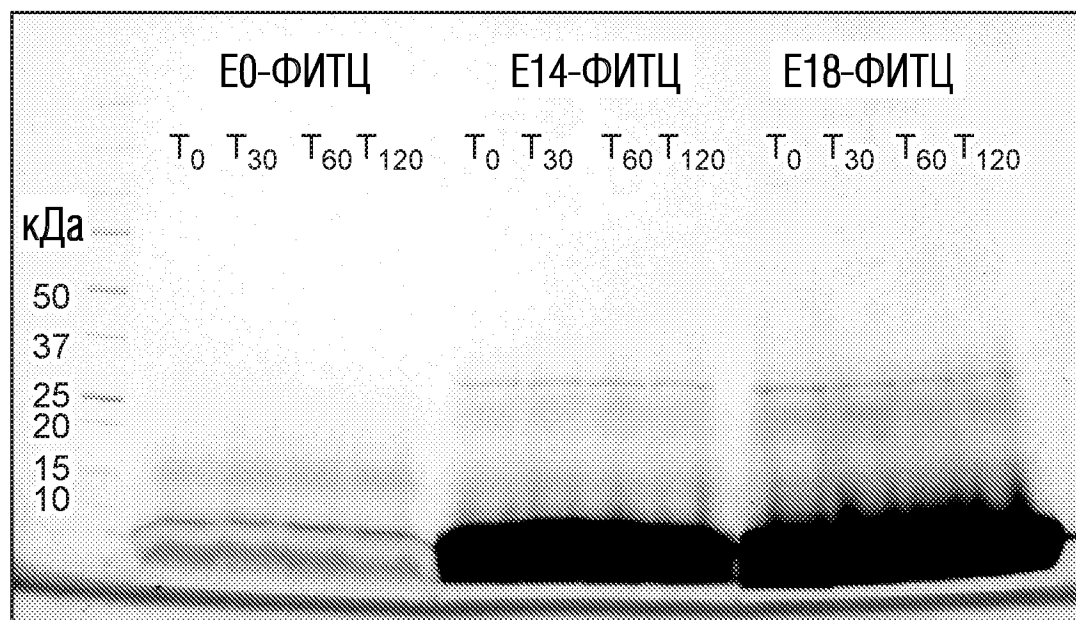


ФИГ. 16

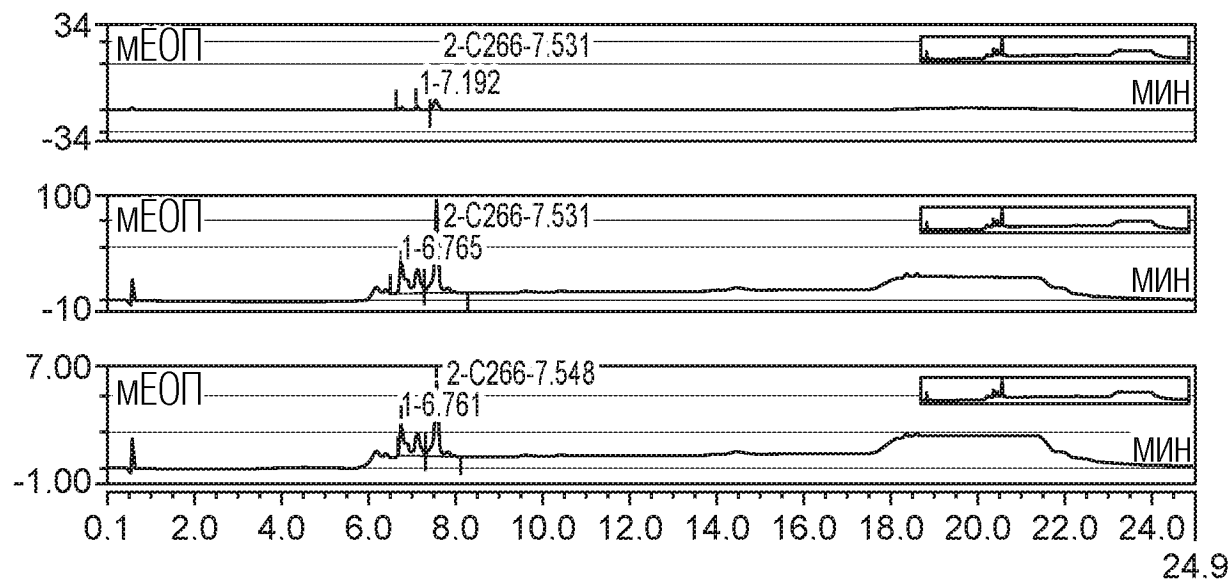


ФИГ. 17А

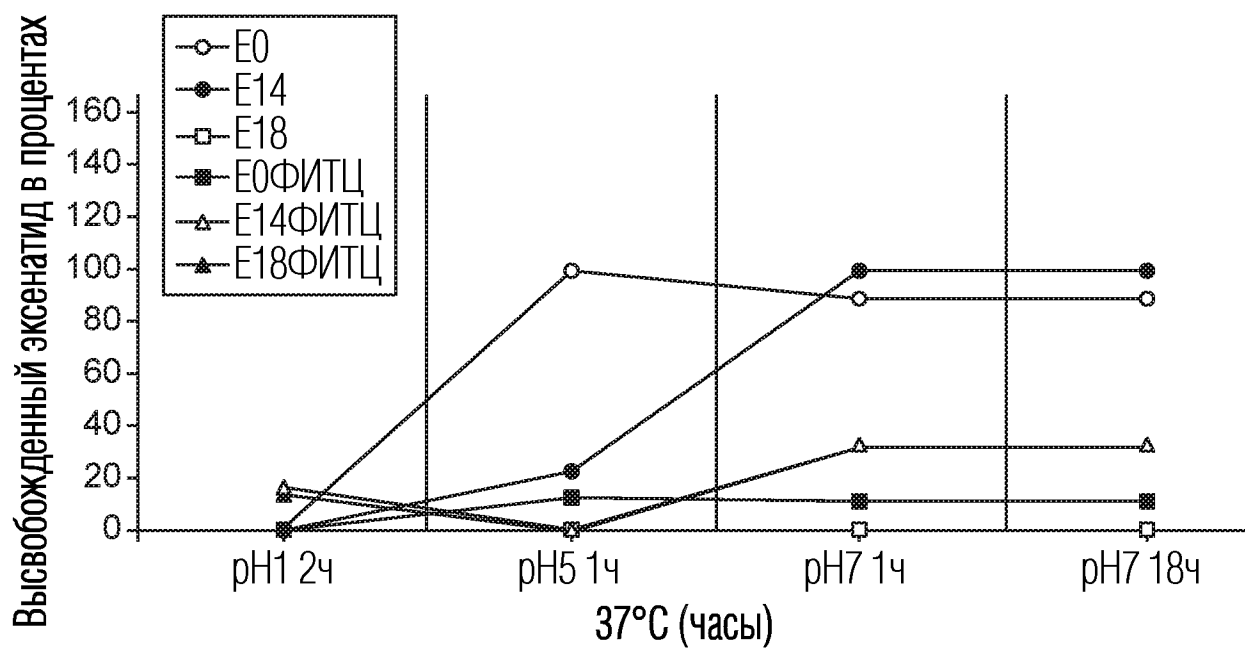
Е0-ФИТЦ



ФИГ. 17В

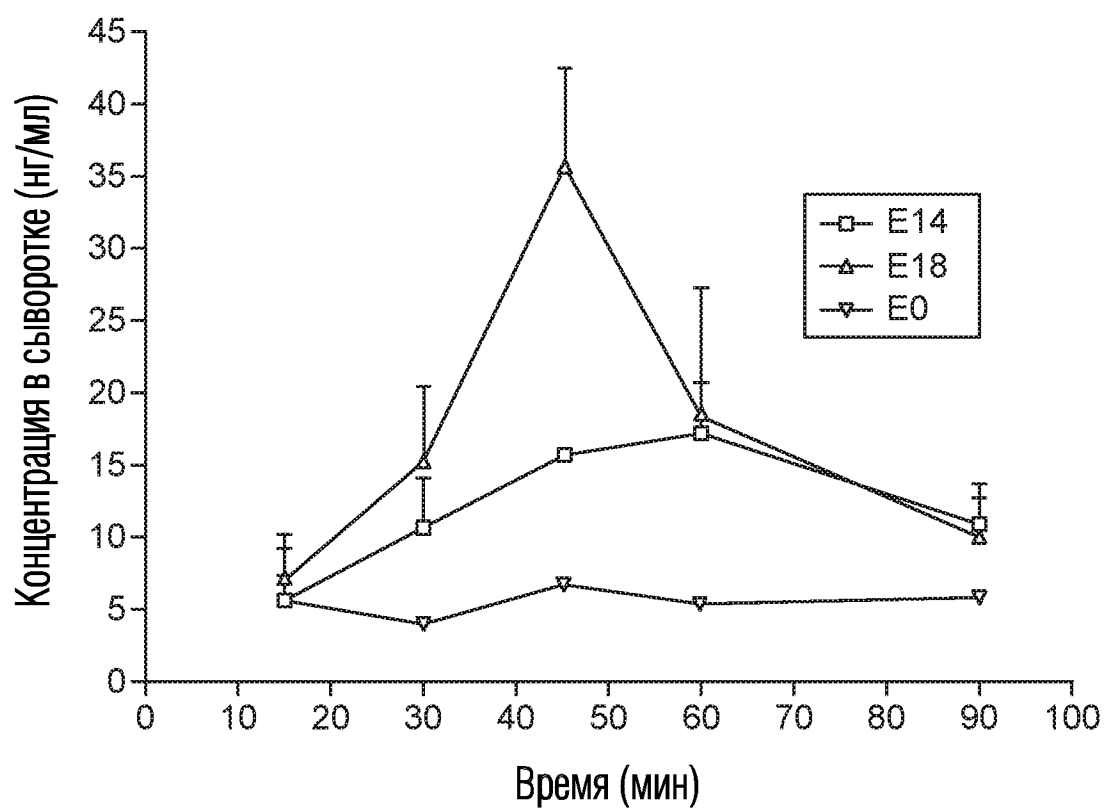


ФИГ. 18

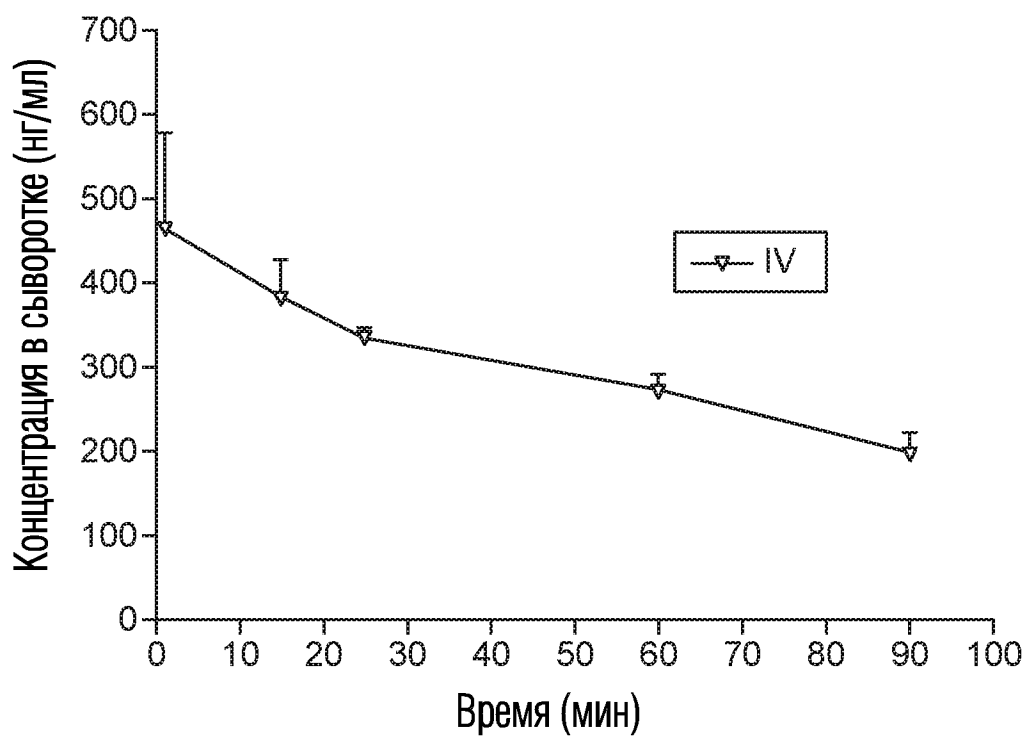


ФИГ. 19

21/24

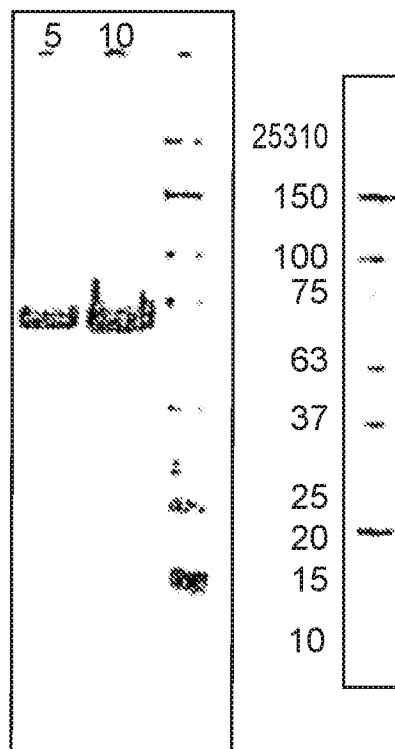


ФИГ. 20

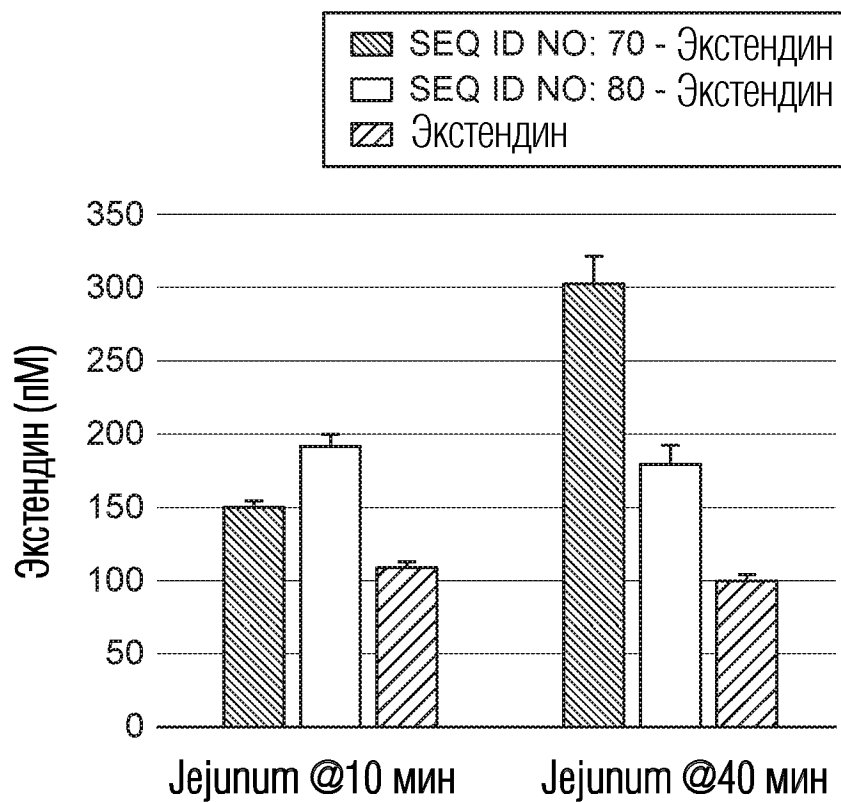


ФИГ. 21

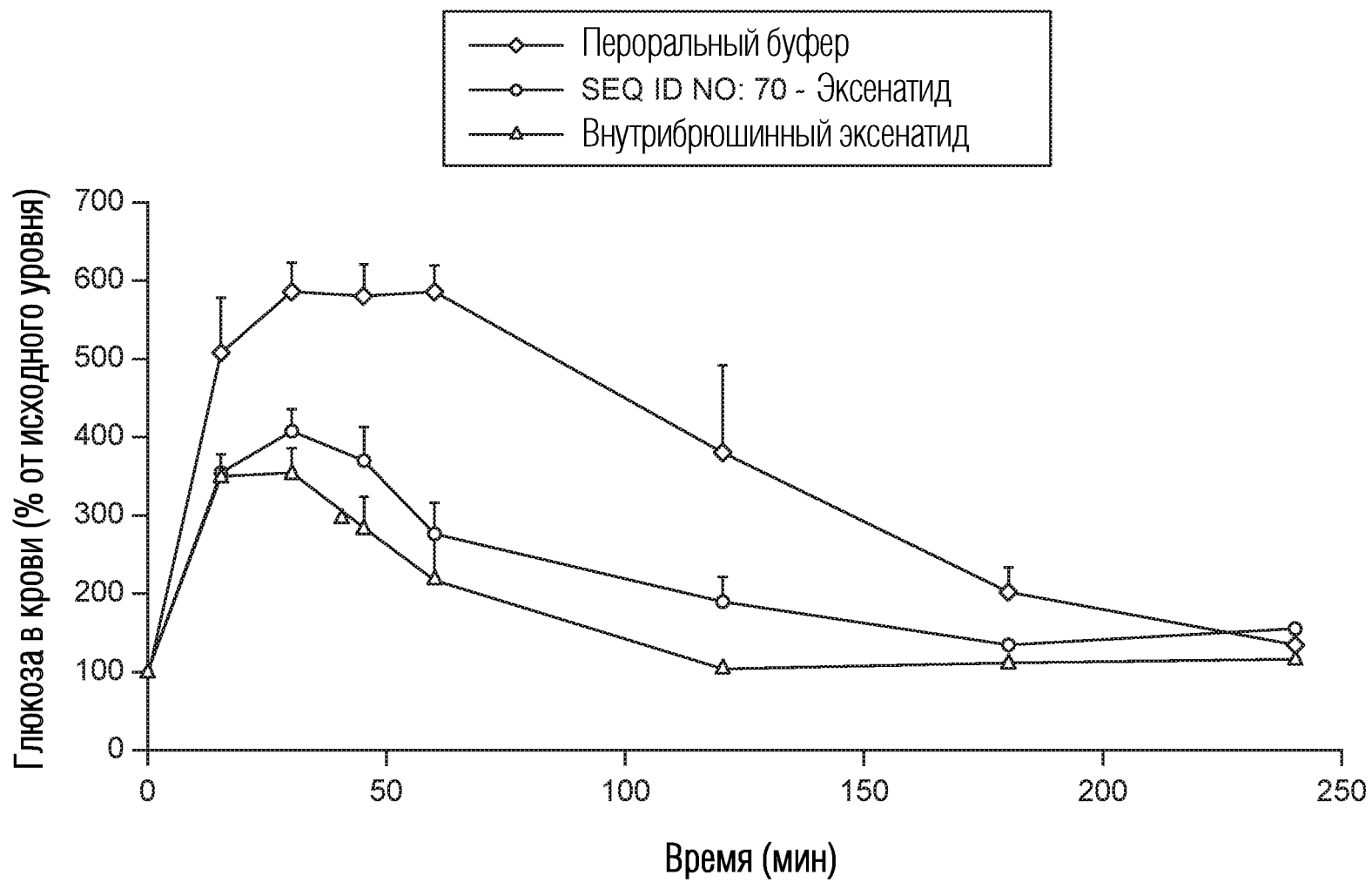
22/24



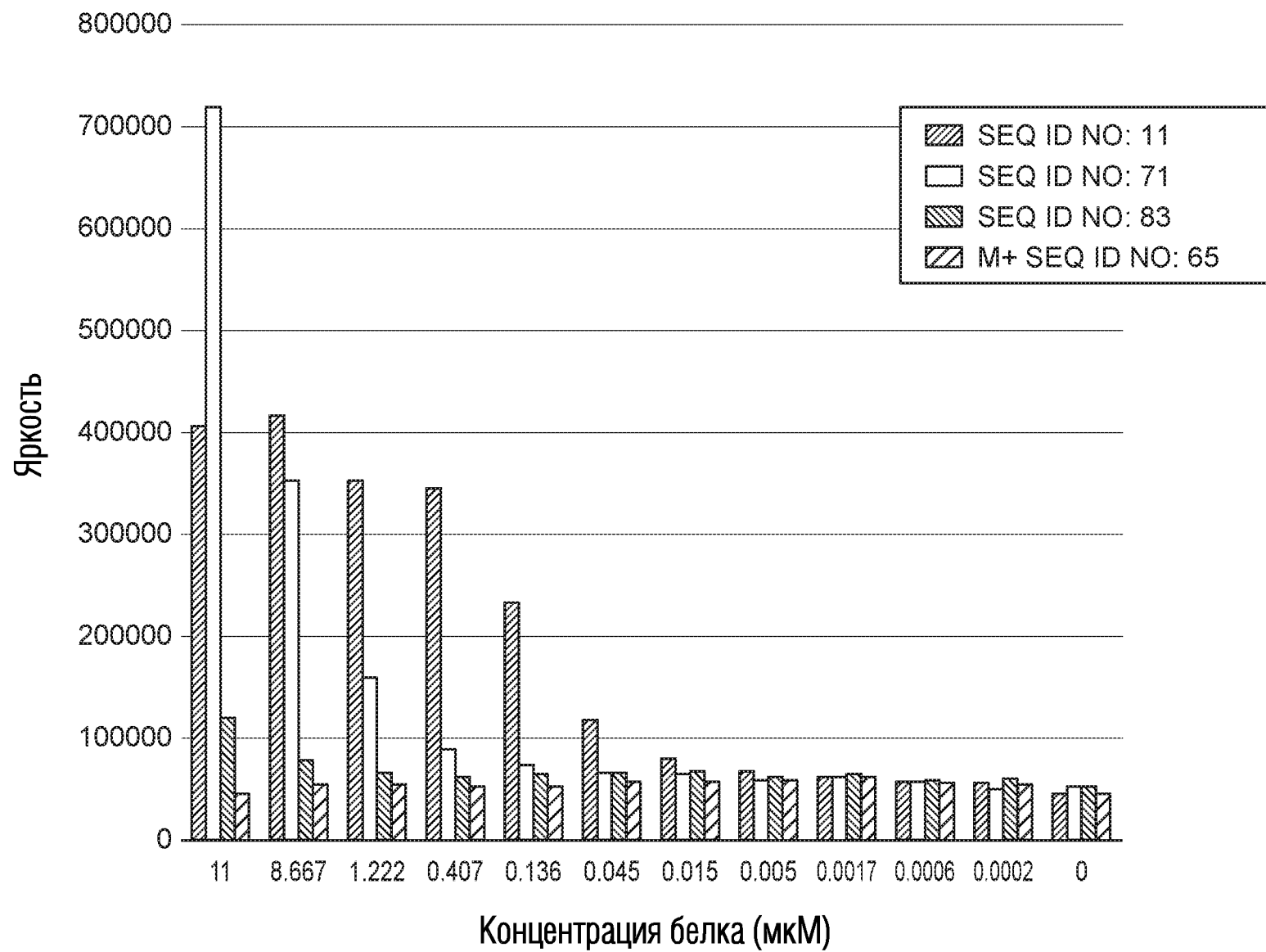
ФИГ. 22



ФИГ. 23



ФИГ. 24



ФИГ. 25