(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112105376 A
(43)申请公布日 2020.12.18

(21)申请号 201980031164.1

(22)申请日 2019.03.08

(30)优先权数据
62/640,188 2018.03.08 US
62/640,194 2018.03.08 US
62/640,168 2018.03.08 US
62/756,889 2018.11.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/021474 2019.03.08

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/173787 EN 2019.09.12

(71)申请人 应用分子运输公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 刘可伊 茱莉亚·道恩·麦基 冯卫军 托马斯·卡尔·亨特 兰德尔·J·米斯尼

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 武晶晶

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

权利要求书19页 说明书126页
序列表167页 附图41页

(54)发明名称

用于经口递送的毒素衍生的递送构建体

(57)摘要

本公开涉及隔离性非天然存在的递送构建体,所述递送构建体包含与生物活性治疗性货物偶联的细菌毒素衍生的递送构建体;其中所述递送构建体能够经由胞吞转运而将生物活性货物递送穿过上皮细胞;并且其中所述递送构建体不包含细菌毒素衍生的易位结构域或细菌毒素衍生的催化(细胞毒性)结构域。

CN 112105376 A

1.一种隔离性递送构建体,包含:

携带体,所述携带体衍生自外毒素的结构域I并且缺乏所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III;

异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物。

2.根据权利要求1所述的递送构建体,其中所述携带体基本上由所述外毒素的所述结构域I组成。

3.根据权利要求1至2中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述递送构建体根据以下中的一项或多项来递送所述异源性货物:

经由胞吞转运而递送穿过上皮细胞;

递送到所述上皮细胞的基底侧;

递送到所述上皮细胞内的核上区域;或者

经由胞吞而递送至所述上皮细胞的内部。

4.根据权利要求1至3中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体被构造成将异源性货物递送到上皮细胞的基底侧。

5.一种隔离性递送构建体,包含:

嵌合携带体,所述嵌合携带体包含靶向细胞内上皮的结构域;

异源性货物,所述嵌合携带体偶联到所述异源性货物。

6.一种隔离性递送构建体,包含:

嵌合携带体,所述嵌合携带体包含靶向核上上皮的结构域;

异源性货物,所述嵌合携带体偶联到所述异源性货物。

7.一种隔离性递送构建体,包含:

与异源性货物偶联的携带体,其中所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖中的一种或多种相互作用,并且没有表现出与网格蛋白或GPR78或它们的组合中的一种或多种的相互作用。

8.根据权利要求7所述的隔离性递送构建体,其中所述相互作用是选择性相互作用。

9.根据权利要求7至8中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述相互作用是pH-依赖性相互作用。

10.根据权利要求7至9中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖中的所述一种或多种的所述相互作用发生在所述上皮细胞的表面上、在上皮细胞的内部中,或者它们的组合。

11.根据权利要求1至4中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述异源性货物穿过所述上皮细胞的所述递送发生在体外从所述上皮细胞的顶端表面到基底外侧隔室。

12.根据权利要求5所述的隔离性递送构建体,其中所述异源性货物的所述递送发生在体外从所述上皮细胞的顶端表面到所述上皮细胞的内部。

13.根据权利要求6所述的隔离性递送构建体,其中所述异源性货物的所述递送发生在体外从所述上皮细胞的顶端表面到所述上皮细胞内的核上区域。

14.根据权利要求7至10中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖或它们的组合中的所述一种或多种的所述相互作用发生在体外在所述上皮细胞的顶端表面上、在所述上皮细

胞的内部中,或者它们的组合。

15.根据权利要求10至14中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述上皮细胞是极化上皮细胞。

16.根据权利要求10至15中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述极化上皮细胞是单层极化上皮细胞的部分。

17.根据权利要求10至16中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述极化上皮细胞来自啮齿动物或人。

18.根据权利要求10至17中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述极化上皮细胞来自人。

19.根据权利要求18所述的隔离性递送构建体,其中所述人极化上皮细胞是人极化肠上皮细胞。

20.根据权利要求18至19中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述人极化肠上皮细胞是Caco-2细胞。

21.根据权利要求1至4中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述异源性货物穿过所述上皮细胞的所述递送发生在体内从受试者的肠到受试者的基底外侧隔室。

22.根据权利要求5所述的隔离性递送构建体,其中所述异源性货物的所述递送发生在体内从受试者的肠到受试者的所述上皮细胞的内部。

23.根据权利要求6所述的隔离性递送构建体,其中所述异源性货物的所述递送发生在体内从受试者的肠到受试者的所述上皮细胞内的核上区域。

24.根据权利要求7至10中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和串珠蛋白聚糖或它们的组合中的所述一种或多种的所述相互作用发生在体内在受试者的所述上皮细胞的顶端表面上、在所述受试者的所述上皮细胞的内部中,或者它们的组合。

25.根据权利要求21至24中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述受试者是啮齿动物或人。

26.根据权利要求25所述的隔离性递送构建体,其中所述受试者是人并且患有以下中的一种或多种:炎症性肠病、银屑病、细菌性脓毒症、系统性红斑狼疮(SLE)、寻常型天疱疮、重症肌无力、溶血性贫血、血小板减少性紫癜、格雷夫斯病、斯耶格伦氏病、皮肌炎、桥本病、多肌炎、炎症性肠病、多发性硬化(MS)、糖尿病、类风湿性关节炎、硬皮病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、子宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑素瘤、利妥昔单抗抗性NHL或白血病、糖尿病、肥胖症、肥胖症所致的糖尿病、高血糖症、血脂异常症、高甘油三酯血症、X综合征、胰岛素抵抗、糖耐量减低(IGT)、糖尿病血脂异常症、高脂血症、生长激素缺乏症(GHD)、特纳综合征(TS)、努南综合征、普拉德-威利综合征、含身材矮小症同源框的基因(SHOX)缺陷、慢性肾功能不全,或特发性身材矮小症短肠综合征。

27.根据权利要求21至26中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述上皮细胞是极化上皮细胞。

28.根据权利要求27所述的隔离性递送构建体,其中所述极化上皮细胞是极化肠上皮细胞。

29.根据权利要求5至10中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体是小分子、多肽、适体或其组合。

30.根据权利要求29所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体是小分子。

31.根据权利要求29所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体是多肽。

32.根据权利要求31所述的隔离性递送构建体，其中所述多肽是抗体或其功能片段。

33.根据权利要求29所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体是适体。

34.根据权利要求29至33中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体衍生自外毒素。

35.根据权利要求34所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体衍生自所述外毒素的结构域I并且缺少所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III。

36.根据权利要求1至35中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中从外毒素的结构域I衍生的所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于所述外毒素的所述结构域I的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性，其中所述外毒素是Cholix毒素或假单胞菌外毒素A。

37.根据权利要求1至36中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含所述外毒素的所述结构域I的至少110个氨基酸残基。

38.根据权利要求1至37中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含所述外毒素的所述结构域I的至少50个邻接的氨基酸残基。

39.根据权利要求1至38中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中缺乏所述外毒素的所述结构域II、所述结构域Ib和所述结构域III的所述携带体包含所述外毒素的所述结构域II、所述结构域Ib或所述结构域III或其组合的部分。

40.根据权利要求39所述的隔离性递送构建体，其中所述部分包含所述外毒素的所述结构域II、所述结构域Ib或所述结构域III的氨基酸残基的至多70％。

41.根据权利要求1至40中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述外毒素是Cholix毒素。

42.根据权利要求1至41中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含：

氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性；和

来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。

43.根据权利要求42所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。

44.根据权利要求42所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含：

氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少90％序列一致性；和

来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。

45.根据权利要求42所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含：

氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少95％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少95％序列一致性；和

来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。

46.根据权利要求42所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含:

氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少99%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少99%序列一致性;和

来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。

47.根据权利要求42所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含:

氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有100%序列一致性,或相比于其功能片段具有100%序列一致性;和

来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。

48.根据权利要求47所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列或其功能片段。

49.根据权利要求47所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序列或其功能片段。

50.根据权利要求47所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列或其功能片段。

51.根据权利要求42所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任一个、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性。

52.根据权利要求51所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含空间结构,在所述空间结构中SEQ ID NO:148或SEQ ID NO:149的一个或多个氨基酸残基紧邻于SEQ ID NO:151的一个或多个氨基酸残基,并且SEQ ID NO:148或SEQ ID NO:149的一个或多个氨基酸残基紧邻于SEQ ID NO:152的一个或多个氨基酸残基。

53.根据权利要求42所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80%序列一致性。

54.根据权利要求53所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含SEQ ID NO:11的氨基酸残基1-187或1-206或者SEQ ID NO:10的氨基酸残基1-186或1-205中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。

55.根据权利要求54所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含SEQ ID NO:30的残基1-187或SEQ ID NO:31的残基1-186和SEQ ID NO:1的至多206个邻接的氨基酸残基。

56.根据权利要求53所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:31中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80%序列一致性。

57.根据权利要求53所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列或其功能片段。

58.根据权利要求42所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有

至少80％序列一致性。

59.根据权利要求58所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-151或1-187中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。

60.根据权利要求58所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体缺少SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-39或SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-38中的任何一个或多个。

61.根据权利要求58所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:70中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有80％序列一致性。

62.根据权利要求58所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含SEQ ID NO:5的残基1-151或SEQ ID NO:4的残基1-150和SEQ ID NO:1的至多187个邻接的氨基酸残基。

63.根据权利要求58所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:107中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。

64.根据权利要求58所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或其功能片段。

65.根据权利要求42所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。

66.根据权利要求65所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含SEQ ID NO:6的氨基酸残基1-150中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变，或SEQ ID NO:7的氨基酸残基1-151中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。

67.根据权利要求65所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含SEQ ID NO:5的残基1-134或SEQ ID NO:4的残基1-133和SEQ ID NO:1的至多151个邻接的氨基酸残基。

68.根据权利要求65所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106-SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。

69.根据权利要求65所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或其功能片段。

70.根据权利要求1至69中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述隔离性递送构建体包含至少一个但至多20个β链。

71.根据权利要求41所述的隔离性递送构建体，其中所述递送构建体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156或SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:165中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。

72.根据权利要求1至42中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述外毒素是假单胞菌外毒素A。

73.根据权利要求72所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列具有至少80％一致性，或相比于其功能片

段具有至少80%一致性。

74.根据权利要求73所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含SEQ ID NO:137的氨基酸残基1-252中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。

75.根据权利要求73所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少95%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少95%序列一致性。

76.根据权利要求73所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少99%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少99%序列一致性。

77.根据权利要求73所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有100%序列一致性,或相比于其功能片段具有100%序列一致性。

78.根据权利要求72至73中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含来自SEQ ID NO:134的至多252个邻接的氨基酸残基。

79.根据权利要求72至73中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含SEQ ID NO:134的残基1-252。

80.根据权利要求1至79中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体进一步包含至少一个N-末端甲硫氨酸残基。

81.根据权利要求80所述的隔离性递送构建体,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有80%序列一致性。

82.根据权利要求1至81中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述递送构建体形成多聚体。

83.根据权利要求82所述的隔离性递送构建体,其中所述多聚体通过所述异源性货物的多聚化而形成。

84.根据权利要求82至83中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述多聚体是异聚体或同聚体。

85.根据权利要求84所述的隔离性递送构建体,其中所述同聚体是同二聚体。

86.根据权利要求84至85中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述同二聚体通过所述异源性货物的二聚化而形成。

87.一种隔离性递送构建体,包含:

携带体,所述携带体包含第一部分和第二部分,其中所述第一部分衍生自第一外毒素并且所述第二部分衍生自第二外毒素;

异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物。

88.根据权利要求87所述的隔离性递送构建体,其中所述第一外毒素是Cholix。

89.根据权利要求87至88中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述第二外毒素是PE。

90.根据权利要求87至89中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述第一部分衍

生自Cholix的结构域I、结构域II、结构域Ib或结构域III或其任何组合。

91.根据权利要求87至90中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述第一部分包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:125或SEQ ID NO:133中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80％序列一致性。

92.根据权利要求87至91中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述第一部分包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80％序列一致性。

93.根据权利要求87至92中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述第一部分包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80％序列一致性。

94.根据权利要求87至93中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述第二部分衍生自PE的结构域I、结构域II、结构域Ib或结构域III或其任何组合。

95.根据权利要求87至94中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述第二部分包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:145中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80％序列一致性。

96.根据权利要求87至95中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述第一部分被化学偶联或被重组偶联到所述第二部分。

97.根据权利要求87至96中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述第一部分被直接或间接地偶联到所述第二部分。

98.根据权利要求87至97中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:146或SEQ ID NO:147的氨基酸序列具有至少80％序列一致性。

99.根据权利要求1至98中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体被化学偶联或被重组偶联到所述异源性货物。

100.根据权利要求1至99中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体被共价偶联到所述异源性货物。

101.根据权利要求1至100中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述异源性货物被偶联到所述携带体的C-末端。

102.根据权利要求1至101中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述异源性货物被偶联到所述携带体的N-末端。

103.根据权利要求1至102中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体被直接偶联到所述异源性货物。

104.根据权利要求1至103中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体被间接偶联到所述异源性货物。

105.根据权利要求104所述的隔离性递送构建体，其中所述携带体经由间隔区而被偶联到所述异源性货物。

106.根据权利要求105所述的隔离性递送构建体，其中所述间隔区包含氨基酸间隔区。

107.根据权利要求105至106中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述氨基酸间隔区的长度在1至50个氨基酸残基之间。

108.根据权利要求105至107中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述氨基酸间隔区包含一个或多个甘氨酸残基和一个或多个丝氨酸残基。

109.根据权利要求105至108中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述间隔区是可裂解的间隔区。

110.根据权利要求109所述的隔离性递送构建体，其中所述可裂解的间隔区包含SEQ ID NO:174-SEQ ID NO:206中的任一个中所列的氨基酸序列。

111.根据权利要求105至108中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述间隔区是不可裂解的间隔区。

112.根据权利要求111所述的隔离性递送构建体，其中所述不可裂解的间隔区包含氨基酸序列GTGGS(SEQ ID NO:207)、GGGGS(SEQ ID NO:208)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:209)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:210)或GGGGSGGG(SEQ ID NO:211)中的一个或多个。

113.根据权利要求111至112中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述不可裂解的间隔区包含(GGGGS)x(SEQ ID NO:212)中的一个或多个，其中x＝1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

114.根据权利要求111至113中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述不可裂解的间隔区包含(GS)x(SEQ ID NO:213)中的一个或多个，其中x＝1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

115.根据权利要求105至107中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述间隔区包含所述外毒素的所述结构域II、所述结构域Ib或所述结构域III的一个或多个片段，或其组合。

116.根据权利要求115所述的隔离性递送构建体，其中所述间隔区包含所述结构域II的至多80个氨基酸残基、所述结构域III的80个氨基酸残基，或其组合。

117.根据权利要求1至116中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述异源性货物是大分子、小分子、多肽、核酸、mRNA、miRNA、shRNA、siRNA、反义分子、抗体、DNA、质粒、疫苗、聚合物、纳米颗粒或催化活性材料。

118.根据权利要求1至117中的任一项所述的隔离性递送构建体，其中所述异源性货物是生物活性货物。

119.根据权利要求118所述的隔离性递送构建体，其中所述生物活性货物是细胞因子、激素、治疗性抗体、其功能片段或其任何组合。

120.根据权利要求119所述的隔离性递送构建体，其中所述细胞因子是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或IL-30。

121.根据权利要求119所述的隔离性递送构建体，其中所述细胞因子具有SEQ ID NO:217或SEQ ID NO:218中所列的氨基酸序列。

122.根据权利要求119所述的隔离性递送构建体，其中所述激素具有SEQ ID NO:215或SEQ ID NO:216中所列的氨基酸序列。

123.根据权利要求119所述的隔离性递送构建体，其中所述治疗性抗体是抗-TNFa抗

体。

124.根据权利要求123所述的隔离性递送构建体,其中所述抗-TNFa抗体是阿达木单抗或英利昔单抗。

125.根据权利要求1至117中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述异源性货物是可检测剂。

126.根据权利要求125所述的隔离性递送构建体,其中所述可检测剂是荧光团、造影剂、X-射线造影剂、正电子发射断层显像剂、纳米颗粒或放射性同位素。

127.根据权利要求125至126中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述荧光团是红色荧光蛋白(RFP)。

128.根据权利要求126至127中的任一项所述的隔离性递送构建体,其中所述RFP具有SEQ ID NO:220中所列的氨基酸序列。

129.一种药物组合物,包含:

根据权利要求1至128中的任一项所述的隔离性递送构建体;和

药学上可接受的运载体。

130.根据权利要求129所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于口服施用、局部施用、肺部施用、鼻内施用、颊部施用、舌下施用或眼部施用。

131.根据权利要求129至130中的任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于口服施用。

132.根据权利要求129至131中的任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制在胶囊或片剂中。

133.一种多核苷酸,编码根据权利要求1至128中的任一项所述的隔离性递送构建体。

134.一种载体,包含根据权利要求133所述的多核苷酸。

135.一种宿主细胞,包含表达递送构建体的载体,其中所述宿主细胞包含根据权利要求134所述的载体。

136.一种将异源性货物递送穿过上皮细胞的方法,所述方法包括:

将递送构建体施加到所述上皮细胞的顶端表面;和

以大于10^{-6}cm/sec的速率将所述递送构建体递送到所述上皮细胞的基底侧,

其中所述递送构建体包含:

携带体;

所述异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物。

137.根据权利要求136所述的方法,进一步包括在递送穿过所述上皮细胞之后将所述递送构建体从所述上皮细胞的所述基底侧释放。

138.根据权利要求136至137中的任一项所述的方法,其中所述携带体被构造成将异源性货物递送到上皮细胞的所述基底侧。

139.一种将异源性货物经由胞吞而递送到上皮细胞的内部的方法,所述方法包括:

将递送构建体施加到所述上皮细胞的顶端表面;和

将所述递送构建体经由胞吞而递送到所述上皮细胞的所述内部,

其中所述递送构建体包含:

携带体;

所述异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物。

140.一种将异源性货物经由胞吞而递送到上皮细胞内的核上区域的方法,所述方法包括:

将递送构建体施加到上皮细胞的顶端表面;和

将所述递送构建体经由胞吞而递送到所述上皮细胞内的所述核上区域,

其中所述递送构建体包含:

携带体;

所述异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物。

141.一种与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖或其组合相互作用的方法,所述方法包括:

将递送构建体施加到上皮细胞的顶端表面;和

使所述递送构建体与所述ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖或其组合相互作用,

其中所述递送构建体包含:

携带体;

异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物。

142.根据权利要求141所述的方法,其中所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖或其组合中的一种或多种相互作用,并且没有表现出与网格蛋白或GPR78或它们的组合中的一种或多种的相互作用。

143.根据权利要求141至142中的任一项所述的方法,其中所述相互作用是选择性相互作用或pH-依赖性相互作用,或其组合。

144.根据权利要求141至143中的任一项所述的方法,其中所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖中的所述一种或多种的所述相互作用发生在上皮细胞的表面上、在上皮细胞的内部中,或者它们的组合。

145.一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:

携带体;

异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物;

其中所述递送构建体能够将所述异源性货物递送到上皮细胞的内部。

146.一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:

携带体;

异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物;

其中所述递送构建体能够将所述异源性货物递送到上皮细胞内的核上区域。

147.一种诊断有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:

携带体;

异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物;

其中所述递送构建体能够将所述异源性货物递送到上皮细胞的内部。

148.一种诊断有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:

携带体;

异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物;

其中所述递送构建体能够将所述异源性货物递送到上皮细胞内的核上区域。

149.一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:

携带体,所述携带体衍生自外毒素的结构域I并且缺乏所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III;

异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物;

其中所述递送构建体能够将所述异源性货物经由胞吞转运而递送穿过上皮细胞。

150.一种诊断有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:

携带体,所述携带体衍生自外毒素的结构域I并且缺乏所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III;

异源性货物,所述携带体偶联到所述异源性货物;

其中所述递送构建体能够将所述异源性货物经由胞吞转运而递送穿过上皮细胞。

151.根据权利要求136至138中的任一项所述的方法,其中所述异源性货物穿过所述上皮细胞的所述递送发生在体外从所述上皮细胞的所述顶端表面到基底外侧隔室。

152.根据权利要求139所述的方法,其中所述异源性货物的所述递送发生在体外从所述上皮细胞的所述顶端表面到所述上皮细胞的内部。

153.根据权利要求140所述的方法,其中所述异源性货物的所述递送发生在体外从所述上皮细胞的所述顶端表面到所述上皮细胞内的核上区域。

154.根据权利要求140至144中的任一项所述的方法,其中所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖或它们的组合中的所述一种或多种的所述相互作用发生在体外在所述上皮细胞的所述顶端表面上、在所述上皮细胞的内部中,或者它们的组合。

155.根据权利要求151至154中的任一项所述的方法,其中所述上皮细胞是极化上皮细胞。

156.根据权利要求151至155中的任一项所述的方法,其中所述极化上皮细胞是单层极化上皮细胞的部分。

157.根据权利要求151至156中的任一项所述的方法,其中所述极化上皮细胞来自啮齿动物。

158.根据权利要求151至156中的任一项所述的方法,其中所述极化上皮细胞来自人。

159.根据权利要求158所述的方法,其中所述人极化上皮细胞是人极化肠上皮细胞。

160.根据权利要求159所述的方法,其中所述人极化肠上皮细胞是Caco-2细胞。

161.根据权利要求136-138中的任一项所述的方法,其中所述异源性货物穿过所述上皮细胞的所述递送发生在体内从受试者的肠到所述受试者的基底外侧隔室。

162.根据权利要求139所述的方法,其中所述异源性货物的所述递送发生在体内从受

试者的肠到所述受试者的所述上皮细胞的内部。

163.根据权利要求140所述的方法，其中所述异源性货物的所述递送发生在体内从受试者的肠到所述受试者的所述上皮细胞内的核上区域。

164.根据权利要求141至144中的任一项所述的方法，其中所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和串珠蛋白聚糖或它们的组合中的所述一种或多种的所述相互作用发生在体内在受试者的所述上皮细胞的所述顶端表面上、在所述受试者的所述上皮细胞的内部中，或者它们的组合。

165.根据权利要求145至150或161至164中的任一项所述的方法，其中所述受试者是啮齿动物或人。

166.根据权利要求145至150或161至165中的任一项所述的方法，其中所述上皮细胞是极化上皮细胞。

167.根据权利要求166所述的方法，其中所述极化上皮细胞是极化肠上皮细胞。

168.根据权利要求145至150中的任一项所述的方法，进一步包括将所述递送构建体配制用于向所述受试者施用。

169.根据权利要求168所述的方法，其中所述配制包括一种或多种药学上可接受的运载体。

170.根据权利要求168至169中的任一项所述的方法，其中所述递送构建体被配制用于口服施用、局部施用、肺部施用、鼻内施用、颊部施用、舌下施用或眼部施用。

171.根据权利要求168至170中的任一项所述的方法，其中所述组合物被配制用于口服施用。

172.根据权利要求145至150中的任一项所述的方法，其中所述疾病是炎症疾病、自身免疫性疾病、癌症、代谢疾病、脂肪肝疾病或生长激素缺乏性生长障碍。

173.根据权利要求172所述的方法，其中所述炎症疾病是炎症性肠病、银屑病或细菌性脓毒症。

174.根据权利要求173所述的方法，其中所述炎症性肠病是克罗恩病、溃疡性结肠炎、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、缺血性结肠炎、改道性结肠炎、白塞综合征或未定型结肠炎。

175.根据权利要求172所述的方法，其中所述自身免疫性疾病是系统性红斑狼疮(SLE)、寻常型天疱疮、重症肌无力、溶血性贫血、血小板减少性紫癜、格雷夫斯病、斯耶格伦氏病、皮肌炎、桥本病、多肌炎、炎症性肠病、多发性硬化(MS)、糖尿病、类风湿性关节炎或硬皮病。

176.根据权利要求172所述的方法，其中所述癌症是非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、子宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑素瘤、利妥昔单抗抗性NHL或白血病。

177.根据权利要求172所述的方法，其中所述代谢疾病是糖尿病、肥胖症、肥胖症所致的糖尿病、高血糖症、血脂异常症、高甘油三酯血症、X综合征、胰岛素抵抗、糖耐量减低(IGT)、糖尿病血脂异常症或高脂血症。

178.根据权利要求136至148中的任一项所述的方法，其中所述携带体是小分子。

179.根据权利要求136至148中的任一项所述的方法，其中所述携带体是多肽。

180.根据权利要求179所述的方法,其中所述多肽是抗体或其功能片段。

181.根据权利要求136至148中的任一项所述的方法,其中所述携带体是适体。

182.根据权利要求136至148或178至181中的任一项所述的方法,其中所述携带体衍生自外毒素。

183.根据权利要求182所述的方法,其中所述携带体衍生自所述外毒素的结构域I并且缺少所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III。

184.根据权利要求149至150或183中的任一项所述的方法,其中从外毒素的结构域I衍生的所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于所述外毒素的所述结构域I的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80%序列一致性,其中所述外毒素是Cholix毒素或假单胞菌外毒素A。

185.根据权利要求184所述的方法,其中所述携带体包含所述外毒素的所述结构域I的至少130个氨基酸残基。

186.根据权利要求184至185中的任一项所述的方法,其中所述携带体包含所述外毒素的所述结构域I的至少150个邻接的氨基酸残基。

187.根据权利要求184至186中的任一项所述的方法,其中缺乏所述外毒素的所述结构域II和所述结构域III的所述携带体包含所述外毒素的所述结构域II或所述结构域III或其组合的部分。

188.根据权利要求187所述的方法,其中所述部分包含所述外毒素的所述结构域II或所述结构域III的氨基酸残基中的至多82个氨基酸残基。

189.根据权利要求184至188中的任一项所述的方法,其中所述外毒素是Cholix毒素。

190.根据权利要求184至189中的任一项所述的方法,其中所述携带体包含:

氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80%序列一致性;和

来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。

191.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。

192.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含:

氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少90%序列一致性;和

来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。

193.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含:

氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少95%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少95%序列一致性;和

来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。

194.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含:

氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少99%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少99%序列一致性;和

来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。

195.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含:

氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有100％序列一致性，或相比于其功能片段具有100％序列一致性；和

来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。

196.根据权利要求195所述的方法，其中所述携带体包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列或其功能片段。

197.根据权利要求195所述的方法，其中所述携带体包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序列或其功能片段。

198.根据权利要求195所述的方法，其中所述携带体包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列或其功能片段。

199.根据权利要求190所述的方法，其中所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段或其任何组合具有至少80％序列一致性。

200.根据权利要求190所述的方法，其中所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。

201.根据权利要求190所述的方法，其中所述携带体包含SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-187或1-206中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变，或者SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-186或1-205中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。

202.根据权利要求190所述的方法，其中所述携带体包含SEQ ID NO:5的残基1-187或SEQ ID NO:4的残基1-186和SEQ ID NO:1的至多206个邻接的氨基酸残基。

203.根据权利要求190所述的方法，其中所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:31中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。

204.根据权利要求190所述的方法，其中所述携带体包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列或其功能片段。

205.根据权利要求190所述的方法，其中所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。

206.根据权利要求190所述的方法，其中所述携带体包含SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-151或1-187中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变，或SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-150或1-186中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。

207.根据权利要求190所述的方法，其中所述携带体缺少SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-39或SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-38中的任何一个或多个。

208.根据权利要求207所述的方法，其中所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:70中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有80％序列一致性。

209.根据权利要求190所述的方法，其中所述携带体包含SEQ ID NO:5的残基1-151或

SEQ ID NO:4的残基1-150和SEQ ID NO:1的至多187个邻接的氨基酸残基。

210.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:107中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80%序列一致性。

211.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或其功能片段。

212.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80%序列一致性。

213.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-151中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变,或SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-150中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。

214.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含SEQ ID NO:5的残基1-134或SEQ ID NO:4的残基1-133和SEQ ID NO:1的至多151个邻接的氨基酸残基。

215.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106-SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80%序列一致性。

216.根据权利要求190所述的方法,其中所述携带体包含SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或其功能片段。

217.根据权利要求206-216中的任一项所述的方法,其中所述携带体包含至少一个但至多20个β链。

218.根据权利要求182所述的方法,其中所述递送构建体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156或SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:165中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80%序列一致性。

219.根据权利要求184-188中的任一项所述的方法,其中所述外毒素是假单胞菌外毒素A。

220.根据权利要求219所述的方法,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列具有至少80%一致性,或相比于其功能片段具有至少80%一致性。

221.根据权利要求220所述的方法,其中所述携带体包含SEQ ID NO:137的氨基酸残基1-252中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。

222.根据权利要求220所述的方法,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少95%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少95%序列一致性。

223.根据权利要求220所述的方法,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少99%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少99%序列一致性。

224.根据权利要求220所述的方法,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有100%序列一致性,或相比于其功能片段具有100%序列一致性。

225.根据权利要求220所述的方法,其中所述携带体包含SEQ ID NO:135的残基1-252。

226.根据权利要求136至148中的任一项所述的方法,其中所述携带体包含第一部分和第二部分,其中所述第一部分衍生自第一外毒素并且所述第二部分衍生自第二外毒素。

227.根据权利要求226所述的方法,其中所述第一外毒素是Cholix并且所述第二外毒素是PE。

228.根据权利要求226至227中的任一项所述的方法,其中所述第一部分衍生自Cholix的结构域I、结构域II、结构域Ib或结构域III或其任何组合。

229.根据权利要求226至228中的任一项所述的方法,其中所述第一部分包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:125中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性。

230.根据权利要求226至229中的任一项所述的方法,其中所述第一部分包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性。

231.根据权利要求226至230中的任一项所述的方法,其中所述第一部分包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性。

232.根据权利要求226至231中的任一项所述的方法,其中所述第二部分衍生自PE的结构域I、结构域II、结构域Ib或结构域III或其任何组合。

233.根据权利要求226至232中的任一项所述的方法,其中所述第二部分包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:145中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性。

234.根据权利要求226至233中的任一项所述的方法,其中所述第一部分被化学偶联或被重组偶联到所述第二部分。

235.根据权利要求226至234中的任一项所述的方法,其中所述第一部分被直接或间接地偶联到所述第二部分。

236.根据权利要求226至234中的任一项所述的方法,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:146或SEQ ID NO:147的氨基酸序列具有至少80%序列一致性。

237.根据权利要求183至236中的任一项所述的方法,其中所述携带体进一步包含至少一个N-末端甲硫氨酸残基。

238.根据权利要求237所述的方法,其中所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有80%序列一致性。

239.根据权利要求136至238中的任一项所述的方法,其中所述递送构建体形成多聚

体。

240.根据权利要求239所述的方法,其中所述多聚体通过所述异源性货物的多聚化而形成。

241.根据权利要求239至240中的任一项所述的方法,其中所述多聚体是异聚体或同聚体。

242.根据权利要求241所述的方法,其中所述同聚体是同二聚体。

243.根据权利要求239至242中的任一项所述的方法,其中所述同二聚体通过所述异源性货物的二聚化而形成。

244.根据权利要求136至243中的任一项所述的方法,其中所述携带体被化学偶联或被重组偶联到所述异源性货物。

245.根据权利要求136至244中的任一项所述的方法,其中所述携带体被共价偶联到所述异源性货物。

246.根据权利要求183至237中的任一项所述的方法,其中所述异源性货物被偶联到所述携带体的C-末端。

247.根据权利要求183至237中的任一项所述的方法,其中所述异源性货物被偶联到所述携带体的N-末端。

248.根据权利要求136至247中的任一项所述的方法,其中所述携带体被直接偶联到所述异源性货物。

249.根据权利要求136至247中的任一项所述的方法,其中所述携带体被间接偶联到所述异源性货物。

250.根据权利要求249所述的方法,其中所述携带体经由间隔区而被偶联到所述异源性货物。

251.根据权利要求250所述的方法,其中所述间隔区包含氨基酸间隔区。

252.根据权利要求251所述的方法,其中所述氨基酸间隔区包含一个或多个甘氨酸残基和一个或多个丝氨酸残基。

253.根据权利要求250至251中的任一项所述的方法,其中所述氨基酸间隔区的长度在1至50个氨基酸残基之间。

254.根据权利要求251至253中的任一项所述的方法,其中所述间隔区是可裂解的间隔区。

255.根据权利要求254所述的方法,其中所述可裂解的间隔区包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:174-SEQ ID NO:206中所列的氨基酸序列。

256.根据权利要求251至253中的任一项所述的方法,其中所述间隔区是不可裂解的间隔区。

257.根据权利要求256所述的方法,其中所述不可裂解的间隔区包含氨基酸序列GTGGS(SEQ ID NO:207)、GGGGS(SEQ ID NO:208)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:209)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:210)或GGGGSGGG(SEQ ID NO:211)中的一个或多个。

258.根据权利要求256至257中的任一项所述的方法,其中所述不可裂解的间隔区包含(GGGGS)x(SEQ ID NO:212)中的一个或多个,其中x=1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

259.根据权利要求256至258中的任一项所述的方法,其中所述不可裂解的间隔区包含

(GS)x(SEQ ID NO:213)中的一个或多个,其中x=1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

260.根据权利要求251至253中的任一项所述的方法,其中所述间隔区包含所述外毒素的所述结构域II、结构域Ib或所述结构域III的一个或多个片段,或其组合。

261.根据权利要求260所述的方法,其中所述间隔区包含所述结构域II的至多82个氨基酸残基、所述结构域III的82个氨基酸残基,或其组合。

262.根据权利要求136至261中的任一项所述的方法,其中所述异源性货物是大分子、小分子、多肽、核酸、mRNA、miRNA、shRNA、siRNA、反义分子、抗体、DNA、质粒、疫苗、聚合物、纳米颗粒或催化活性材料。

263.根据权利要求136至262中的任一项所述的方法,其中所述异源性货物是生物活性货物。

264.根据权利要求263所述的方法,其中所述生物活性货物是细胞因子、激素、治疗性抗体、它们的功能片段,或它们的任何组合。

265.根据权利要求264所述的方法,其中所述细胞因子是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或IL-30。

266.根据权利要求264至265中的任一项所述的方法,其中所述细胞因子具有在SEQ ID NO:217或SEQ ID NO:218中所列的氨基酸序列。

267.根据权利要求264所述的方法,其中所述激素具有在SEQ ID NO:215或SEQ ID NO:216中所列的氨基酸序列。

268.根据权利要求264所述的方法,其中所述治疗性抗体是抗-TNFa抗体。

269.根据权利要求268所述的方法,其中所述抗-TNFa抗体是阿达木单抗或英利昔单抗。

270.根据权利要求136至262中的任一项所述的方法,其中所述异源性货物是可检测剂。

271.根据权利要求270所述的方法,其中所述可检测剂是荧光团、造影剂、X-射线造影剂、正电子发射断层显像剂、纳米颗粒或放射性同位素。

272.根据权利要求270至271中的任一项所述的方法,其中所述荧光团是红色荧光蛋白(RFP)。

273.根据权利要求272所述的方法,其中所述RFP具有在SEQ ID NO:220中所列的氨基酸序列。

274.本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或防止有此需要的受试者中的炎症疾病的药物的用途。

275.本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或防止有此需要的受试者中的自身免疫性疾病的药物的用途。

276.本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或防止有此需要的受试者中的癌症的药物的用途。

277.本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或防止有此需要的受试者中的代谢障碍的药物的用途。

278.本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或防止有此需要

的受试者中的脂肪肝疾病的药物的用途。

279.本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或防止有此需要的受试者中的生长激素缺乏性生长障碍的药物的用途。

用于经口递送的毒素衍生的递送构建体

交叉引用

[0001] 本申请要求2018年3月8日提交的美国临时申请第62/640,168号、2018年3月8日提交的第62/640,188号以及3月8日提交的第62/640,194号的权益,所述临时申请通过援引以其整体并入本文中用于所有目的。

序列表

[0002] 本申请包含“纸质副本”形式的序列表(PDF文件)以及本文中递交的包含计算机可读形式(ST25格式文本文件)的参考序列(SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:221)的文件。该序列表是利用氨基酸的标准三字母编码来示出,如37C.F.R.1.822中定义。在2019年3月8日创建的所述ASCII副本被命名为40566-711_601_SL.txt并且大小是350,816字节。

背景技术

[0003] 肠上皮已阻碍经口施用大分子生物制剂的尝试,因为蛋白质并不能扩散穿过该屏障且不能逸漏穿过紧密连接。当蛋白质通过胞吞—留给它们的唯一路径—而被获取时,它们通常在溶酶体中被降解,而不是被运输到体内。这种无法容易地被穿过肠上皮吸收仍然是在开发这些试剂的商业上可行的口服制剂时的限制因素。最普遍的解决方案是使用全身施用,但是这可能经常产生相当多的副作用并且减少患者便利性,由此负面地影响顺应性。

援引并入

[0004] 本文中公开的所有引用文件通过援引以其整体并入本文中用于所有目的。

发明内容

[0005] 本公开提供方法和组合物以便在体外或在体内(例如在啮齿动物或人中)将货物(cargo)分子运输和/或递送到细胞内的某(些)位置(例如核上的位置)或者穿过细胞(例如上皮细胞)。这种货物可以通过将其偶联到携带体(carrier)分子而被导向一系列位置。这种携带体分子可以在细胞表面上和在细胞内与特有的受体相互作用以便靶向递送货物。在本文中描述了各种这类携带体、货物及其用途。

[0006] 本公开提供隔离性递送构建体,其可以包含携带体,所述携带体衍生自外毒素的结构域I并且缺乏外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III;偶联到异源性货物。所述携带体可以基本上由外毒素的结构域I组成。所述递送构建体可以根据以下中的一项或多项来递送异源性货物:经由胞吞转运而递送穿过上皮细胞;递送到上皮细胞的基底侧;递送到上皮细胞内的核上区域;或者经由胞吞而递送到上皮细胞的内部。在一些方面,所述携带体被构造成将异源性货物递送到上皮细胞的基底侧。

[0007] 本公开提供一种隔离性递送构建体,其可以包含:嵌合携带体,所述嵌合携带体包含靶向细胞内上皮的结构域;异源性货物,所述嵌合携带体偶联到所述异源性货物。

[0008] 本公开提供一种隔离性递送构建体,其可以包含:嵌合携带体,所述嵌合携带体包含靶向核上上皮的结构域;异源性货物,所述嵌合携带体偶联到所述异源性货物。

[0009] 本公开提供一种隔离性递送构建体,其可以包含:与异源性货物偶联的携带体,其

中所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖中的一种或多种相互作用，并且没有表现出与网格蛋白或GPR78或它们的组合中的一种或多种的相互作用。所述相互作用可以是选择性相互作用。所述相互作用可以是pH-依赖性相互作用。所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖中的一种或多种的相互作用可以发生在上皮细胞的表面上、在上皮细胞的内部中，或者它们的组合。所述异源性货物穿过上皮细胞的递送可以发生在体外从所述上皮细胞的顶端表面到基底外侧隔室。所述异源性货物的递送可以发生在体外从所述上皮细胞的顶端表面到所述上皮细胞的内部。所述异源性货物的递送可以发生在体外从所述上皮细胞的顶端表面到所述上皮细胞内的核上区域。所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖或它们的组合中的一种或多种的相互作用可以发生在体外在所述上皮细胞的顶端表面上、在所述上皮细胞的内部中，或者它们的组合。所述上皮细胞可以是极化上皮细胞。所述极化上皮细胞可以是单层极化上皮细胞的部分。所述极化上皮细胞可以来自啮齿动物或人。所述极化上皮细胞可以来自人。所述人极化上皮细胞可以是人极化肠上皮细胞。所述人极化肠上皮细胞可以是Caco-2细胞。所述异源性货物穿过上皮细胞的递送可以发生在体内从受试者的肠到受试者的基底外侧隔室。所述异源性货物的递送可以发生在体内从受试者的肠到受试者的上皮细胞的内部。所述异源性货物的递送可以发生在体内从受试者的肠到受试者的上皮细胞内的核上区域。所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和串珠蛋白聚糖或它们的组合中的一种或多种的相互作用可以发生在体内在受试者的上皮细胞的顶端表面上、在所述受试者的上皮细胞的内部中，或者它们的组合。所述受试者可以是啮齿动物或人。所述受试者可以是人并且患有以下中的一种或多种：炎症性肠病、银屑病、细菌性脓毒症、系统性红斑狼疮(SLE)、寻常型天疱疮、重症肌无力、溶血性贫血、血小板减少性紫癜、格雷夫斯病、斯耶格伦氏病、皮肌炎、桥本病、多肌炎、炎症性肠病、多发性硬化(MS)、糖尿病、类风湿性关节炎、硬皮病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、急性淋成巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、子宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑素瘤、利妥昔单抗抗性NHL或白血病、糖尿病、肥胖症、肥胖症所致的糖尿病、高血糖症、血脂异常症、高甘油三酯血症、X综合征、胰岛素抵抗、糖耐量减低(IGT)、糖尿病血脂异常症、高脂血症、生长激素缺乏症(GHD)、特纳综合征(TS)、努南综合征、普拉德-威利综合征、含身材矮小症同源框的基因(SHOX)缺陷、慢性肾功能不全，或特发性身材矮小症短肠综合征。所述上皮细胞可以是极化上皮细胞。所述极化上皮细胞可以是极化肠上皮细胞。所述携带体可以是小分子、多肽、适体或其组合。所述携带体可以是小分子。所述携带体可以是多肽。所述多肽可以抗体或其功能片段。所述携带体可以是适体。所述携带体可以衍生自外毒素。所述携带体可以衍生自所述外毒素的结构域I并且缺少所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III。可以从外毒素的结构域I衍生的携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于所述外毒素的所述结构域I的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性，其中所述外毒素是Cholix毒素或假单胞菌外毒素A。在一些方面，所述携带体包含所述外毒素的结构域I的至少110个氨基酸残基。在一些方面中，所述携带体包含所述外毒素的结构域I的至少50个邻接的氨基酸残基。缺乏所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III的携带体可以包含所述外毒素的所述结构域II、所述结构域Ib或所述结构域III或其

组合的部分。所述部分可以包含所述外毒素的所述结构域II、所述结构域Ib或所述结构域III的氨基酸残基的至多70％。所述外毒素可以是Cholix毒素。所述携带体可以包含:氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性;以及来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。所述携带体可以包含:氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少90％序列一致性;以及来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含:氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少95％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少95％序列一致性;以及来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含:氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少99％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少99％序列一致性;以及来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含:氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有100％序列一致性,或相比于其功能片段具有100％序列一致性;以及来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体可以包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体可以包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段或其任何组合具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含空间结构,在所述空间结构中SEQ ID NO:148或SEQ ID NO:149的一个或多个氨基酸残基紧邻于SEQ ID NO:151的一个或多个氨基酸残基,并且SEQ ID NO:148或SEQ ID NO:149的一个或多个氨基酸残基紧邻于SEQ ID NO:152的一个或多个氨基酸残基。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:11的氨基酸残基1-187或1-206或者SEQ ID NO:10的氨基酸残基1-186或1-205中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。所述携带体可以包含SEQ ID NO:30的残基1-187或SEQ ID NO:31的残基1-186和SEQ ID NO:1的至多206个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:31中的任何一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-151或1-187中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。所述携带体可以缺少SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-39或SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-38中的任何一个或多个。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ

ID NO:69或SEQ ID NO:70中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:5的残基1-151或SEQ ID NO:4的残基1-150和SEQ ID NO:1的至多187个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:107中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:6的氨基酸残基1-150中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变，或SEQ ID NO:7的氨基酸残基1-151中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。所述携带体可以包含SEQ ID NO:5的残基1-134或SEQ ID NO:4的残基1-133和SEQ ID NO:1的至多151个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106-SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体或隔离性递送构建体可以包含至少一个但至多20个β链。所述外毒素可以是假单胞菌外毒素A。所述携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列具有至少80％一致性，或相比于其功能片段具有至少80％一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:137的氨基酸残基1-252中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。所述携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少90％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少90％序列一致性。所述携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少95％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少95％序列一致性。所述携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少99％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少99％序列一致性。所述携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有100％序列一致性，或相比于其功能片段具有100％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:134的至多252个邻接的氨基酸残基。在一些方面中，所述携带体包含SEQ ID NO:134的残基1-252。所述携带体可以包含至少一个N-末端甲硫氨酸残基。所述携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有80％序列一致性。所述递送构建体可以形成多聚体。所述多聚体可以通过所述异源性货物的多聚化而形成。所述多聚体可以是异聚体或同聚体。所述同聚体可以是同二聚体。所述同二聚体可以通过所述异源性货物的二聚化而形成。

[0010] 本公开提供一种隔离性递送构建体，其可以包含：携带体，所述携带体包含第一部分和第二部分，其中所述第一部分衍生自第一外毒素并且所述第二部分衍生自第二外毒素；所述携带体偶联到异源性货物。所述第一外毒素可以是Cholix。所述第二外毒素可以是PE。所述第一部分可以衍生自Cholix的结构域I、结构域II、结构域Ib或结构域III或其任何组合。所述第一部分可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:1-SEQ ID

NO:125或SEQ ID NO:133中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80％序列一致性。所述第一部分可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80％序列一致性。所述第一部分可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80％序列一致性。所述第二部分可以衍生自PE的结构域I、结构域II、结构域Ib或结构域III或其任何组合。所述第二部分可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:145中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80％序列一致性。所述第一部分可以被化学偶联或被重组偶联到所述第二部分。所述第一部分可以被直接或间接地偶联到所述第二部分。所述携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:146或SEQ ID NO:147的氨基酸序列具有至少80％序列一致性。所述携带体可以被化学偶联或被重组偶联到所述异源性货物。所述携带体可以被共价偶联到所述异源性货物。所述异源性货物可以被偶联到所述携带体的C-末端。所述异源性货物可以被偶联到所述携带体的N-末端。所述携带体可以被直接偶联到所述异源性货物。所述携带体可以被间接偶联到所述异源性货物。所述携带体可以经由间隔区而被偶联到所述异源性货物。所述间隔区可以包含氨基酸间隔区。所述氨基酸间隔区的长度可以在1至50个氨基酸残基之间。所述氨基酸间隔区可以包含一个或多个甘氨酸残基和一个或多个丝氨酸残基。所述间隔区可以是可裂解的间隔区。所述可裂解的间隔区可以包含SEQ ID NO:174-SEQ ID NO:206中的任一个所列的氨基酸序列。所述间隔区可以是不可裂解的间隔区。所述不可裂解的间隔区可以包含氨基酸序列GTGGS(SEQ ID NO:207)、GGGGS(SEQ ID NO:208)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:209)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:210)或GGGGSGGG(SEQ ID NO:211)中的一个或多个。所述不可裂解的间隔区可以包含(GGGGS)x(SEQ ID NO:212)中的一个或多个，其中x＝1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。所述不可裂解的间隔区可以包含(GS)x(SEQ ID NO:213)中的一个或多个，其中x＝1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。所述间隔区可以包含所述外毒素的结构域II、结构域Ib或结构域III的一个或多个片段，或其组合。所述间隔区可以包含所述结构域II的至多80个氨基酸残基、所述结构域III的80个氨基酸残基，或其组合。所述异源性货物可以是大分子、小分子、多肽、核酸、mRNA、miRNA、shRNA、siRNA、反义分子、抗体、DNA、质粒、疫苗、聚合物、纳米颗粒或催化活性材料。所述异源性货物可以是生物活性货物。所述生物活性货物可以是细胞因子、激素、治疗性抗体、其功能片段或其任何组合。所述细胞因子可以是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或IL-30。所述细胞因子可以具有SEQ ID NO:217或SEQ ID NO:218中所列的氨基酸序列。所述激素可以具有SEQ ID NO:215或SEQ ID NO:216中所列的氨基酸序列。所述治疗性抗体可以是抗-TNFa抗体。所述抗-TNFa抗体可以是阿达木单抗或英利昔单抗。所述异源性货物可以是可检测剂。所述可检测剂可以是荧光团、造影剂、X-射线造影剂、正电子发射断层显像剂、纳米颗粒或放射性同位素。所述荧光团可以是红色荧光蛋白(RFP)。所述RFP可以具有SEQ ID NO:220中所列的氨基酸序列。

[0011] 本公开的递送构建体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:

155、SEQ ID NO:156或SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:165中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。本公开的递送构建体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156或SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:165中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少90％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少90％序列一致性。本公开的递送构建体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156或SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:165中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少95％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少95％序列一致性。本公开的递送构建体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156或SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:165中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少99％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少99％序列一致性。本公开的递送构建体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156或SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:165中的任一个中所列的氨基酸序列具有100％序列一致性，或相比于其功能片段具有100％序列一致性。

[0012] 本公开提供一种药物组合物，所述药物组合物包含：如本文中所述的隔离性递送构建体；以及药学上可接受的运载体。所述组合物可以被配制用于口服施用、局部施用、肺部施用、鼻内施用、颊部施用、舌下施用或眼部施用。所述组合物可以被配制用于口服施用。所述组合物可以被配制在胶囊或片剂中。

[0013] 本公开提供一种多核苷酸，其可以编码如本文中所述的隔离性递送构建体。

[0014] 在各种方面中，本公开提供一种载体，所述载体包含多核苷酸，所述多核苷酸编码如本文中所述的隔离性递送构建体。

[0015] 本公开提供一种宿主细胞，其可以包含载体，所述载体表达递送构建体，其中所述宿主细胞包含载体，所述载体包含多核苷酸，所述多核苷酸编码如本文中所述的隔离性递送构建体。

[0016] 本公开提供一种将异源性货物递送穿过上皮细胞的方法，所述方法可以包括：将递送构建体施加到所述上皮细胞的顶端表面；和以大于10^{-6}cm/sec的速率将所述递送构建体递送到所述上皮细胞的基底侧，其中所述递送构建体包含：携带体；所述携带体偶联到所述异源性货物。在一些方面中，所述方法进一步包括在递送穿过所述上皮细胞之后将所述递送构建体从所述上皮细胞的所述基底侧释放。在一些方面中，所述携带体被构造成将异源性货物递送到上皮细胞的所述基底侧。

[0017] 本公开提供一种将异源性货物经由胞吞而递送到上皮细胞的内部的方法，所述方法可以包括：将递送构建体施加到所述上皮细胞的顶端表面；和将所述递送构建体经由胞吞而递送到所述上皮细胞的所述内部，其中所述递送构建体包含：携带体；所述携带体偶联到所述异源性货物。

[0018] 本公开提供一种将异源性货物经由胞吞而递送到上皮细胞内的核上区域的方法，所述方法可以包括：将递送构建体施加到上皮细胞的顶端表面；和将所述递送构建体经由胞吞而递送到所述上皮细胞内的所述核上区域，其中所述递送构建体包含：携带体；所述携带体偶联到所述异源性货物。

[0019] 本公开提供一种与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖或其组合相互作用的方法，所述方法可以包括：将递送构建体施加到上皮细胞的

顶端表面;和使所述递送构建体与所述ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖或其组合相互作用,其中所述递送构建体包含:携带体;所述携带体偶联到异源性货物。所述携带体可以与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖或其组合中的一种或多种相互作用,并且没有表现出与网格蛋白或GPR78或它们的组合中的一种或多种的相互作用。所述相互作用可以是选择性相互作用或pH-依赖性相互作用,或其组合。所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖中的一种或多种的相互作用可以发生在上皮细胞的表面上、在上皮细胞的内部中,或者它们的组合。

[0020] 本公开提供一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法可以包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:携带体;所述携带体偶联到异源性货物;其中所述递送构建体能够将所述异源性货物递送到上皮细胞的内部。

[0021] 本公开提供一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法可以包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:携带体;所述携带体偶联到异源性货物;其中所述递送构建体能够将所述异源性货物递送到上皮细胞内的核上区域。

[0022] 本公开提供一种诊断有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法可以包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:携带体;所述携带体偶联到异源性货物;其中所述递送构建体能够将所述异源性货物递送到上皮细胞的内部。

[0023] 本公开提供一种诊断有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法可以包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:携带体;所述携带体偶联到异源性货物;其中所述递送构建体能够将所述异源性货物递送到上皮细胞内的核上区域。

[0024] 本公开提供一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法可以包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:携带体,所述携带体衍生自外毒素的结构域I并且缺乏所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III;所述携带体偶联到异源性货物;其中所述递送构建体能够将所述异源性货物经由胞吞转运而递送穿过上皮细胞。

[0025] 本公开提供一种诊断有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法可以包括向所述受试者施用递送构建体,所述递送构建体包含:携带体,所述携带体衍生自外毒素的结构域I并且缺乏所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III;所述携带体偶联到异源性货物;其中所述递送构建体能够将所述异源性货物经由胞吞转运而递送穿过上皮细胞。所述异源性货物穿过所述上皮细胞的递送可以发生在体外从所述上皮细胞的顶端表面到基底外侧隔室。所述异源性货物的所述递送可以发生在体外从所述上皮细胞的顶端表面到所述上皮细胞的内部。所述异源性货物的所述递送可以发生在体外从所述上皮细胞的顶端表面到所述上皮细胞内的核上区域。所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖或它们的组合中的一种或多种的相互作用可以发生在体外在所述上皮细胞的顶端表面上、在所述上皮细胞的内部中,或者它们的组合。所述上皮细胞可以是极化上皮细胞。所述极化上皮细胞可以是单层极化上皮细胞的部分。所述极化上皮细胞可以来自啮齿动物。所述极化上皮细胞可以来自人。所述人极化上皮细胞可以是人极化肠上皮细胞。所述人极化肠上皮细胞可以是Caco-2细胞。所述异源性货物穿过所述上皮细胞的递送可以发生在体内从受试者的肠到所述受试者的基底外侧隔室。所述异源性货物的递送可以发生在体内从受试者的肠到所述受试者的上皮细胞的内部。所述异源性货物的递送

可以发生在体内从受试者的肠到所述受试者的上皮细胞内的核上区域。所述携带体与ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和串珠蛋白聚糖或它们的组合中的一种或多种的相互作用可以发生在体内在受试者的上皮细胞的顶端表面上、在所述受试者的所述上皮细胞的内部中，或者它们的组合。所述受试者可以是啮齿动物或人。所述上皮细胞可以是极化上皮细胞。所述极化上皮细胞可以是极化肠上皮细胞。所述方法可以进一步包括将所述递送构建体配制用于向所述受试者施用。所述配制可以包括一种或多种药学上可接受的运载体。所述递送构建体可以被配制用于口服施用、局部施用、肺部施用、鼻内施用、颊部施用、舌下施用或眼部施用。所述组合物可以被配制用于口服施用。所述疾病可以是炎症疾病、自身免疫性疾病、癌症、代谢疾病、脂肪肝疾病或生长激素缺乏性生长障碍。所述炎症疾病可以是炎症性肠病、银屑病或细菌性脓毒症。所述炎症性肠病可以是克罗恩病、溃疡性结肠炎、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、缺血性结肠炎、改道性结肠炎、白塞综合征或未定型结肠炎。所述自身免疫性疾病可以是系统性红斑狼疮(SLE)、寻常型天疱疮、重症肌无力、溶血性贫血、血小板减少性紫癜、格雷夫斯病、斯耶格伦氏病、皮肌炎、桥本病、多肌炎、炎症性肠病、多发性硬化(MS)、糖尿病、类风湿性关节炎或硬皮病。所述癌症可以是非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、子宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑素瘤、利妥昔单抗抗性NHL或白血病。所述代谢疾病可以是糖尿病、肥胖症、肥胖症所致的糖尿病、高血糖症、血脂异常症、高甘油三酯血症、X综合征、胰岛素抵抗、糖耐量减低(IGT)、糖尿病血脂异常症或高脂血症。所述携带体可以是小分子。所述携带体可以是多肽。所述多肽可以是抗体或其功能片段。所述携带体可以是适体。所述携带体可以衍生自外毒素。所述携带体可以衍生自所述外毒素的结构域I并且缺少所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III。可从外毒素的结构域I衍生的携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于所述外毒素的所述结构域I的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性，其中所述外毒素是Cholix毒素或假单胞菌外毒素A。所述携带体可以包含所述外毒素的所述结构域I的至少130个氨基酸残基。所述携带体可以包含所述外毒素的所述结构域I的至少150个邻接的氨基酸残基。缺乏所述外毒素的结构域II和结构域III的携带体可以包含所述外毒素的所述结构域II或所述结构域III或其组合的部分。所述部分包含所述外毒素的所述结构域II或所述结构域III的氨基酸残基中的至多82个氨基酸残基。所述外毒素可以是Cholix毒素。所述携带体可以包含：氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性；和来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。所述携带体可以包含：氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少90％序列一致性；和来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含：氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少95％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少95％序列一致性；和来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含：氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少99％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少

99％序列一致性;和来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含:氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有100％序列一致性,或相比于其功能片段具有100％序列一致性;和来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列或其功能片段。在一些方面中,所述携带体包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体可以包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段或其任何组合具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-187或1-206中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变,或者SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-186或1-205中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。所述携带体可以包含SEQ ID NO:5的残基1-187或SEQ ID NO:4的残基1-186和SEQ ID NO:1的至多206个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:31中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-151或1-187中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变,或SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-150或1-186中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。所述携带体可以缺少SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-39或SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-38中的任何一个或多个。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:70中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:5的残基1-151或SEQ ID NO:4的残基1-150和SEQ ID NO:1的至多187个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:107中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-151中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变,或SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-150中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。所述携带体可以包含SEQ ID NO:5的残基1-134或SEQ ID NO:4的残基1-133和SEQ ID NO:1的至多151个邻接的氨基酸残基。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106-SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。所

述携带体可以包含SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体可以包含至少一个但至多20个β链。所述外毒素可以是假单胞菌外毒素A。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列具有至少80%一致性,或相比于其功能片段具有至少80%一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:137的氨基酸残基1-252中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少90%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少90%序列一致性。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少95%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少95%序列一致性。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少99%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少99%序列一致性。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有100%序列一致性,或相比于其功能片段具有100%序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:135的残基1-252。所述携带体可以包含第一部分和第二部分,其中所述第一部分衍生自第一外毒素并且所述第二部分衍生自第二外毒素。所述第一外毒素可以是Cholix并且所述第二外毒素可以是PE。所述第一部分可以衍生自Cholix的结构域I、结构域II、结构域Ib或结构域III或其任何组合。所述第一部分可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:125中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性。所述第一部分可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性。所述第一部分可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性。所述第二部分可以衍生自PE的结构域I、结构域II、结构域Ib或结构域III或其任何组合。所述第二部分可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:145中所列氨基酸序列中的任一个氨基酸序列、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性。所述第一部分可以被化学偶联或被重组偶联到所述第二部分。所述第一部分可以被直接或间接地偶联到所述第二部分。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:146或SEQ ID NO:147的氨基酸序列具有至少80%序列一致性。所述携带体可以进一步包含至少一个N-末端甲硫氨酸残基。所述携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有80%序列一致性。所述递送构建体可以形成多聚体。所述多聚体可以通过所述异源性货物的多聚化而形成。所述多聚体可以是异聚体或同聚体。所述同聚体可以是同二聚体。所述同二聚体可以通过所述异源性货物的二聚化而形成。所述携带体可以被化学偶联或被重组偶联到所述异源性货物。所述携带体可以被共价偶联到所述异源性货物。所述异源性货物可以被偶联到所述携带体的C-末端。所述异源性货物可以被偶联到所述携带体的N-末端。所述携带体可以被直接偶联到所述异源性货物。所述携带体可以被间接偶联到所述异源性货物。所述携带体可以经由间隔区而被偶联到所述异源性货物。所述间隔区可以包含氨基酸间隔区。所述氨基酸间隔区可

以包含一个或多个甘氨酸残基和一个或多个丝氨酸残基。所述氨基酸间隔区的长度可以在1至50个氨基酸残基之间。所述间隔区可以是可裂解的间隔区。所述可裂解的间隔区可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:174-SEQ ID NO:206中所列的氨基酸序列。所述间隔区可以是不可裂解的间隔区。所述不可裂解的间隔区可以包含氨基酸序列GTGGS(SEQ ID NO:207)、GGGGS(SEQ ID NO:208)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:209)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:210)或GGGGSGGG(SEQ ID NO:211)中的一个或多个。所述不可裂解的间隔区可以包含(GGGGS)x(SEQ ID NO:212)中的一个或多个，其中x＝1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。所述不可裂解的间隔区可以包含(GS)x(SEQ ID NO:213)中的一个或多个，其中x＝1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。所述间隔区可以包含所述外毒素的结构域II、结构域Ib或结构域III的一个或多个片段，或其组合。所述间隔区可以包含所述结构域II的至多82个氨基酸残基、所述结构域III的82个氨基酸残基，或其组合。所述异源性货物可以是大分子、小分子、多肽、核酸、mRNA、miRNA、shRNA、siRNA、反义分子、抗体、DNA、质粒、疫苗、聚合物、纳米颗粒或催化活性材料。所述异源性货物可以是生物活性货物。所述生物活性货物可以是细胞因子、激素、治疗性抗体、它们的功能片段，或它们的任何组合。所述细胞因子可以是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或IL-30。所述细胞因子可以具有在SEQ ID NO:217或SEQ ID NO:218中所列的氨基酸序列。所述激素可以具有在SEQ ID NO:215或SEQ ID NO:216中所列的氨基酸序列。所述治疗性抗体可以是抗-TNFa抗体。所述抗-TNFa抗体可以是阿达木单抗或英利昔单抗。所述异源性货物可以是可检测剂。所述可检测剂可以是荧光团、造影剂、X-射线造影剂、正电子发射断层显像剂、纳米颗粒或放射性同位素。所述荧光团可以是红色荧光蛋白(RFP)。所述RFP可以具有在SEQ ID NO:220中所列的氨基酸序列。

[0026] 本公开涉及新颖的非天然存在的递送构建体，所述递送构建体可以包含与生物活性货物偶联的细菌毒素衍生的嵌合携带体；其中所述嵌合携带体衍生自结构域I但是不包含所述细菌毒素(例如外毒素)的结构域II、结构域Ib或结构域III；并且其中所述递送构建体能够将异源性(例如生物活性)货物经由胞吞转运而递送穿过上皮细胞(例如肠上皮细胞)。

[0027] 所述携带体可以衍生自外毒素的结构域I并且能够识别肠上皮细胞的管腔(例如顶端)表面上的一种或多种受体并且与所述受体相互作用。所述受体可以是选择性或非选择性的。在一些方面中，与携带体相互作用的受体是非选择性清道夫受体或跨膜受体132(TMEM132)受体。递送构建体与存在于极化上皮细胞的顶端膜上的细胞表面受体的相互作用可以在足够的亲和力下发生以允许对所述递送构建体的胞吞。本公开的递送构建体所包含的携带体可以与本领域技术人员已知存在于上皮细胞的顶端膜上的(多种)受体结合而没有限制。在各种实施方案中，所述递送构建体的受体结合域可以结合到低密度脂蛋白受体相关的蛋白1(LRP1)或TMEM132受体。

[0028] 如本文中所述的递送构建体可以能够将异源性(例如生物活性)货物递送穿过上皮细胞，从顶端侧递送到基底外侧隔室和/或固有层。如本文中所述的递送构建体可以能够将异源性(例如生物活性)货物递送到上皮细胞(例如极化肠上皮细胞)中，例如上皮细胞的细胞内囊泡或隔室或胞质溶胶中，从而允许异源性(例如生物活性)货物积聚在上皮细胞

中。所述携带体可以衍生自外毒素的结构域I,所述外毒素选自cholix携带体(Cholix)和假单胞菌外毒素A(PE)。

[0029] 所述携带体可以是多肽,所述多肽衍生自Cholix和/或PE并且具有:至多5个氨基酸残基;至多10个氨基酸残基;至多15个氨基酸残基;至多20个氨基酸残基;至多30个氨基酸残基;至多40个氨基酸残基;至多50个氨基酸残基;至多60个氨基酸残基;至多70个氨基酸残基;至多80个氨基酸残基;至多90个氨基酸残基;至多100个氨基酸残基;至多110个氨基酸残基;至多120个氨基酸残基;至多130个氨基酸残基;至多140个氨基酸残基;至多150个氨基酸残基;至多160个氨基酸残基;至多170个氨基酸残基;至多180个氨基酸残基;至多190个氨基酸残基;至多200个氨基酸残基;至多210个氨基酸残基;至多220个氨基酸残基;至多230个氨基酸残基;至多240个氨基酸残基;至多250个氨基酸残基;至多260个氨基酸残基;和至多265个氨基酸残基。

[0030] 所述携带体可以衍生自Cholix外毒素的结构域I并且可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自:相比于SEQ ID NO:4具有大于50%同源性的氨基酸序列、相比于SEQ ID NO:4具有大于60%同源性的氨基酸序列、相比于SEQ ID NO:4具有大于70%同源性的氨基酸序列、相比于SEQ ID NO:4具有大于80%同源性的氨基酸序列、相比于SEQ ID NO:4具有大于85%同源性的氨基酸序列、相比于SEQ ID NO:4具有大于90%同源性的氨基酸序列,以及相比于SEQ ID NO:4具有大于95%同源性的氨基酸序列。在一些情况下,所述递送构建体衍生自cholix外毒素(Cholix)并且包含受体结合域多肽,所述多肽具有SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列。所述携带体可以包含相比于SEQ ID NO:4具有大于90%同源性的氨基酸序列。所述携带体可以包含相比于SEQ ID NO:4具有大于95%同源性的氨基酸序列。所述携带体可以包含受体结合域多肽,其中SEQ ID NO:4的一个或多个氨基酸残基被另一种氨基酸替代。所述携带体可以包含受体结合域多肽,所述多肽是SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列的截短部分。

[0031] 所述携带体可以衍生自假单胞菌外毒素A(PE)的结构域I并且包含多肽,所述多肽具有SEQ ID NO:137中所列的氨基酸序列。所述递送构建体可以包含相比于SEQ ID NO:137具有大于90%同源性的氨基酸序列。所述携带体可以包含相比于SEQ ID NO:137具有大于95%同源性的氨基酸序列。所述携带体可以包含受体结合域多肽,其中SEQ ID NO:137的一个或多个氨基酸残基被另一种氨基酸替代。所述携带体可以包含受体结合域多肽,所述多肽是SEQ ID NO:137中所列的氨基酸序列的截短部分。

[0032] 一种递送构建体可以包含携带体,其中所述携带体包含一种外毒素结构域I(例如Cholix或PE结构域I)的一个或多个氨基酸残基被第二外毒素结构域I(例如Cholix或PE结构域I)的一个或多个氨基酸残基替换(以下也称为杂交或嵌合携带体)。所述携带体可以包含氨基酸序列,其中SEQ ID NO:4的一个或多个氨基酸残基被SEQ ID NO:137的一个或多个氨基酸残基替换。所述携带体可以包含氨基酸序列,其中SEQ ID NO:137的一个或多个氨基酸残基被SEQ ID NO:4的一个或多个氨基酸残基替换。所述携带体可以包含氨基酸序列,其中SEQ ID NO:4的氨基酸残基77-87被第二细菌携带体的受体结合域多肽的氨基酸残基替换。所述携带体可以包含氨基酸序列,其中SEQ ID NO:4的氨基酸残基188-236被第二细菌携带体的受体结合域多肽的氨基酸残基替换。所述携带体可以包含氨基酸序列,其中SEQ ID NO:137的氨基酸残基69-71被第二细菌携带体的受体结合域多肽的氨基酸残基替换。所

述携带体可以包含氨基酸序列,其中SEQ ID NO:137的氨基酸残基177-228被第二细菌携带体的受体结合域多肽的氨基酸残基替换。

[0033] 本公开的携带体可以衍生自一种外毒素的结构域I并且可以进一步包含所述外毒素或另一种外毒素的结构域II的部分、结构域Ib的部分和/或结构域III的部分。因此,携带体可以包含一种外毒素的结构域I,或其截短的和/或修饰的变体,以及从所述外毒素或不同的外毒素的结构域II、结构域Ib和/或结构域III衍生的一个或多个部分。所述结构域II或修饰的结构域II以及结构域III或修饰的结构域III可以衍生自相同的细菌毒素。所述结构域II或修饰的结构域II以及结构域III或修饰的结构域III可以衍生自细菌携带体,所述细菌携带体选自cholix携带体(Cholix)和假单胞菌外毒素A(PE)、肉毒杆菌毒素、白喉毒素、百日咳毒素、霍乱毒素、不耐热大肠杆菌肠毒素、志贺菌毒素和志贺菌样毒素。细菌携带体(例如Cholix或PE)的毒性可以不需要转运穿过上皮层例如肠上皮。例如,如本文中所述的递送构建体可以包含与异源性货物偶联的携带体,并且其中所述携带体衍生自Cholix结构域I(例如具有SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个所列的氨基酸序列)并且进一步包含外毒素(例如Cholix和/或PE)的结构域II(例如SEQ ID NO:126或SEQ ID NO:138)、结构域Ib(例如SEQ ID NO:127或SEQ ID NO:139)和/或结构域III(例如SEQ ID NO:128或SEQ ID NO:140)的部分。

[0034] 一种递送构建体可以包含携带体、易位结构域和非毒性催化结构域,所述携带体具有衍生自SEQ ID NO:4中所列的序列的氨基酸序列,所述易位结构域具有衍生自SEQ ID NO:126中所列的序列的氨基酸序列,所述非毒性催化结构域具有衍生自SEQ ID NO:128中所列的序列的氨基酸序列。一种递送构建体可以包含:受体结合域多肽,所述多肽具有衍生自SEQ ID NO:136中所列的序列的氨基酸序列;易位结构域,所述易位结构域具有衍生自SEQ ID NO:137中所列的序列的氨基酸序列;以及非毒性催化结构域,所述非毒性催化结构域具有衍生自SEQ ID NO:139中所列的序列的氨基酸序列。所述递送构建体可以包含SEQ ID NO:146中所列的氨基酸序列。在各种实施方案中,所述递送构建体包含SEQ ID NO:147中所列的氨基酸序列。

[0035] 本公开的递送构建体可以包含与异源性货物偶联的携带体。所述异源性货物可以是生物活性货物。所述异源性货物可以是可检测剂。所述携带体可以偶联到生物活性货物以产生递送构建体,所述递送构建体能够将所述生物活性货物经由胞吞转运而递送穿过肠上皮。所述生物活性货物可以选自例如大分子、小分子、肽、多肽、核酸、mRNA、miRNA、shRNA、siRNA、反义分子、抗体、DNA、质粒、疫苗、聚合物纳米颗粒或催化活性材料。所述生物活性货物可以是酶,所述酶选自透明质酸酶、链激酶、组织纤溶酶原激活物、尿激酶或PGE-腺苷脱氨酶。所述生物活性货物可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:214、SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:216、SEQ ID NO:217、SEQ ID NO:218和SEQ ID NO:219中所列的氨基酸序列或其任何组合。

[0036] 所述递送构建体可以包含与异源性(例如生物活性)货物直接偶联的携带体。所述异源性(例如生物活性)货物可以被直接偶联到递送构建体的C-末端。所述异源性(例如生物活性)货物可以被直接偶联到递送构建体的N-末端。

[0037] 所述递送构建体可以包含与异源性(例如生物活性)货物化学偶联的携带体。所述递送构建体可以包含与异源性(例如生物活性)货物重组偶联的携带体。本公开的递送构建

体可以通过部分地合成(例如经由固相合成)或重组(例如细菌表达(例如大肠杆菌)或在哺乳动物细胞(例如CHO细胞)中)而产生。本公开的递送构建体可以通过部分地合成和部分地重组而产生。

[0038] 所述递送构建体可以包含通过可裂解的间隔区而与生物活性货物偶联的递送构建体。所述间隔区可以被存在于极化上皮细胞的基底外侧膜处的酶裂解。所述间隔区可以被存在于原生质中的酶裂解。所述可裂解的间隔区可以包含SEQ ID NO:174-SEQ ID NO:206中的任一个中所列的氨基酸序列。所述可裂解的间隔区可以是包含氨基酸序列的间隔区,所述氨基酸序列可以是烟草蚀斑病毒(TEV)蛋白酶的已知底物。所述可裂解的间隔区包含SEQ ID NO:193中所列的氨基酸序列。所述间隔区可以被存在于极化上皮细胞的基底外侧膜处的酶裂解。所述间隔区可以被存在于受试者的原生质中的酶裂解。

[0039] 所述可裂解的间隔区可以包含肽序列(或类似结构域),所述肽序列用于抑制、干扰或阻断生物活性货物与上皮细胞的表面处的受体结合的能力,但是其中在所述递送构建体被转运穿过上皮屏障并且所述货物从所述递送构建体和所述构建体的间隔区组分被释放之后所述递送构建体保留所述货物激活其受体的能力。所述可裂解的间隔区可以包含例如SEQ ID NO:194-SEQ ID NO:206中所列的氨基酸序列。

[0040] 本公开还涉及药物组合物,所述药物组合物可以包含本公开的新颖的非天然存在的递送构建体和一种或多种药学上可接受的运载体,配制用于口服施用、局部施用、肺部施用、鼻内施用、颊部施用、舌下施用或眼部施用。

[0041] 本公开提供一种治疗受试者中的炎症疾病的方法,所述方法可以包括向所述受试者施用本公开的药物组合物。在各种实施方案中,所述炎症疾病选自炎症性肠病、银屑病或细菌性脓毒症。在各种实施方案中,所述炎症性肠病是克罗恩病、溃疡性结肠炎、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、缺血性结肠炎、改道性结肠炎、白塞综合征或未定型结肠炎。

[0042] 本公开提供一种治疗受试者中的自身免疫性疾病的方法,所述方法可以包括向所述受试者施用本公开的药物组合物。在各种实施方案中,所述自身免疫性疾病是系统性红斑狼疮(SLE)、寻常型天疱疮、重症肌无力、溶血性贫血、血小板减少性紫癜、格雷夫斯病、斯耶格伦氏病、皮肌炎、桥本病、多肌炎、炎症性肠病、多发性硬化(MS)、糖尿病、类风湿性关节炎或硬皮病。

[0043] 本公开提供一种治疗受试者中的癌症的方法,所述方法可以包括向所述受试者施用本公开的药物组合物。在各种实施方案中,要被治疗的所述癌症包括但不限于非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、子宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑素瘤、以及利妥昔单抗抗性NHL和白血病。

[0044] 本公开提供一种治疗患有代谢障碍的受试者的方法,所述方法可以包括以足以治疗所述障碍的量施用本公开的药物组合物,其中所述代谢障碍是糖尿病、肥胖症、肥胖症所致的糖尿病、高血糖症、血脂异常症、高甘油三酯血症、X综合征、胰岛素抵抗、糖耐量减低(IGT)、糖尿病血脂异常症或高脂血症。

[0045] 本公开提供一种治疗患有脂肪肝疾病(例如非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD);非酒精性脂肪性肝炎(NASH))、胃肠疾病或神经变性疾病的受试者的方法,所述方法包括以足以治疗所述疾病的量口服施用本公开的药物组合物。

[0046] 本公开提供一种治疗患有生长激素缺乏性生长障碍的受试者的方法，所述方法可以包括以足以治疗所述障碍的量施用本公开的药物组合物，其中所述障碍是生长激素缺乏症(GHD)、特纳综合征(TS)、努南综合征、普拉德-威利综合征、含身材矮小症同源框的基因(SHOX)缺陷、慢性肾功能不全，和特发性身材矮小症短肠综合征，因罕见垂体瘤或它们的治疗所致的生长激素缺乏症，以及与HIV/AIDS相关联的肌萎缩疾病。

[0047] 递送构建体可以包含携带体，所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:133或SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:147中所列的氨基酸序列中的任何一个或多个氨基酸序列具有至少80％序列一致性。递送构建体可以包含携带体，所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:133或SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:147中所列的氨基酸序列中的任何一个或多个氨基酸序列具有至少90％序列一致性。递送构建体可以包含携带体，所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:133或SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:147中所列的氨基酸序列中的任何一个或多个氨基酸序列具有至少95％序列一致性。递送构建体可以包含携带体，所述携带体包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:133或SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:147中所列的氨基酸序列中的任何一个或多个氨基酸序列具有至少99％序列一致性。所述携带体可以衍生自Cholix结构域I并且可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125和/或SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个或多个氨基酸序列具有至少80％序列一致性。所述携带体可以衍生自Cholix结构域I并且可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125和/或SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个或多个氨基酸序列具有至少90％序列一致性。所述携带体可以衍生自Cholix结构域I并且可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125和/或SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个或多个氨基酸序列具有至少95％序列一致性。所述携带体可以衍生自Cholix结构域I并且可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125和/或SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个或多个氨基酸序列具有至少99％序列一致性。这些携带体中的任一个可以与本文中所述和公开的任何异源性货物组合，例如相比于SEQ ID NO:214-SEQ ID NO:220中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性的那些。这些携带体中的任一个可以与本文中所述和公开的任何异源性货物组合，例如相比于SEQ ID NO:214-SEQ ID NO:220中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少90％序列一致性的那些。这些携带体中的任一个可以与本文中所述和公开的任何异源性货物组合，例如相比于SEQ ID NO:214-SEQ ID NO:220中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少95％序列一致性的那些。这些携带体中的任一个可以与本文中所述和公开的任何异源性货物组合，例如相比于SEQ ID NO:214-SEQ ID NO:220中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少99％序列一致性的那些。本文中所述的递送构建体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:153-SEQ ID NO:165中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性。本文中所述的递送构建体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:153-SEQ ID NO:165中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少90％序列一致性。本文中所述的递送构建体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:153-SEQ ID NO:165中的任一个中所

列的氨基酸序列具有至少95％序列一致性。本文中所述的递送构建体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:153-SEQ ID NO:165中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少99％序列一致性。构建体可以能够胞吞(例如顶端胞吞)。构建体可以能够顶端到基底胞吞转运。

[0048] 本公开提供隔离性递送构建体,所述构建体可以能够在足够的亲和力下与肠上皮细胞的管腔表面上的受体结合以允许胞吞;其中结构域是包含氨基酸序列的多肽,其中一种细菌毒素结构域I多肽的一个或多个氨基酸残基被第二细菌毒素(例如外毒素)结构域I多肽的一个或多个氨基酸残基替换。第一外毒素的结构域I可以包含多肽,所述多肽包含氨基酸序列,其中SEQ ID NO:4的一个或多个氨基酸残基可以被第二细菌毒素(例如外毒素)的受体结合域多肽的一个或多个氨基酸残基替换。所述受体结合域可以是多肽,所述多肽包含氨基酸序列,其中SEQ ID NO:4的一个或多个氨基酸残基被SEQ ID NO:137的一个或多个氨基酸残基替换。所述受体结合域可以是多肽,所述多肽包含氨基酸序列,其中SEQ ID NO:137的一个或多个氨基酸残基被第二细菌毒素的受体结合域多肽的一个或多个氨基酸残基替换。所述受体结合域可以是多肽,所述多肽包含氨基酸序列,其中SEQ ID NO:136的一个或多个氨基酸残基被SEQ ID NO:4的一个或多个氨基酸残基替换。嵌合携带体可以包含与多肽偶联的生物活性货物,从而产生嵌合构建体;其中所述嵌合构建体能够递送所述生物活性货物。

[0049] 本公开提供一种嵌合构建体,所述嵌合构建体包含细菌毒素衍生的递送构建体;和生物活性货物;其中所述递送构建体能够将所述生物活性货物递送到上皮细胞中;并且其中所述递送构建体不包含细菌毒素衍生的易位结构域或细菌毒素衍生的催化(细胞毒性)结构域。本公开提供一种嵌合构建体,所述嵌合构建体由细菌毒素的受体结合域和生物活性货物组成;其中所述递送构建体能够将所述生物活性货物递送到上皮细胞中,并且其中所述嵌合构建体能够与肠上皮细胞的管腔表面上的受体结合。

[0050] 本公开进一步提供多核苷酸,所述多核苷酸编码本公开的非天然存在的递送构建体和/或递送构建体;包含多核苷酸的载体,所述多核苷酸编码本公开的非天然存在的递送构建体和/或递送构建体;任选地可操作地联接至控制序列,所述控制序列由用载体转化的宿主细胞识别;包含载体的宿主细胞,所述载体包含多核苷酸,所述多核苷酸编码本公开的非天然存在的递送构建体和/或递送构建体;用于制备本公开的非天然存在的递送构建体和/或递送构建体的方法,所述方法包括培养包含载体的宿主细胞,所述载体包含多核苷酸,所述多核苷酸编码本公开的非天然存在的递送构建体和/或递送构建体,以便所述多核苷酸被表达;所述方法还任选地包括从宿主细胞培养基回收所述非天然存在的递送构建体和/或递送构建体。

[0051] 本文中公开了本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或防止有此需要的受试者中的炎症疾病的药物的用途。

[0052] 本文中公开了本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或防止有此需要的受试者中的自身免疫性疾病的药物的用途。

[0053] 本文中公开了本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或防止有此需要的受试者中的癌症的药物的用途。

[0054] 本文中公开了本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或

防止有此需要的受试者中的代谢障碍的药物的用途。

[0055] 本文中公开了本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或防止有此需要的受试者中的脂肪肝疾病的药物的用途。

[0056] 本文中公开了本公开的非天然存在的递送构建体用于制备用于治疗、预防和/或防止有此需要的受试者中的生长激素缺乏性生长障碍的药物的用途。

附图说明

[0057] 本公开的新颖性特征在随附的权利要求中具体地陈述。通过参考阐述示例性方面的以下详细描述和附图(以下也称“图示”和“图”)将获得对本公开的特征和优点的更好的理解,在所述示例性方面中采用了本公开的原理,在所述附图中:

[0058] 图1和图2描绘了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的对(如本文中实施例1中所述进行制备的)构建体7-12的荧光显微镜检测。图1描绘了(从上到下)构建体12、11和10的定位。图2描绘了(从上到下)构建体9、8和7。从左到右:荧光图像、暗场照明、荧光图像和暗场照明的复合(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0059] 图1A示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体12的定位(荧光图像)。

[0060] 图1B示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体12的定位(白色光图像)。

[0061] 图1C示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体12的定位(与DAPI合并图像)。

[0062] 图1D示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体11的定位(荧光图像)。

[0063] 图1E示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体11的定位(白色光图像)。

[0064] 图1F示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体11的定位(与DAPI合并图像)。

[0065] 图1G示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体10的定位(荧光图像)。

[0066] 图1H示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体10的定位(白色光图像)。

[0067] 图1I示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体10的定位(与DAPI合并图像)。

[0068] 图2A示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体9的定位(荧光图像)。

[0069] 图2B示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体9的定位(白色光图像)。

[0070] 图2C示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体9的定位(与DAPI合并图像)。

[0071] 图2D示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体8的定位(荧光图像)。

[0072] 图2E示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体8的定位(白色光图像)。

[0073] 图2F示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体8的定位(与DAPI合并图像)。

[0074] 图2G示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体7的定位(荧光图像)。

[0075] 图2H示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体7的定位(白色光图像)。

[0076] 图2I示出了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的构建体7的定位(与DAPI合并图像)。

[0077] 图3描绘了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后20min观察到的对(如本文中实施例1中所述进行制备的)构建体6的荧光显微镜检测。从左到右:荧光图像、暗场照明、荧光图像和暗场照明的复合(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0078] 图3A描绘了构建体6(抗-Cho,1/500)的荧光显微镜检测。

[0079] 图3B描绘了构建体6(抗-Cho,1/500)的暗场照明检测。

[0080] 图3B描绘了构建体6(抗-Cho,1/500)的荧光图像和暗场照明检测的复合。

[0081] 图3D描绘了构建体6(抗-RPF,1/50)的荧光显微镜检测。

[0082] 图3E描绘了构建体6(抗-RPF,1/50)的暗场照明检测。

[0083] 图3F描绘了构建体6(抗-RPF,1/50)的荧光图像和暗场照明检测的复合。

[0084] 图4和图5描绘了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后的1min(图4)和20min(图5)之后观察到的对构建体13(SEQ ID NO:146,如本文中实施例5中所述进行制备)的荧光显微镜检测。

[0085] 图4A示出了在1min之后对构建体13的荧光显微镜检测。

[0086] 图4B示出了在1min之后对构建体13的荧光显微镜检测。

[0087] 图4C示出了在1min之后对构建体13的荧光显微镜检测。

[0088] 图4D示出了在1min之后对构建体13的荧光显微镜检测。

[0089] 图4E示出了在1min之后对构建体13的荧光显微镜检测(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0090] 图5A示出了在20min之后对构建体13的荧光显微镜检测。

[0091] 图5B示出了在20min之后对构建体13的荧光显微镜检测。

[0092] 图5C示出了在20min之后对构建体13的荧光显微镜检测。

[0093] 图5D示出了在20min之后对构建体13的荧光显微镜检测。

[0094] 图5E示出了在20min之后对构建体13的荧光显微镜检测(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0095] 图6和图7描绘了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后的1min(图6)和20min(图7)之后观察到的对构建体14(SEQ ID NO:147,如本文中实施例5中所述进行制备)的荧光显微镜检测(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0096] 图6A示出了在1min之后对构建体14的荧光显微镜检测。

[0097] 图6B示出了在1min之后对构建体14的荧光显微镜检测。

[0098] 图6C示出了在1min之后对构建体14的荧光显微镜检测。

[0099] 图6D示出了在1min之后对构建体14的荧光显微镜检测。

[0100] 图6E示出了在1min之后对构建体14的荧光显微镜检测(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0101] 图7A示出了在20min之后对构建体14的荧光显微镜检测。

[0102] 图7B示出了在20min之后对构建体14的荧光显微镜检测。

[0103] 图7C示出了在20min之后对构建体14的荧光显微镜检测。

[0104] 图7D示出了在20min之后对构建体14的荧光显微镜检测。

[0105] 图7E示出了在20min之后对构建体14的荧光显微镜检测(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0106] 图8A描绘了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后5min观察到的对包含SEQ ID NO:165中所列的氨基酸序列(M+Cholix$^{39-186}$-(具有SEQ ID NO:210的间隔区)-HGH)的构建体的荧光显微镜检测(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0107] 图8B描绘了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后10min观察到的对包含SEQ ID NO:165中所列的氨基酸序列(M+Cholix$^{39-186}$-(具有SEQ ID NO:210的间隔区)-HGH)的构建体的荧光显微镜检测。

[0108] 图8C描绘了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后15min观察到的对包含SEQ ID NO:165中所列的氨基酸序列(M+Cholix$^{39-186}$-(具有SEQ ID NO:210的间隔区)-HGH)的构建体的荧光显微镜检测。

[0109] 图9A描绘了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后5min观察到的对包含SEQ ID NO:160中所列的氨基酸序列(Cholix$^{1-187}$-(具有SEQ ID NO:210的间隔区)-HGH)的构建体的荧光显微镜检测(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0110] 图9B描绘了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后10min观察到的对包含SEQ ID NO:160中所列的氨基酸序列(Cholix$^{1-187}$-(具有SEQ ID NO:210的间隔区)-HGH)的构建体的荧光显微镜检测。

[0111] 图9C描绘了使用大鼠管腔内注射模型在管腔内注射之后15min观察到的对包含SEQ ID NO:160中所列的氨基酸序列(Cholix$^{1-187}$-(具有SEQ ID NO:210的间隔区)-HGH)的构建体的荧光显微镜检测(白色箭头#2突显基底表面)。

[0112] 图10A示出了非毒性Cholix(ntChx)在体外胞吞转运穿过人极化肠上皮。图10A描绘了在顶端施加2.5-200mg/mL ntChx之后2h通过ELISA在基底隔室中检测到的非毒性Cholix(ntChx,SEQ ID NO:3)的量(N＝2;平均数±S.E.,白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0113] 图10B描绘了在顶端施加2.5-200mg/mL ntChx之后2h对基底隔室内容物的蛋白质印迹法分析,在分析之前该内容物被浓缩大约10倍,该分析表明了在转运期间转运的ntChx没有被显著改变(例如被化学改变)。

[0114] 图10C描绘了在2h的时间过程期间通过ELISA检测的ntChx的基底量。该图表示出了可检测量的约20-25min延迟,以及在37℃下顶端施加5-20mg/mL的可比转运速率,以及在

4℃下转运速率的显著降低。

[0115] 图11示出了根据ELISA的测量，与在pH 5下相比，在pH 7下5-20mg/mL ntChx(SEQ ID NO:3)从顶端到基底的转运对顶端隔室更有效(N＝2;平均数±S.E)。

[0116] 图12A描绘了在管腔内注射(ILI)到大鼠空肠中之后的1分钟之后通过免疫荧光显微法显像得到的非毒性Cholix(ntChx,SEQ ID NO:3)在体内的胞吞转运。空心箭头＝顶端肠上皮细胞结构域;实心箭头＝细胞的核周区域;虚线＝上皮细胞-基底膜分界;GC＝杯状细胞。

[0117] 图12B描绘了在ILI到大鼠空肠中之后的5分钟之后通过免疫荧光显微法显像得到的非毒性Cholix(ntChx,SEQ ID NO:3)在体内的胞吞转运。空心箭头＝顶端肠上皮细胞结构域;实心箭头＝细胞的核周区域;虚线＝上皮细胞-基底膜分界;GC＝杯状细胞。

[0118]

[0119] 图12C描绘了在ILI到大鼠空肠中之后的15分钟之后通过免疫荧光显微法显像得到的非毒性Cholix(ntChx,SEQ ID NO:3)在体内的胞吞转运。与网格蛋白的共定位示出了绒毛末梢区域。空心箭头＝顶端肠上皮细胞结构域;实心箭头＝细胞的核周区域;虚线＝上皮细胞-基底膜分界;GC＝杯状细胞。

[0120]

[0121] 图13A示出了在将ntChx(SEQ ID NO:3)ILI到大鼠空肠中且同时将早期内体抗原1(EEA1)染色之后的15分钟ntChx在体内的胞吞转运(白色箭头#1突显顶端表面，而白色箭头#2突显基底表面)。GC＝杯状细胞;l-p＝固有层。

[0122] 图13B示出了在将ntChx(SEQ ID NO:3)ILI到大鼠空肠中且同时将Ras-相关蛋白Rab 11a染色之后的15分钟ntChx在体内的胞吞转运(白色箭头#1突显顶端表面，而白色箭头#2突显基底表面)。GC＝杯状细胞;l-p＝固有层。

[0123] 图13C示出了在将ntChx(SEQ ID NO:3)ILI到大鼠空肠中且同时将反式高尔基体网络(TGN)-38蛋白染色之后的15分钟ntChx在体内的胞吞转运。

[0124] 图13D示出了在将ntChx(SEQ ID NO:3)ILI到大鼠空肠中且同时将钙联接蛋白染色之后的15分钟ntChx在体内的胞吞转运(白色箭头#1突显顶端表面，而白色箭头#2突显基底表面)。GC＝杯状细胞;l-p＝固有层。

[0125] 图13E示出了在将ntChx(SEQ ID NO:3)ILI到大鼠空肠中且同时将Ras-相关蛋白Rab 7染色之后的15分钟ntChx在体内的胞吞转运(白色箭头#1突显顶端表面，而白色箭头#2突显基底表面)。GC＝杯状细胞;l-p＝固有层。

[0126] 图13F示出了在将ntChx(SEQ ID NO:3)ILI到大鼠空肠中且同时将高尔基体相关联的58kDa亚胺甲基转移酶环化脱氨酶蛋白(FTCD)染色之后的15分钟ntChx在体内的胞吞转运。GC＝杯状细胞;l-p＝固有层。

[0127] 图14A示出了在ILI后30min，少量的RFP(阴性对照)到达固有层(l-p)内的细胞而绒毛上皮中没有可检测的RFP(实心箭头指向上皮的顶端表面)。针对RFP的多克隆抗体表现出在ILI后30min少量的RFP可以到达固有层(l-p)内的细胞而绒毛上皮中没有可检测的RFP;(实心箭头指向上皮的顶端表面)。实心箭头(#1)＝管腔(顶端)膜;白色箭头#2＝基底膜;GC＝杯状细胞;l-p＝固有层。

[0128] 图14B示出了包含SEQ ID NO:157中所列的氨基酸序列的构建体能够有效地进行

顶端到基底胞吞转运，该构建体包含与红色荧光蛋白(RFP，SEQ ID NO:220)遗传融合或缀合的全长非毒性Cholix(ntChx，SEQ ID NO:3)。实心箭头(#1)＝管腔(顶端)膜；白色箭头#2＝基底膜；GC＝杯状细胞；l-p＝固有层。全长非毒性Cholix(ntChx，SEQ ID NO:3)被遗传联合到红色荧光蛋白(RFP，SEQ ID NO:220)。

[0129] 图14C示出Cholix结构域I在管腔内注射(ILI)到大鼠空肠中之后在体内足以实现顶端到基底胞吞转运。图14C示出在结构域I的末端截短(SEQ ID NO:1的氨基酸残基265，加SEQ ID NO:5中所得的N-末端甲硫氨酸残基)并且与RFP遗传融合(例如由此具有SEQ ID NO:156中所列的氨基酸序列)的Cholix能够有效实现顶端到基底胞吞转运，表明Cholix结构域I可以在管腔内注射(ILI)到大鼠空肠中之后在体内足以实现顶端到基底胞吞转运。实心白色箭头#1表示顶端上皮表面，而白色箭头#2突显基底表面。Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)被遗传联合到红色荧光蛋白(RFP，SEQ ID NO:220)。

[0130] 图15描绘了相比于Cholix结构域I和该结构域的与HGH遗传联合(由氨基酸标明)的截短部分的嵌合体，人生长激素(HGH，SEQ ID NO:214)的顶端到基底转运。HGH的蛋白质印迹法定性地评估在2h之后这些蛋白质在体内穿过单层极化的原代人小肠上皮细胞进行顶端到基底转运的能力。顶端施加的材料的量以摩尔计相当于HGH含量并且在分析之前基底收集物被浓缩约10倍。

[0131] 图15A示出在此模型中与对包含SEQ ID NO:164中所列的氨基酸序列、包含Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)、间隔区(SEQ ID NO:210)和HGH(SEQ ID NO:214)的递送构建体观察到的转运相比，HGH单独的背景顶端到基底转运最小。在SEQ ID NO:5的位置134、151、187或40-187处截短的Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)不能够促进联合的HGH的顶端到基底转运。

[0132] 图15B示出了Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)在位置206、245或251处的截短表现出联合的HGH的顶端到基底转运。在位置245和251处截短导致与包含具有SEQ ID NO:5的携带体的构建体相似的顶端到基底转运，而Cholix结构域I在位置206处被截短的嵌合体表现出顶端到基底转运的显著增强。

[0133] 图16A示出了如通过免疫荧光显微法显示，在管腔内注射之后15min对Cholix结构域I截短-人生长激素(HGH)嵌合体在体内穿过大鼠空肠上皮单层转运的评估。图16A示出具有SEQ ID NO:211(包含$Cholix^{1-133}$+N-末端甲硫氨酸)的Cholix-HGH构建体没有进入上皮细胞，表明具有SEQ ID NO:148中所列的氨基酸序列的功能肽片段可能是胞吞所需的。

[0134] 图16B示出了如通过免疫荧光显微法显示，在管腔内注射之后15min对Cholix结构域I截短-人生长激素(HGH)嵌合体在体内穿过大鼠空肠上皮单层转运的评估。图16B示出了具有SEQ ID NO:212(包含$Cholix^{1-150}$+N-末端甲硫氨酸)的Cholix-HGH构建体确实进入上皮细胞(与具有SEQ ID NO:211的蛋白质相反)，但是保留在顶端和基底泡囊池中而没有进入固有层，因此实现递送到上皮细胞的内部(例如在上皮细胞的基底侧的隔室)。

[0135] 图16C示出了如通过免疫荧光显微法显示，在管腔内注射之后15min对Cholix结构域I截短-人生长激素(HGH)嵌合体在体内穿过大鼠空肠上皮单层转运的评估。图16C示出了具有SEQ ID NO:213(包含$Cholix^{1-186}$+N-末端甲硫氨酸)的Cholix-HGH构建体进入上皮细胞，到达顶端和基底隔室，并且显著地还到达细胞的核上区域，然而仍然保留在上皮细胞内，表明具有SEQ ID NO:151中所列的氨基酸序列的功能肽片段可以允许进入和递送到核

上区域,却不允许将该构建体释放到基底外侧隔室(例如固有层)中。

[0136] 图16D示出了如通过免疫荧光显微法显示,在管腔内注射之后15min对Cholix结构域I截短-人生长激素(HGH)嵌合体在体内穿过大鼠空肠上皮单层转运的评估。图16D示出了具有SEQ ID NO:218(包含Cholix$^{39-186}$+N-末端甲硫氨酸)的Cholix-HGH构建体进入上皮细胞但是保留在顶端隔室中而没有呈现出到达基底隔室或核上隔室。

[0137] 图16E示出了如通过免疫荧光显微法显示,在管腔内注射之后15min对Cholix结构域I截短-人生长激素(HGH)嵌合体在体内穿过大鼠空肠上皮单层转运的评估。图16E示出了具有SEQ ID NO:161(包含Cholix$^{1-205}$+N-末端甲硫氨酸)的Cholix-HGH构建体完成了胞吞转运过程,正如该嵌合体被递送到固有层内的细胞所显示的,表明具有SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:5的氨基酸残基187-206)的功能肽片段可以允许将该构建体从上皮释放到基底外侧隔室(例如固有层)中。

[0138] 图16F示出了如通过免疫荧光显微法显示,在管腔内注射之后15min对Cholix结构域I截短-人生长激素(HGH)嵌合体在体内穿过大鼠空肠上皮单层转运的评估。图16F示出了具有SEQ ID NO:164(包含Cholix$^{1-265}$+N-末端甲硫氨酸,SEQ ID NO:5)的Cholix-HGH构建体完成了胞吞转运过程,正如该嵌合体被递送到固有层内的细胞所显示的,类似于具有SEQ ID NO:164的Cholix-HGH构建体。

[0139] 图17示出了Cholix结构域I的选定的氨基酸片段在体外和在体内实现顶端到基底胞吞转运。聚合物框架(包含来自具有SEQ ID NO:5的Cholix结构域I的位置1-39、134-151、151-178和178-206的氨基酸的肽序列的各种组合)标记有不同形式的量子点(例如硫化镉、硫化铅等)。

[0140] 图17A示出了在2h之后各种截短的Cholix(Chx)构建体在体外穿过极化肠上皮的胞吞转运。转运的材料的量被报告为相对于缺少任何Chx肽的聚合物-量子点制剂的荧光增强倍数。(N=2;平均数±S.E.)。

[0141] 图17B示出了在15min Cholix$^{39-186}$-HGH构建体(SEQ ID NO:218)的体内胞吞转运(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0142] 图17C示出了在15min标记有量子点的(SEQ ID NO:5)-(4N)-RFP构建体的体内胞吞转运(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0143] 图18示出了具有在其C-末端附接有间隔区(该间隔区具有SEQ ID NO:210中所列的氨基酸序列)的Cholix结构域1(包含N-末端甲硫氨酸)的SEQ ID NO:221中所列的氨基酸序列。此间隔区可以用于将货物部分(例如治疗剂)附接到Cholix携带体以便转运穿过上皮层(例如肠上皮)。突显的氨基酸片段可以提供与穿过上皮层的胞吞转运相关的某些功能。例如,具有SEQ ID NO:5中所列的序列的位置134-151的氨基酸残基的片段可以促进Cholix构建体在顶端进入上皮细胞中。具有(例如SEQ ID NO:5的)氨基酸残基151-187的突显片段可以促进早期内体分选。具有(例如SEQ ID NO:5的)氨基酸残基187-206的突显片段可以促进如本文中所述的Chx构建体完成胞吞转运。

[0144] 图19示出了定位在具有SEQ ID NO:221中所列的氨基酸序列的Cholix结构域I的位置N98、N154、N165和N224处的天冬酰胺残基的潜在糖基化位点。

[0145] 图20示出了具有突显的功能片段的Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)的大致3D结构。

[0146] 图20A示出了包含具有SEQ ID NO:148的氨基酸序列(SEQ ID NO:5的残基134-

151)的突显的功能片段的Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)的大致3D结构。

[0147] 图20B示出了包含具有SEQ ID NO:149的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:5的残基151-187)的突显的功能片段的Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)的大致3D结构。

[0148] 图20C示出了包含具有SEQ ID NO:152的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:5的残基187-206)的突显的功能片段的Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)的大致3D结构。

[0149] 图21图示了对具有SEQ ID NO:154中所列的氨基酸序列的Cholix衍生的递送构建体(该递送构建体是M+Cholix^{386}-GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:210)-IL-10,从N-末端到C-末端)的运输途径分析。包含Cholix结构域(SEQ ID NO:5)和作为货物的人生长激素(HGH)的递送构建体还可以用于显示与包含M+Cholix^{386}的构建体所示类似的结果。

[0150] 图21A示出了M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体与EEA1抗原稳固地共定位在与在肠上皮细胞的顶端和基底区域处的运输一致的细胞位置中,表明该Cholix衍生的递送构建体存在于早期内体隔室中(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0151] 图21B示出了M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体(右上)与Rab7(左上)稳固地主要共定位在肠上皮细胞的顶端隔室中,但仅仅有限地共定位在固有层内的细胞中,表明该Cholix衍生的递送构建体存在于晚期内体隔室中(左下示出白色光图像,而右下示出与DAPI合并染色)。

[0152] 图21C示出了在特定大囊泡中识别到LAMP1,与没有M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体(白色箭头)的成熟溶酶体一致。然而,M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)也与LAMP1抗原共定位在除了溶酶体样结构之外的细胞位置中,与在肠上皮细胞的顶端和基底区域处的囊泡运输一致,表明该Cholix衍生的递送构建体存在于晚期内体隔室中。

[0153] 图21D示出了M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)嵌合体也与包覆网格蛋白的囊泡稳固地共定位,具体地共定位在邻近核的区域中,以及在主要在肠上皮细胞的基底隔室中的Rabl 1中,以及在固有层内的选定细胞中。

[0154] 图21E示出了,如通过钙联接蛋白显示的,M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体与内质网共定位在肠上皮细胞中的邻近核的区域,以及在固有层内的大部分细胞中。M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体与内质网高尔基体中间隔室(ERGIC)稳固地共定位,并且LAMN1抗原呈现出响应于携带体胞吞和胞吞转运而重新分布,如在注射之后1分钟(图21F)、5分钟(图21G)、10分钟(图21H)和15分钟(图21I)所示。

[0155] 图21F示出了M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体与内质网高尔基体中间隔室(ERGIC)稳固地共定位,并且LAMN1抗原呈现出响应于携带体胞吞和胞吞转运而重新分布,如在注射之后1分钟所示(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0156] 图21G示出了在注射之后5分钟M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体与LAMN1抗原共定位(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0157] 图21H示出了在注射之后10分钟M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体与LAMN1抗原共定位。

[0158] 图21I示出了在注射之后15分钟M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体

与LAMN1抗原共定位。

[0159] 图21J示出了M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体没有与存在于肠上皮细胞中的低水平的巨蛋白共定位。一些巨蛋白与嵌合体共定位在存在于固有层中的细胞亚群中,表明该Cholix衍生的携带体没有与高尔基体隔室一起定位(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0160] 图21K示出了58K抗原定位在肠上皮细胞中核顶端的部位中,并且M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体表现出与该抗原有一定方式的一些共定位,表明穿过此隔室的短暂移动。在固有层内的细胞中没有观察到58K抗原(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0161] 图21L示出了M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体表现出与TGN38抗原(右上)有一定水平的共定位,其表现出局限于肠上皮细胞的核顶端侧和固有层内若干细胞中的核附近的细胞分布(白色光图像和合并图像分别示出在左下和右下)。

[0162] 图21M示出了M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体(以绿色染色示出,右上)与Rabl 1(左上)稳固地主要共定位在肠上皮细胞的基底隔室中以及在固有层内的选定细胞中(白色光图像和合并图像分别示出在左下和右下)。

[0163] 图22图示了1D SDS-PAGE,表明采用缀有非毒性Cholix衍生的携带体元件的纳米尺寸(直径25nm或100nm)的磁珠的有效方案可以用于特异性蛋白捕获以分析与Cholix或从其衍生的携带体相互作用的蛋白质。

[0164] 图23图示,在多次洗涤之后,富集磁珠的囊泡可以在裂解缓冲剂中被溶解并且存在的蛋白质组分可以通过2-D SDS-PAGE进行分离以供分析。

[0165] 图24示出了这些蛋白质的模式可以与细胞的总蛋白质含量进行比较并且质谱可以用于识别与Cholix衍生的递送构建体进入的囊泡结构相关联的特定元件。

[0166] 图25示出了重复上述用于识别一系列相互作用候选物的方案所得结果的比较。然后可以检验相互作用的蛋白质在Caco-2细胞中的含量以及在大鼠小肠中的含量。Cholix与识别的候选蛋白质的相互作用可以采用包覆Cholix携带体的磁珠和纯化的候选蛋白进行确认。

[0167] 图26示出了包覆Cholix携带体(具有SEQ ID NO:154中所列的氨基酸)的珠与纯蛋白质的温育以及后续的蛋白质印迹法或ELISA可以实现对Cholix-蛋白相互作用的检测。例如,该图示出了Cholix携带体与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)、Dickkopf-相关蛋白1(DKK1)、分子伴侣葡萄糖调节蛋白75(GRP75)和细胞角蛋白-8(K8或CK8)的相互作用。

[0168] 图27示出了候选蛋白质和Cholix衍生的递送构建体在大鼠空肠中的显微共定位。示出了包含与IL-10偶联的Cholix携带体蛋白的递送构建体(SEQ ID NO:154,M+Cholix^{386}-GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:210)-IL-10)和CK8在体内的共定位。

[0169] 图27A示出了在大鼠空肠经过管腔施加M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体处理1分钟之后的共定位(白色箭头#1突显顶端表面,而白色箭头#2突显基底表面)。

[0170] 图27B示出了在大鼠空肠经过管腔施加M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体处理5分钟之后的共定位。

[0171] 图27C示出了在大鼠空肠经过管腔施加M+Cholix^{386}-IL-10(SEQ ID NO:154)递送构建体处理10分钟之后的共定位。因此,在核上区域中的共定位表现出随着时间而增高。

[0172] 图28示出了在采用人图谱的IHC研究中获得的结果的比较，用于确保受体分布在大鼠体内研究和人肠之间是一致的。在此，检验了由质谱识别并在大鼠空肠中证实的受体中的两种。

[0173] 图28A示出GRP75的肠定位在大鼠肠和人肠之间是一致的。

[0174] 图28B示出HSPC的肠定位在大鼠肠和人肠之间是一致的。

[0175] 图29示出了通过CRISPR进行HSPG敲除对递送构建体(SEQ ID NO:164)的转运功能的效应，该递送构建体包含经由聚甘氨酸-丝氨酸间隔区(SEQ ID NO:210)与HGH(SEQ ID NO:214)偶联的Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)，并且HGH单独作为非选择性转运的内部对照。将细胞以1.5x10^5个细胞/mL接种在transwell中。在第18天，测量跨上皮/跨内皮电阻(TEER)并且将包含20ug/mL递送构建体的PBS添加到顶端室中。在3h之后，基底外侧样品被采集和浓缩。蛋白质转运的程度是采用抗-HGH抗体通过蛋白质印迹法进行分析。图29中所示的结果表明Cholix衍生的携带体蛋白的胞吞转运和主动选择性转运是HSPG-依赖性的，因为与正常的HSPG-阳性Caco-2细胞相比，在HSPC敲减的细胞中Cholix携带体表现出显著较低的胞吞转运功能。

[0176] 图30示出K8、HSPC和GRP75对Cholix结构域I衍生的递送构建体的胞吞转运功能的敲除效应。Caco-2细胞的缺乏特定候选蛋白质表达的稳定细胞系在体外用作单层以验证其在利用主动和选择性内源性转运机制时对携带体胞吞转运的要求。包含HGH的递送构建体的特异性转运相比于单独的HGH的非选择性转运在HSPG和GRP75敲除时减少，而在K8敲除时不减少。

[0177] 图30A示出K8的敲除效应。

[0178] 图30B示出HSPC的敲除效应。

[0179] 图30C示出GRP75的敲除效应。

[0180] 图30D示出对照实验。

[0181] 图31示出用于检验Cholix携带体-GRP75相互作用的pH-依赖性的Biacore结合相互作用。Cholix携带体蛋白通过利用生物素-链霉亲和素生物缀合而被附接到磁珠并且与纯化的GRP75蛋白一起分别在pH 5.5、6.5和7.5的缓冲溶液中温育。最高的结合亲和力表现在pH 6.5下。

[0182] 图32示出了Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)的示例性表面模型用于在此胞吞转运过程中突显由于从蛋白质表面突出而引起潜在关注的选定区域。令人关注地注意到，在M^1和G^{40}之间的两个氨基酸区域邻近于表面暴露的氨基酸D^{151}-A^{187}和A^{187}-L^{206}。具体地，L^{18}-I^{26}(结构域X1)和T^{171}-I^{176}(结构域X2)相配合而形成被若干负电荷包围的口袋。类似地，K^{187}-H^{203}(结构域X3)与I^{32}-E^{40}(结构域X4)相配合而形成连续的脊状结构。

[0183] 图32A示出了结构域X3和X4的邻近。

[0184] 图32B示出了结构域X1和X2的以及X3和X4的邻近。

[0185] 图32C示出了结构域X1和X2的邻近。

[0186] 图32D示出了结构域X1和X2的以及X3和X4的邻近。

具体实施方式

引言

[0187] 虽然在本文中已示出和描述本发明的各种实施方案，但是，对于本领域技术人员而言，显然这些实施方案仅仅以实施例的方式提供。本领域技术人员可以想到许多改变、变化和置换而不脱离本发明。应当理解可以采用本文中所述的本发明的实施方案的各种可替代方案。

[0188] 本公开提供了方法和组合物以用于在体外或在体内(例如在啮齿动物或人中)将货物分子转运和/或递送到细胞内的某(些)位置(例如核上位置)或穿过细胞(例如上皮细胞)。这种货物可以通过将其偶联到携带体分子而被导向到一系列位置。这种携带体分子可以与在细胞表面上和细胞内特有的受体相互作用以便于货物的靶向递送。在本文中描述了各种此类携带体、货物及其用途。

[0189] 除非本文中另有定义，与本公开相关使用的科学和技术术语应当具有本领域技术人员普遍理解的含义。此外，除非上下文另有要求，单数术语应当包括复数并且复数术语应当包括单数。一般而言，与本文中所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、蛋白质和核酸化学以及杂交相关使用的命名和技术是本领域中常用且公知的那些命名和技术。除非另有说明，本公开的方法和技术通常根据本领域中公知的常规方法以及按照在整个本说明书中引用和讨论的各种一般的和更具体的参考文件中描述的来执行。参见，例如Green和Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(2012)，以及Ausubel等人，Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates(1992)，各自都通过援引并入本文中。酶反应和纯化技术根据生产商的说明书、按照本领域中普遍实施的，或按照本文中所述的来执行。与本文中所述的分析化学、合成有机化学和药学和药物化学相关使用的命名以及实验室操作程序和技术是本领域中常用且公知的那些。标准的技术用于化学合成、化学分析、药物配制、配方和递送，以及患者的治疗。

[0190] 如本文中所述，氨基酸序列可以包含在N-末端对氨基酸序列的一种或多种修饰。本文中公开的氨基酸序列可以包含“N-帽”。一般而言，本文中公开的N-帽可以表示以各种方式对肽或多肽的N-末端的修饰，并且具体地可以表示(i)一个或多个氨基酸序列或其他部分(例如亲和手柄(affinity handle)、细胞穿透肽序列等)的添加，以及(ii)对肽或多肽的前1-10个N-末端氨基酸内的一个或多个氨基酸残基的修饰，其中氨基酸修饰是相对于参考序列或共有序列(参见，例如与本文中所述的SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中所列的多肽序列的前4个N-末端氨基酸残基的比较)。N-帽可以包含与氨基酸序列例如Cholix衍生的携带体分子的N-末端附接(例如化学偶联)的附加的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或15个或100个附加的氨基酸残基。N-帽可以进一步包含氨基酸序列中在N-末端处的一个或多个变异。例如，Cholix结构域I衍生的携带体可以包含N-帽。N-帽可以包含用其他氨基酸残基置换一个或多个N-末端氨基酸残基。N-帽可以进一步包含N-末端甲硫氨酸残基。这些修饰中的一种或多种可以是在细菌生产体系(例如大肠杆菌)中产生Cholix结构域I氨基酸序列的结果。例如，Cholix结构域I可以包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基1-265，其列于SEQ ID NO:4中。细菌表达的Cholix结构域可以包含SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列，其作为SEQ ID NO:4外加N-末端甲硫氨酸残基，在本文中也可以表示为$M+Cholix^{1-265}$或$M+Cholix^{265}$。

[0191] 如本文中所述，术语“缺少结构域”或“缺乏结构域”一般表示不包含完整的结构

域,但是任选地包含其部分或片段。例如,从外毒素的结构域I衍生的但缺少所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III的携带体一般表示不包含所述结构域II、Ib和III中的任一个(例如相比于其具有100%序列一致性)的完整氨基酸序列的携带体,但是所述携带体可以任选地包含所述结构域的部分或片段。因此,本文中所述的衍生自Cholix结构域并且缺少Cholix结构域II的携带体可以包含:具有SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的Cholix结构域I,以及Cholix结构域II的附加的50-80个氨基酸残基(例如SEQ ID NO:126的氨基酸1-50或1-80),和/或Cholix结构域III的附加的50-80个氨基酸残基(例如SEQ ID NO:128的氨基酸1-50或1-80)。

[0192] 如本文中所述,术语"附接到"、"偶联到"、"联接到"、"缀合到"和"融合到"可以可互换地使用,并且一般表示第一分子(例如多肽)与第二分子(例如多肽、小分子等)相关联。该关联可以是经由化学键,其中该化学键可以是共价或非共价的。第一多肽和第二多肽之间的共价化学键可以通过将所述第一多肽合成偶联到所述第二多肽而产生,或者它可以通过将所述第一多肽重组融合到所述第二多肽而产生。因此,第一(例如第一多肽)分子可以被化学(例如合成)偶联到或被重组偶联到第二分子(例如第二多肽)。

[0193] 术语"多肽"、"肽"和"蛋白质"在本文中可互换地用于表示氨基酸残基的聚合物。此外,术语"毒素"、"携带体"、"递送构建体"、"嵌合构建体"、"蛋白质"和"多肽"可以可互换地使用并且一般表示可以与异源性货物偶联的分子。一般而言,"递送构建体"和"嵌合构建体"是"肽"、"多肽"或"蛋白质",在本文中被描述为氨基酸链,其α碳通过肽键而联接。因此在该链的一端(氨基末端)处的末端氨基酸具有游离的氨基,而在该链的另一端(羧基末端)处的末端氨基酸具有游离的羧基。如本文中使用的,术语"氨基末端"(缩写为N-末端)表示在肽的氨基末端处的氨基酸上的游离的α-氨基,或者表示在该肽内的任何其他位置处的氨基酸的α-氨基(当参与肽键时为亚胺基)。类似地,术语"羧基末端"表示肽的羧基末端上的游离羧基,或者在该肽内的任何其他位置处的氨基酸的羧基。肽还包括基本上任何聚氨基酸,包括但不限于,拟肽,例如由醚键而非酰胺键连接的氨基酸。一般而言,本文中所述的肽、多肽和蛋白质可以被重组制备或化学合成(例如采用固相合成),或其组合。

[0194] 如本文中公开的,术语"递送"一般表示分子(例如异源性货物)在一位置(例如细胞内隔室或核上区域)处存在一段时间。术语"递送"可以表示分子(例如异源性货物)在一位置(例如细胞内隔室或核上区域)存在足以发挥某种生物效应(例如在该位置处与蛋白质(例如酶或受体)相互作用(例如结合))的时间。分子(例如异源性货物)向一位置(例如细胞内隔室或核上区域)的递送可以表示所述分子保留在该位置处。分子在某一细胞内或细胞外区域或隔室的保留可以持续某时间量,例如至少2分钟、至少5分钟、至少10分钟、至少15分钟、至少30分钟或至少60分钟。分子的保留可以取决于各种因素,例如所述分子被保留在的位置和/或在所述分子(例如携带体、递送构建体和/或异源性货物)之间发生的分子相互作用的类型。例如,异源性货物经由胞吞转运穿过极化上皮细胞而递送到基底外侧隔室可以包括使该异源性货物在该基底外侧位置保留足以发挥某种效应(例如就治疗性和/或生物活性货物而言的治疗效应)的时间。

[0195] 本公开的多肽包括以任何方式和出于任何原因已被修饰的多肽,例如,为了:(1)减低对蛋白水解的敏感性,(2)减低对氧化的敏感性,(3)改变结合亲和力以形成蛋白质复合物,(4)改变结合亲和力,以及(5)赋予或改性其他物理化学或功能性质。例如,单个或多

个氨基酸置换(例如保守氨基酸置换)可以在天然存在的序列(例如在多肽的形成分子间接触的(多个)结构域之外的部分)中进行。“保守氨基酸置换”表示在多肽中用功能上相似的氨基酸对氨基酸的置换。以下六组各自包含相互保守置换的氨基酸：

1)丙氨酸(A)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)

2)天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)

3)天冬酰胺(N)和谷氨酰胺(Q)

4)精氨酸(R)和赖氨酸(K)

5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)

6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)

[0196] “非保守氨基酸置换”表示这些类别之一的成员置换另一类别的成员。在进行这种改变时，根据各种实施方案，可以考虑氨基酸的亲/疏水性指数。基于其疏水性和电荷特征已向每种氨基酸指定亲/疏水性指数。它们是：异亮氨酸(+4.5)；缬氨酸(+4.2)；亮氨酸(+3.8)；苯丙氨酸(+2.8)；半胱氨酸/胱氨酸(+2.5)；甲硫氨酸(+1.9)；丙氨酸(+1.8)；甘氨酸(-0.4)；苏氨酸(-0.7)；丝氨酸(-0.8)；色氨酸(-0.9)；酪氨酸(-1.3)；脯氨酸(-1.6)；组氨酸(-3.2)；谷氨酸(-3.5)；谷氨酰胺(-3.5)；天冬氨酸(-3.5)；天冬酰胺(-3.5)；赖氨酸(-3.9)；和精氨酸(-4.5)。在其他实施方案中，递送构建体的携带体是包含肽、多肽、小分子、适体、其片段或其任何组合的嵌合携带体。

[0197] 氨基酸亲/疏水性指数在对蛋白质赋予相互作用生物功能方面的重要性在本领域中得到理解(参见，例如，Kyte等人，1982，J.Mol.Biol.157:105-131)。已知某些氨基酸可以置换具有相似的亲/疏水性指数或评分的其他氨基酸并且仍然保留相似的生物活性。在基于亲/疏水性指数进行改变时，在各种实施方案中，包括对亲/疏水性指数在±2内的氨基酸的置换。在各种实施方案中，包括对亲/疏水性指数在±1内的氨基酸的置换，而在各种实施方案中，包括对亲/疏水性指数在±0.5内的氨基酸的置换。

[0198] 在本领域中还理解，对类似的氨基酸的置换可以有效地基于亲水性进行，具体地其中由此产生的生物功能性蛋白质或肽旨在用于免疫应用中，如本文中公开的。在各种实施方案中，蛋白质的最大局部平均亲水性取决于其附近氨基酸的亲水性，与其免疫原性和抗原性相关联，即与该蛋白质的生物性质相关联。

[0199] 已向下列这些氨基酸残基指定以下亲水性值：精氨酸(+3.0)；赖氨酸(+3.0)；天冬氨酸(+3.0+/-.1)；谷氨酸(+3.0+/-.1)；丝氨酸(+0.3)；天冬酰胺(+0.2)；谷氨酰胺(+0.2)；甘氨酸(0)；苏氨酸(-0.4)；脯氨酸(-0.5+/-.1)；丙氨酸(-0.5)；组氨酸(-0.5)；半胱氨酸(-1.0)；甲硫氨酸(-1.3)；缬氨酸(-1.5)；亮氨酸(-1.8)；异亮氨酸(-1.8)；酪氨酸(-2.3)；苯丙氨酸(-2.5)和色氨酸(-3.4)。在基于相似的亲水性值进行改变时，在各种实施方案中，包括对亲水性值在±2内的氨基酸的置换，在各种实施方案中，包括对亲水性值在±1内的氨基酸的置换，并且在各种实施方案中，包括对亲水性值在±0.5内的氨基酸的置换。

[0200] 示例性氨基酸置换列于表1中。

表1-示例性氨基酸置换

原始残基	示例性置换	优先置换
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
Leu	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-二氨基-丁酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu

[0201] 技术人员将能够利用熟知的技术来确定本文中所列的多肽的适合变体。本领域技术人员可以通过靶向被认为对活性不重要的区域来识别分子的可被改变而不破坏活性的适合区域。技术人员可以在相似的多肽中识别分子的保守的残基和部分。这些材料的对生物活性或对结构可能重要的区域可以经受保守氨基酸置换而不破坏生物活性或者而没有不利地影响多肽结构。

[0202] 此外，本领域技术人员可以查看结构-功能研究以识别相似的多肽中对于活性或结构重要的残基。鉴于这种比较，技术人员可以预测一种多肽中的与相似多肽中对活性或结构重要的氨基酸残基对应的氨基酸残基的重要性。本领域技术人员可以选择化学上相似的氨基酸置换这种预测的重要氨基酸残基。

[0203] 本领域技术人员还可以分析在相似的多肽中与该结构相关的三维结构和氨基酸序列。鉴于这种信息，本领域技术人员可以针对其三维结构预测多肽的氨基酸残基的比对。本领域技术人员可以选择对预测会在多肽的表面上的氨基酸残基不做出重大的改变，因为这种残基可能参与和其他分子的重要相互作用中。另外，本领域技术人员可以制备在每个期望的氨基酸残基处包含单个氨基酸置换的测试变体。所述变体可以随后利用本领域技术人员已知的活性测定进行筛选。这种变体可以用于收集关于适合变体的信息。例如，如果发现对特定氨基酸残基的改变导致破坏的、不期望地减小的或不合适的活性，则可以避免具

有氨基酸序列的这种改变的变体。换言之，基于从这种常规试验收集的信息，本领域技术人员可以容易地确定单独地或与其他突变组合应时当避免进一步置换的氨基酸。

[0204] 如本文中使用的，术语“多肽片段”和“截短的多肽”表示与对应的全长蛋白质相比具有氨基-末端和/或羧基-末端缺失的多肽。在各种实施方案中，片段的长度可以是，例如，至少5个、至少10个、至少25个、至少50个、至少100个、至少150个、至少200个、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个、至少500个、至少600个、至少700个、至少800个、至少900或至少1000个氨基酸。在各种实施方案中，片段的长度还可以是，例如，至多1000个、至多900个、至多800个、至多700个、至多600个、至多500个、至多450个、至多400个、至多350个、至多300个、至多250个、至多200个、至多150个、至多100个、至多50个、至多25个、至多10个或至多5个氨基酸。片段在其任一端或两端处可以进一步包含一个或多个附加的氨基酸，例如，来自不同的天然存在的蛋白质的氨基酸序列(例如Fc或亮氨酸拉链结构域)，或人工氨基酸序列(例如人工间隔区序列)。

[0205] 如本文中使用的，术语“多肽变体”和“多肽突变体”表示包含氨基酸序列的多肽，其中一个或多个氨基酸残基被插入与另一个多肽序列相关的氨基酸序列中，从该氨基酸序列删除和/或被置换到该氨基酸序列中。要被插入、删除或置换的氨基酸残基的数量可以是，例如，至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个、至少25个、至少50个、至少75个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少225个、至少250个、至少275个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个或至少500个氨基酸长度。本公开的变体包括融合蛋白。

[0206] 多肽的“衍生物”是已被化学修饰的多肽，例如与另一种化学部分(例如聚乙二醇、清蛋白(例如人血清清蛋白))缀合、磷酸化和糖基化。

[0207] 术语“%序列一致性”在本文中与术语“%一致性”可互换地使用，并且表示，当采用序列比对程序进行比对时，两个或多个肽序列之间的氨基酸序列一致性的水平，或两个或多个核苷酸序列之间的核苷酸序列一致性的水平。例如，如本文中使用的，80%一致性表示与通过限定的算法确定的80%序列一致性相同，并且表示给定的序列相比于另一长度的另一序列是至少80%一致的。在各种实施方案中，%一致性选自，例如，相比于给定序列，至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%或更高的序列一致性。在各种实施方案中，%一致性的范围是，例如，约60%至约70%、约70%至约80%、约80%至约85%、约85%至约90%、约90%至约95%，或约95%至约99%。

[0208] 术语“%序列同源性”在本文中与术语“%同源性”可互换地使用，并且表示，当采用序列比对程序进行比对时，两个或多个肽序列之间的氨基酸序列同源性的水平，或两个或多个核苷酸序列之间的核苷酸序列同源性的水平。例如，如本文中使用的，80%同源性表示与通过限定的算法确定的80%序列同源性相同，并且因此给定序列的同源体相对于该给定序列的长度具有大于80%序列同源性。在各种实施方案中，%同源性选自，例如，相比于给定序列，至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%或更高的序列同源性。在各种实施方案中，%同源性的范围是，例如，约60%至约70%、约70%至约80%、约80%至约85%、约85%至约90%、约90%至约95%，或约95%至约99%。

[0209] 可以用于确定两个序列之间的一致性的示例性计算机程序包括但不限于，BLAST

程序套件，例如，在互联网上在NCBI网址公众可获得的BLASTN、BLASTX、TBLASTX、BLASTP和TBLASTN。还参见，Altschul等人，1990，J.Mol.Biol.215:403-10(具体参考公布的默认设置，即参数w＝4，t＝17)，以及Altschul等人，1997，Nucleic Acids Res.，25:3389-3402。当相对于GenBank蛋白质序列和其他公用数据库中的氨基酸序列评估给定氨基酸序列时，通常采用BLASTP程序进行序列搜索。BLASTX程序优选用于搜索与GenBank蛋白质序列和其他公用数据库中的氨基酸序列相比在所有阅读框中已经被翻译的核酸序列。采用开放空位罚分11.0和延长空位罚分1.0的默认参数来运行BLASTP和BLASTX，并且利用BLOSUM-62矩阵。参见，同上。

[0210] 除了计算％序列一致性，BLAST算法还执行对两个序列之间的相似性的统计分析(参见，例如Karlin和Altschul，Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA，90:5873-5787(1993))。由BLAST算法提供的相似性的一种量度是最小总和概率(P(N))，其提供对两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然会发生匹配的概率的指示。例如，如果测试核酸与参考核酸相比的最小总和概率是例如至多0.1、至多0.01或至多0.001，则该核酸被认为相似于该参考序列。

[0211] “多核苷酸”表示由核苷酸单元构成的聚合物。多核苷酸包天然存在的核酸例如脱氧核糖核酸(“DNA”)和核糖核酸(“RNA”)，以及核酸类似物。核酸类似物包括那些核酸类似物，其包含非天然存在的碱基、参与和其他核苷酸联接但不同于天然存在的磷酸二酯键的核苷酸，或其包含经由不同于磷酸二酯键的联接而附接的碱基。因此，核苷酸类似物包括，例如而不限于，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、硼烷磷酸酯(boranophosphate)、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)，及诸如此类。这种多核苷酸可以例如采用自动化DNA合成仪进行合成。术语“核酸”通常表示大的多核苷酸。术语“寡核苷酸”通常表示短的多核苷酸，一般不大于约50个核苷酸。将理解，当核苷酸序列由DNA序列(即A、T、G、C)表示时，这也包括RNA序列(即A、U、G、C)，其中“U”替代“T”。

[0212] 常规的表示法在本文中用于表述多核苷酸序列：单链多核苷酸序列的左手端是5'-端；双链多核苷酸序列的左手方向表示为5'-方向。向新生的RNA转录体的5'到3'添加核苷酸的方向被称为转录方向。具有与mRNA相同的序列的DNA链被称为“编码链”；在具有与从DNA转录的mRNA相同的序列的DNA链上的并且位于RNA转录体的5'至5'-端的序列被称为“上游序列”；在具有与RNA相同的序列的DNA链上的并且位于编码RNA转录体的3'至3'端的序列被称为“下游序列”。

[0213] “互补”表示两个多核苷酸的相互作用表面的拓扑相容性或匹配在一起。因此，所述两个分子可以被描述为互补，并且接触表面特征也彼此互补。如果第一多核苷酸的核苷酸序列与第二多核苷酸的多核苷酸结合配对体的核苷酸序列基本上相同，或者如果第一多核苷酸可以在严格的杂交条件下杂交到第二多核苷酸，则所述第一多核苷酸与所述第二多核苷酸互补。

[0214] “与…特异性杂交”或“特异性杂交”或“选择性杂交到”表示核酸分子在严格条件下优先地与特定的核苷酸序列(当该序列存在于复杂的混合物(例如全体细胞)DNA或RNA中时)结合、双联或杂交。术语“严格条件”表示在该条件下探针将优先地与其靶子序列杂交，并且在较低程度上或根本不与其他序列杂交。“严格杂交”和“严格杂交洗涤条件”在核酸杂交实验例如DNA和RNA印迹杂交的情形中是序列依赖性的，并且在不同的环境参数下是不同

的。对核酸杂交的广泛指导可以在以下中查到:Tijssen,1993,Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes,第I部分,第2章,“Overview of principles of hybridization and the strategy of Nucleic Acid probe assays”,Elsevier,N.Y.;Sambrook等人,2001,Molecular Cloning: A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,3.sup.rd ed.,NY;以及Ausubel等人编,Current Edition,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and Wiley Interscience,NY。

[0215] 一般而言,高度严格的杂交和洗涤条件被选择为在定义的离子强度和pH下比特定序列的热解链点(Tm)低约5℃。Tm是(在定义的离子强度和pH下)当50%的靶序列杂交到完美匹配的探针时所在的温度。非常严格条件被选择为与特定探针的Tm相等。对于在DNA或RNA印迹法中在滤器上的具有大于约100个互补残基的互补核酸而言,杂交的严格杂交条件的示例是在42℃下含有1mg肝素的50%福尔马林,该杂交过夜执行。高度严格洗涤条件的示例是在72℃下0.15M NaCl持续约15分钟。严格洗涤条件的示例是在65℃下0.2x SSC洗涤15分钟。参见Sambrook等人对SSC缓冲剂的描述。在高度严格洗涤之前可以进行低严格洗涤以除去背景探针信号。用于例如大于约100个核苷酸的双链体的示例性中等严格洗涤是在45℃下1x SSC持续15分钟。用于例如大于约100个核苷酸的双链体的示例性低严格洗涤是在40℃下4-6x SSC持续15分钟。一般而言,在特定的杂交测定中信噪比是对不相关的探针观察到的信噪比的2x(或更高)则表明特异性杂交的检测。

[0216] “引物”表示能够特异性杂交到指定的多核苷酸模板并且提供互补多核苷酸的合成起始点的多核苷酸。这种合成发生在多核苷酸引物处于合成被引发的条件下时,即在核苷酸、互补多核苷酸模板以及用于聚合的试剂例如DNA聚合酶的存在下。引物通常是单链的,但是可以是双链的。引物通常是脱氧核糖核酸,但是各种合成的和天然存在的引物也可用于许多应用。引物与模板互补,所述引物被设计成与该模板杂交以用作引发合成的位点,但是不需要反映该模板的确切序列。在这种情况中,引物与模板的特异性杂交取决于杂交条件的严格性。引物可以标记有例如生色部分、放射性部分或荧光部分并且用作可检测的部分。

[0217] “探针”,当提及多核苷酸而被使用时,表示能够与另一种多核苷酸的指定序列特异性杂交的多核苷酸。探针特异性杂交到靶互补多核苷酸,但是不需要反映模板的确切互补序列。在这种情况中,探针与靶标的特异性杂交取决于杂交条件的严格性。探针可以标记有例如生色部分、放射性部分或荧光部分并且用作可检测的部分。在探针提供互补多核苷酸的合成起始点的情形中,探针也可以是引物。

[0218] “载体”是可以用于将与其联接的其他核酸引入细胞中的多核苷酸。一种类型的载体是“质粒”,其表示附加的核酸节段可以被连接到其中的线形或环形双链DNA分子。另一种类型的载体是病毒载体(例如复制缺陷型反转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),其中附加的DNA节段可以被引入到病毒基因组中。某些载体能够在它们被引入的宿主细胞中自主复制(例如包含细菌复制起始区的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加型哺乳动物载体)一经引入宿主细胞中就被整合到该宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起被复制。“表达载体”是可以引导选定的多核苷酸的表达的载体类型。

[0219] “调节序列”是影响与其可操作地联接的核酸的表达(例如表达的水平、时机或位

置)的核酸。调节序列可以,例如,直接对被调节的核酸发挥其效应,或通过一种或多种其他分子(例如与调节序列结合的多肽和/或核酸)的作用发挥其效应。调节序列的示例包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如多腺苷酸化信号)。调节序列的其他示例在以下中有述:例如,Goeddel,1990,Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,Calif.,以及Baron等人,1995,Nucleic Acids Res.23:3605-06。如果调节序列影响核苷酸序列的表达(例如表达的水平、时机或位置),则该核苷酸序列被"可操作地联接"到该调节序列。

[0220] 一般而言,本公开的细胞可以是真核细胞或原核细胞。细胞可以是上皮细胞。上皮细胞可以是极化上皮细胞(例如Caco-2细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)。细胞可以是动物细胞或植物细胞。动物细胞可以包括来自海洋无脊椎动物、鱼、昆虫、两栖动物、爬行动物或哺乳动物的细胞。哺乳动物细胞可以从灵长类动物、类人猿、马科动物、牛科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物或啮齿动物获得。哺乳动物可以是灵长类动物、类人猿、狗、猫、兔子、雪貂或诸如此类。啮齿动物可以是小鼠、大鼠、仓鼠、沙鼠、仓鼠、毛丝鼠或豚鼠。鸟细胞可以来自金丝雀、长尾鹦鹉或鹦鹉。爬行动物细胞可以来自乌龟、蜥蜴或蛇。鱼细胞可以来自热带鱼。例如,鱼细胞可以来自斑马鱼(例如Danino rerio)。虫细胞可以来自线虫(例如秀丽隐杆线虫(C.elegans))。两栖动物细胞可以来自青蛙。节肢动物细胞可以来自塔兰托毒蛛或寄居蟹。

[0221] 哺乳动物细胞还可以包括从灵长类动物(例如人或非人灵长类动物)获得的细胞。哺乳动物细胞可以包括血细胞、干细胞、上皮细胞、结缔组织细胞、分泌激素的细胞、神经细胞、骨骼肌细胞或免疫系统细胞。在优选的实施方案中,本公开的方法和组合物与一种或多种哺乳动物血细胞组合使用。

[0222] "宿主细胞"是可以用于表达本公开的多核苷酸的细胞。宿主细胞可以是原核生物例如大肠杆菌,或者它可以是真核生物,例如,单细胞真核生物(例如酵母或其他真菌)、植物细胞(例如烟草或番茄植物细胞)、动物细胞(例如人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、大鼠细胞、小鼠细胞或昆虫细胞)或杂交瘤。典型地,宿主细胞是经培养的细胞,其可以被编码多肽的核酸系列转化或转染,随后其可以在宿主细胞中被表达。短语"重组宿主细胞"可以用于表示已被要表达的编码多肽的核酸系列转化或转染的宿主细胞。宿主细胞还可以是包含核酸系列的细胞,但是所述细胞没有以期望的水平表达这些,除非调节序列被引入宿主细胞中而使得其变得与核酸可操作地联接。应理解,术语宿主细胞不仅表示特定的受试者细胞,而且表示这种细胞的后代或潜在后代。因为在后代中可能由于例如突变或环境影响而出现某些修饰,这种后代实际上可能与母细胞不同,但是仍然被包括在本文使用的术语的范围内。

[0223] 术语"隔离性分子"(其中所述分子是,例如,多肽例如携带体或递送构建体,或多核苷酸)是如下分子:因其来源或衍生源,该分子(1)未与在其天然状态中所伴随的天然关联的组分相关联,(2)基本上没有来自相同物种的其他分子,(3)被来自不同物种的细胞表达,或(4)非天然存在。因此,化学合成的或者在与其天然来源的细胞不同的细胞系统中表达的分子将是与其天然关联的组分"隔离"的。还可以通过利用本领域公知的纯化技术进行分离而使得分子基本上没有天然关联的组分。分子纯度或同质性可以通过本领域公知的多种方法进行测定。例如,多肽样品的纯度可以利用聚丙烯酰胺凝胶电泳并且使用本领域中公知的技术对凝胶染色以显示多肽来测定。出于某些目的,较高分辨率的分离技术可以通

过利用HPLC或本领域公知的用于纯化的其他方法来提供。

[0224] 如本文中公开的，术语“完全胞吞转运”、“有效胞吞转运”或“胞吞转运”或“转运”可以可互换地使用，并且可以表示毒素衍生的递送构建体穿过上皮层例如肠上皮的转运。这些术语可以表示根据在利用评估胞吞转运效率的各种技术例如荧光显微镜法的相应实验中测定这些构建体的完全转运。

[0225] 如本文中使用的，术语“包含”和“具有”可以可互换地使用。例如，术语“包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽”和“具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽”可以可互换地使用。

[0226] 当样品的至少约60％至75％呈现出单一种多肽时，蛋白质或多肽是“基本上纯”、“基本上同质的”或“基本上纯化的”。多肽或蛋白质可以是单体或多聚体。基本上纯的多肽或蛋白质通常将包含约50％、60％、70％、80％或90％W/W的蛋白质样品，更普遍地约95％，例如超过99％纯度。蛋白质纯度或同质性可以通过本领域公知的多种方法来指示，例如对蛋白质样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳，而后使用本领域中公知的染色剂对凝胶的染色显示出单一多肽带。出于某些目的，较高分辨率的分离技术可以通过利用HPLC或本领域公知的用于纯化的其他方法来提供。

[0227] 如本文中所述的，“间隔区”表示将两个其他分子共价地或通过离子键、范德华力或氢键而相连接的分子，例如，核酸分子，其在5’端处与一个互补序列杂交并且在3’端处与另一互补序列杂交，由此将两个非互补的序列相连。“可裂解的间隔区”表示可以被降解或以其他方式切断而使由可裂解的间隔区连接的两个组分分离的间隔区。可裂解的间隔区一般被酶裂解，典型地被肽酶、蛋白酶、核酸酶、脂肪酶及诸如此类裂解。当在递送构建体胞吞转运而穿过极化上皮膜之后存在环境的这种改变时，可裂解的间隔区还可以因环境因素(例如具体的酶活性、温度变化、pH变化、盐浓度等变化)而裂解。因此，异源性货物(例如生物活性货物)可以以pH-依赖性和/或酶-依赖性方式从携带体释放。

[0228] “药物组合物”表示适合在动物中药用的组合物。药物组合物包含药理学有效量的活性剂和药学上可接受的运载体。“药理学有效量”表示活性剂的量有效地产生预期的药理学结果。

[0229] “药学上可接受的运载体”表示以下中的任一种：标准药学运载体、媒介物、缓冲剂和赋形剂例如磷酸盐缓冲的盐水溶液、葡萄糖的5％水溶液，以及乳剂例如油/水或水/油乳剂，以及各种类型的润湿剂和/或佐剂。适合的药学运载体和配方在Remington’s Pharmaceutical Sciences,第21版.2005,Mack Publishing Co,Easton中有述。“药学上可接受的盐”是可以被配制到药物用途的化合物中的盐，包括例如金属盐(钠盐、钾盐、镁盐、钙盐等)，以及铵盐或有机胺盐。

[0230] 术语“治疗”、“处理”和“疗法”表示减轻或消除生物病症和/或其相关症状中的至少一种的方法。如本文中使用的，“减轻”疾病、病症或病况表示降低所述疾病、病症或病况的症状的严重性和/或发病频率。此外，本文中提及的“治疗”包括提及治愈性疗法、保守性疗法和预防性疗法。

[0231] 如本文中使用的，术语“受试者”一般地表示人或另一种动物。受试者可以是任何年龄，例如，受试者可以是婴儿、学步儿童、儿童、青春期前少年、青少年、成人或老年人。

[0232] 范围在本文中可以表示为从“约”某一特定值和/或到“约”另一特定值。当表示这

种范围时，另一种实施方案包括从所述某一特定值和/或到其他特定值。类似地，当通过使用先行词“约”而将值表述为近似值时，可以理解该特定值构成另一种实施方案。还可以理解，每个范围的端点是相对于其他端点，并且独立于其他端点。如本文中使用的，术语“约”表示在具体使用的上下文中从所列数值加或减15％的范围。例如，约10可以包括从8.5至11.5的范围。

携带体

[0233] 本文中设想到各种携带体，其可以用于将货物递送到细胞(例如上皮细胞)内的位置或递送穿过细胞(例如上皮细胞)。这种携带体可以是小分子、多肽、适体、抗体、核酸，上述任一种的片段，或上述任一种的组合。

[0234] 本文中设想的多肽的示例包括任何多肽，所述多肽衍生自外毒素的结构域I并且缺少所述外毒素的结构域II、结构域Ib和结构域III。这种结构域I包括但不限于SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:137中所列的氨基酸序列。从上述序列中的任一个衍生的多肽包括相比于上述序列具有高序列同源性(例如，如本文中更详细定义的，大于80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性)的那些多肽。从上述序列中的任一个衍生的多肽包括用于将货物递送到细胞内的指定位置或递送穿过细胞(例如上皮细胞)的上述序列的片段。

[0235] 本文中设想的小分子的示例包括那些小分子，其被合理地设计为与以下受体ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和/或串珠蛋白聚糖中的一种或多种相互作用，和/或设计为与外毒素(例如Cholix或PE)的结构域I或外毒素的结构域I的功能片段具有相似或相同的3D结构。

[0236] 本文中设想的抗体或其功能性结合片段的示例包括那些抗体，其被合理地设计为与以下受体ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和/或串珠蛋白聚糖中的一种或多种相互作用，和/或设计为具有与外毒素(例如Cholix或PE)的结构域I或外毒素的结构域I的功能片段相似或相同的3D结构。

[0237] 本文中设想的核酸的示例包括那些核酸，其被合理地设计为与以下受体ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和/或串珠蛋白聚糖中的一种或多种相互作用，和/或设计为具有与外毒素(例如Cholix或PE)的结构域I或外毒素的结构域I的功能片段相似或相同的3D结构。核酸可以是mRNA、siRNA、shRNA或cDNA。

[0238] 本公开的方法和组合物是基于发明人出人意料的发现，即能够与一种或多种内源受体(例如ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和/或串珠蛋白聚糖)相互作用的携带体可以实现快速且有效地将货物递送到细胞例如上皮细胞中和/或递送穿过细胞例如上皮细胞。

[0239] 本文中所述的方法和组合物允许快速且有效地将货物分子转运和/或递送穿过上皮细胞和/或到上皮细胞(例如极化肠上皮细胞)的内部(例如到细胞内囊泡或隔室或胞质溶胶)。本公开提供构建体(例如隔离性递送构建体)，其可以包含与异源性货物偶联的携带体。本文中公开的携带体在分子大小和组成以及其他物理化学参数例如等电点、总体分子净电荷等方面可以不同。通常，如本文中进一步所述，携带体可以是小分子、多肽、适体、核酸、其片段和/或其任何组合。

[0240] 携带体可以衍生自外毒素例如本文中所述的任何外毒素。例如，携带体可以是

Cholix外毒素(Cholix)或假单胞菌外毒素A(PE)的仅包含结构域I(即缺少结构域II(有时称为易位结构域)、结构域Ib和结构域III(有时称为细胞毒性结构域))的非天然存在的形式,并且可以能够将货物(例如异源性货物例如生物分子、治疗性分子或诊断性分子)经由胞吞转运而转运和/或递送穿过完整的上皮细胞(例如极化肠上皮细胞)和上皮细胞屏障(例如受试者的Caco-2细胞单层或肠上皮),和/或(例如经由顶端胞吞和后续的内体分选和运输)到上皮细胞的内部。

[0241] 本公开提供了包含携带体的方法和组合物,其中所述携带体可以偶联到货物,并且因此可以将所述货物递送到上皮细胞中或递送穿过上皮细胞。携带体可以是多肽,其中所述多肽可以衍生自外毒素。外毒素可以是Cholix或PE或其任何组合(例如携带体包含Cholix和PE的一个或多个结构域,或其截短变体)。因此,本文所述的携带体可以包含衍生自Cholix和PE二者的元件或部分,其可以被称为嵌合携带体。如本文中进一步所述,出人意料地发现,Cholix结构域I或PE结构域I(例如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:137)或其组合可以足够快速且有效地将货物转运和递送穿过上皮细胞。这种转运和递送甚至可以优越于相应的全长Cholix或PE外毒素(分别例如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:135)的胞吞转运功能。本文中描述的外毒素衍生的携带体多肽可以利用内源性运输途径(包括内源受体和受体复合物),以实现顶端到基底胞吞转运和/或吸收到细胞例如上皮细胞(例如肠上皮细胞)的内部中。本公开的递送携带体可以进入基底外侧隔室(例如固有层)和/或上皮细胞的内部而不损害细胞或细胞层并且没有被改变、降解或修饰(例如化学地或酶促地改变或修饰)。本公开的携带体构建体(例如隔离性递送构建体)可以在胞吞转运和/或细胞内递送期间进一步利用特定的细胞内隔室以达成所述的转运效率。

[0242] 本公开提供方法和组合物,所述方法和组合物可以包含携带体,其利用(或相互作用于)一系列内源性蛋白质和受体,所述内源性蛋白质和受体参与穿过上皮细胞例如极化肠上皮细胞(例如肠上皮细胞)的顶端到基底胞吞转运过程中,以介导与货物偶联的携带体从黏膜的顶端表面环绕的管腔到黏膜的基底外侧的胞吞转运。本文中公开的递送构建体可以参与与这种蛋白质和受体的相互作用,从而实现将各种货物分子有效地转运和递送到上皮细胞内的位置,和/或穿过上皮细胞转运和递送到上皮(例如受试者的肠上皮)的基底侧。本文所述的构建体,例如递送构建体,可以包含与异源性货物偶联的携带体,其中所述携带体和/或所述异源性货物可以在细胞内递送(例如递送到上皮细胞内的核上区域或位于基底侧的隔室)期间或在胞吞转运(例如囊泡胞吞转运)期间与蛋白质和/或受体相互作用。携带体可以与一种或多种蛋白质(例如受体或酶)相互作用。这些相互作用可以是动态的和/或pH-依赖性的。应指出,本文中所述的相互作用仅是示例,并且没有限制本公开的方法和组合物的其他(例如与其他蛋白或受体)相互作用。

[0243] 本文公开的组合物和方法实现将各种货物分子(例如小分子以及大分子)有效地递送和转运穿过上皮细胞和/或到上皮细胞中。本文所述的携带体达成对货物的这种有效递送而没有损及上皮细胞屏障,也没有损及递送构建体本身。因此,在转运期间,递送构建体的功能性质(例如携带体的那些功能性质,以及货物的功能)可以得以保留,从而允许对这种货物的快速且有效的递送。本文所述的携带体利用内源性运输途径来将外源性或内源性货物分子递送到特定的位置。这些位置可以在上皮细胞内侧,和/或在基底侧上的上皮细胞外部的基底外侧隔室,例如固有层。

[0244] 本公开的携带体可以衍生自外毒素。细菌蛋白毒素在本领域中是公知的，并且在以下来源中讨论：Burns,D.等人编，BACTERIALPROTEIN TOXINS,ASM Press,Herndon Va.(2003)；Aktories,K.和Just,I.编，BACTERIAL PROTEIN TOXINS(HANDBOOK OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY),Springer-Verlag,Berlin,Germany(2000)，以及Alouf,J.和Popoff,M.编，THE COMPREHENSIVE SOURCEBOOK OF BACTERIAL PROTEIN TOXINS,Academic Press,Inc.,San Diego,Calif(第三版,2006)。

[0245] 如本文中进一步所述，外毒素可以包含一个或多个结构域。如本文中公开的，外毒素可以是Cholix或PE。对于Cholix，在本文中使用以下命名来表述其各种结构域(N-末端至C-末端)，并且使用具有SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的功能性Cholix变体作为参考序列：(i)结构域I(氨基酸残基1-265,SEQ ID NO:4)、(ii)结构域II(氨基酸残基266-386,SEQ ID NO:126)、(iii)结构域Ib(氨基酸残基387-425,SEQ ID NO:127)，以及(iv)结构域III(氨基酸残基426-634,SEQ ID NO:128)。对于PE，本文中使用以下命名来表述其各种结构域(N-末端至C-末端)，并且使用具有SEQ ID NO:135中所列的氨基酸序列的功能性PE变体作为参考序列：(i)结构域I(氨基酸残基1-252,SEQ ID NO:137)、(ii)结构域II(氨基酸残基253-364,SEQ ID NO:138)、(iii)结构域Ib(氨基酸残基365-404,SEQ ID NO:139)，以及(iv)结构域III(氨基酸残基405-613,SEQ ID NO:140)。此外，界定这些结构域的氨基酸残基范围可以是灵活的，并且约5-10个氨基酸残基的差异可以仍然落在本公开的范围内，例如，表述包含全长Cholix的氨基酸残基5-265或5-270、或1-260、或5-260的氨基酸序列可以仍然被理解为Cholix结构域I，及诸如此类。如本文中公开的，术语外毒素的“结构域I”和“受体结合域”可以可互换地使用。如本文中公开的，术语外毒素的“结构域II”和“易位结构域”可以可互换地使用。如本文中公开的，术语外毒素的“结构域III”、“催化结构域”和“细胞毒性结构域”可以可互换地使用。

[0246] 铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)外毒素A(PE)、白喉棒杆菌(Corynebacterium diphtheria)白喉携带体(DT)和霍乱弧菌(Vibrio cholera)Cholix组成了充当ADP-核糖基转移酶的细菌蛋白毒素家族。因此，携带体可以衍生自Cholix毒素。携带体可以衍生自PE。

[0247] 本文中所述的Cholix多肽可以通过一个或多个氨基酸置换而变成非毒性。本文中所述的Cholix衍生的多肽或携带体可以通过将SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列的位置581处的谷氨酸残基置换为丙氨酸而变成非毒性，从而获得包含SEQ ID NO:3中所列的氨基酸序列的Cholix构建体。

[0248] 如本文中进一步公开的，Cholix和PE被组织在不同的结构域(I、II、Ib和III)中，这些结构域是根据它们的结构关系而表示的。结构域I表现得促进外毒素内化和胞吞转运，而结构域II、Ib和III提供其他功能，例如，就结构域III而言的酶活性可以对延伸因子2进行ADP-核糖基化，从而通过阻滞蛋白合成而诱导细胞凋亡。先前尚未得知PE和Cholix蛋白的何种组分参与跨上皮胞吞转运过程。

[0249] Cholix被霍乱弧菌分泌为70.7kDa蛋白质，其由三个主要的球状结构域(Ia、II和III)以及连接结构域II和III的一个小亚结构域(Ib)构成，与PE的结构类似(Jorgensen,R.等人，J Biol Chem 283(16):10671-10678,2008)。成熟Cholix包含功能性变体属，其中每种变体相比于另一种变体可以区别在一个或多个氨基酸残基。然而，本文中公开的并且涵

盖在本公开中的全部Cholix变体都是功能性Cholix变体。如本文中使用的,Cholix是634-残基蛋白质,并且两种功能性变体被具体地包含在本文中,它们是具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的那些变体。本文中使用的编码成熟Cholix的核酸在SEQ ID NO:134中示出。

[0250] 假单胞菌外毒素A或"PE"被铜绿假单胞菌分泌为67kDa蛋白质,其由三个主要的球状结构域(Ia、II和III)以及连接结构域II和III的一个小亚结构域(Ib)构成(参见,Allured等人,Proc.Natl.Acad.Sci.83:1320 1324,1986)。本文中使用的成熟PE是613-残基蛋白质,其序列在SEQ ID NO:134中示出。本文中使用的编码成熟PE的核酸在SEQ ID NO:135中示出。

[0251] 成熟Cholix毒素的氨基酸序列在SEQ ID NO:1中列出并且用作参考序列,除非另外具体说明。例如,SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1中所列的成熟Cholix毒素的氨基酸序列的氨基酸残基1-265,并且被定义为Cholix结构域I。因此,具有SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列的多肽也可以被描述为"Chx^{1-265}"(或"$Cholix^{1-265}$"或"$Cholix^{265}$"或"Cholix结构域I")。除了SEQ ID NO:1中所列的Cholix参考序列之外,任何其他功能活性Cholix外毒素变体也被包括在本公开中,例如包含限定Cholix外毒素的功能活性的共有序列的那些变体。(参见,例如Awasthi等人,Novel Cholixtoxin variants,ADP-ribosylating toxins in Vibrio Cholerae Non-O1/Non-O139 strains,and their pathogenicity,Infection and Immunity,81(2),p.531-541(2013))。例如,具有SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列的多肽是SEQ ID NO:1的功能性变体。因此,衍生自Cholix外毒素序列的结构域I或其截短的变体可以用作携带体以便快速且有效地递送货物。使用本文中所述的命名以参考序列作为SEQ ID NO:1时,具有SEQ ID NO:2的Cholix外毒素的结构域I多肽也可以被描述为SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-4+$Cholix^{5-265}$。

[0252] 在其他情况中,如本文中所述,第一携带体和第二携带体在不同的表达系统(例如细菌或哺乳动物表达系统)中产生。细菌表达系统包括大肠杆菌,并且哺乳动物表达系统包括例如CHO细胞。通过细菌产生的多肽可以包含N-帽,其中所述N-帽可以包含在该多肽的N-末端处的一个或多个修饰。N-帽可以包含N-末端甲硫氨酸残基。可以通过细菌产生并且包含这种N-末端甲硫氨酸的Cholix结构域I衍生的携带体多肽的示例包括包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:107和SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列的那些多肽。

[0253] 本公开设想到隔离性非天然存在的和细菌毒素衍生的(例如外毒素衍生的)可以与(例如生物活性)货物偶联的携带体;其中所述携带体能够将(例如生物活性)货物经由胞吞转运而递送穿过肠上皮。携带体可以衍生自外毒素(例如Cholix或PE)的结构域I。衍生自外毒素的结构域I的携带体可以缺少外毒素(例如Cholix或PE)的结构域II(例如SEQ ID NO:126或SEQ ID NO:138)、结构域Ib(例如SEQ ID NO:127或SEQ ID NO:139)或结构域III(例如SEQ ID NO:128或SEQ ID NO:140)。

[0254] 如本文中所述,"缺少"外毒素(例如Cholix和/或PE)的结构域II、结构域Ib和结构域III的携带体可以仍然包含所述外毒素的结构域II、结构域Ib或结构域III或其组合的部分。因此,本文中提及的术语"缺少"表示携带体不包含完整的结构域II、完整的结构域Ib或完整的结构域III。携带体可以包含外毒素的结构域II、结构域Ib或结构域III的氨基酸残

基的至多70％。例如，携带体可以包含Cholix结构域I(例如SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5)或其截短的变体，并且进一步包含Cholix结构域II(SEQ ID NO:126)的氨基酸残基1-82。携带体可以包含外毒素的结构域II、结构域Ib或结构域III的氨基酸残基的至多60％。携带体可以包含外毒素的结构域II、结构域Ib或结构域III的氨基酸残基的至多50％。携带体可以包含外毒素的结构域II、结构域Ib或结构域III的氨基酸残基的至多25％。携带体可以包含外毒素的结构域II、结构域Ib或结构域III的氨基酸残基的至多10％。

[0255] 本公开设想到隔离性非天然存在的和细菌毒素衍生的(例如外毒素衍生的)可以与(例如生物活性)货物偶联的携带体；其中所述携带体能够将(例如生物活性)货物递送到上皮细胞内部例如细胞内囊泡或隔室或胞质溶胶。上皮细胞的内部中的区域和/或隔室可以包括：在上皮细胞的内部的顶端侧上的区域和/或隔室、在上皮细胞的内部的基底侧上的区域和/或隔室、上皮细胞的核上区域，或其任何组合。上皮细胞可以是极化肠上皮细胞。极化肠上皮细胞可以是极化上皮细胞单层的部分(例如包含Caco-2细胞)或它可以是受试者(例如啮齿动物或人)的肠上皮的部分。

[0256] 携带体可以衍生自细菌携带体例如外毒素(例如Cholix和/或PE)并且可以衍生自所述外毒素的结构域I并且可以缺少外毒素(例如Cholix或PE)的结构域II(例如SEQ ID NO:126或SEQ ID NO:138)、结构域Ib(例如SEQ ID NO:127或SEQ ID NO:139)或结构域III(例如SEQ ID NO:128或SEQ ID NO:140)。携带体可以包含受体结合域或结合片段，其可以是外毒素衍生的结构域I内的结构域、区域或片段，并且其允许递送构建体与上皮细胞的管腔表面上的一种或多种选择性或非选择性受体结合。受体可以是选择性受体或非选择性受体，例如肠上皮细胞的管腔表面上的非选择性清道夫受体。在上皮细胞的表面上和/或在胞吞期间可以与携带体相互作用的一种或多种受体可以包括低密度脂蛋白受体-相关蛋白1(LRP1)或跨膜蛋白132(TMEM132)。因此，递送构建体可以在足以允许胞吞的亲和力下与可能存在于上皮细胞的顶端膜上的一种或多种细胞表面受体结合。非限制地，递送构建体可以与本领域技术人员已知存在于上皮细胞的顶端膜上的任何受体结合。携带体可以结合到LRP1。携带体可以结合到TMEM132。或者，携带体可以结合到LRP1和TMEM132。

[0257] 携带体可以衍生自外毒素的结构域I。外毒素选自Cholix和PE。本文所述的携带体衍生自外毒素的结构域I，其中所述外毒素是Cholix。因此，本文所述的携带体可以包含衍生自Cholix结构域I(例如SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5)的氨基酸序列。Cholix结构域I(例如SEQ ID NO:4)可以包含SEQ ID NO:1的氨基酸1-265或它可以包含SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列(例如当通过细菌产生时，包含N-末端甲硫氨酸残基)，并且可以被描述为“受体结合域”，其充当细胞表面受体的配体并且介导Cholix结合和胞吞。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个具有大于50％同源性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个具有大于60％同源性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个具有大于70％同源性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个具有大于80％同源性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个具有大于90％同源性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个具有大于95％同源性。可以对SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一

个的氨基酸序列进行保守或非保守置换。如本文中所述，氨基酸残基置换将通过参考在特定的氨基酸残基处的具体氨基酸置换进行识别。因此，例如，术语“S30A”表示在SEQ ID NO:4中的位置30处的“S”(丝氨酸，标准单字母编码)残基已经被“A”(丙氨酸，标准单字母编码)置换，并且修饰的携带体将表示为“Cholix^{S30A}”。携带体可以是SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的Cholix结构域I序列的截短形式。因此，包含Cholix结构域I的截短形式的携带体可以包含SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列。携带体可以包含SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个的氨基酸序列，其中该序列的一个或多个氨基酸残基缺失。携带体可以包含SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个的氨基酸序列，其中一个或多个氨基酸残基可以被另一种氨基酸置换。如本文中所述，根据本文中所述的命名，截短的携带体可以通过参考包含截短毒素的氨基酸残基来标识，例如由SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-260组成的截短的Cholix携带体将被标识为Cholix^{260}，诸如此类。

[0258] 如本文所述的携带体的示例性核苷酸和氨基酸序列在下表2中示出。在各种实施方案中，携带体包含表2中所示的氨基酸序列的任一种，或其片段，或其组合。

表2-携带体的示例性核苷酸和氨基酸序列

SEQ ID NO	序列
SEQ ID NO: 1	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS

	MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSL FCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTN WTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVP RGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRA ERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLP LRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAI DEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
SEQ ID NO: 2	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSL FCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTN WTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVP RGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRA ERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLP LRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAI DEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
SEQ ID NO: 3	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSL FCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTN WTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVP RGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRA ERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLP LRNEAFTGPESAGGEDATVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAI DEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK

SEQ ID NO: 4	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSK
SEQ ID NO: 5	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY SMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSK
SEQ ID NO: 6	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQ
SEQ ID NO: 7	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY SMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQ
SEQ ID NO: 8	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK
SEQ ID NO: 9	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY SMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK
SEQ ID NO: 10	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL
SEQ ID NO: 11	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY SMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL
SEQ ID NO: 12	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS

	MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTG
SEQ ID NO: 13	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
SEQ ID NO: 14	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWH
SEQ ID NO: 15	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHW
SEQ ID NO: 16	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAH
SEQ ID NO: 17	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA
SEQ ID NO: 18	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRW
SEQ ID NO: 19	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKR
SEQ ID NO: 20	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHK
SEQ ID NO: 21	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRH
SEQ ID NO: 22	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI

	HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSR
SEQ ID NO: 23	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGS
SEQ ID NO: 24	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEG
SEQ ID NO: 25	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKE
SEQ ID NO: 26	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQK
SEQ ID NO: 27	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQ
SEQ ID NO: 28	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAA
SEQ ID NO: 29	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKA
SEQ ID NO: 30	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYK
SEQ ID NO: 31	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY SMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYK
SEQ ID NO: 32	EEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSM TINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHL DITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQ

	QRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISW PSVSYK
SEQ ID NO: 33	EALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDI TTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQ RNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPS VSYK
SEQ ID NO: 34	ALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDI TTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQ RNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPS VSYK
SEQ ID NO: 35	LNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDIT TENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQR NIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPS VSYK
SEQ ID NO: 36	NIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIND EQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITT ENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVS YK
SEQ ID NO: 37	IFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE QNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSY K
SEQ ID NO: 38	FDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIE VPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSY K
SEQ ID NO: 39	DECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQN DIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG TKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEV PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 40	ECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQND IKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 41	CRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDI KDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTK TYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPK LYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 42	RSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIK DEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKT YSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 43	SPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKD EDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTY SYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYS

	IDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 44	PCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDE DKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYS YNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 45	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDED KGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSID LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 46	SLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDK GESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 47	LTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDK GESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL DNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 48	TPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNR KEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLD NQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 49	PEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGE SIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRK EGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 50	EPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESI ITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKE GEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 51	PGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESII TIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEG EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 52	GKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIIT IGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGE FAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTL EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 53	KPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGE FAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTL EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 54	PIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGE FATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 55	IQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 56	QSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI

	NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 57	SKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 58	KLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 59	LSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 60	SIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 61	IPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 62	PSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 63	SDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 64	DVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 65	VVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 66	VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 67	LDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 68	DEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 69	EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQ

	DAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASI KISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTR PEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 70	GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQD APFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIK ISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRP EHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 71	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSY
SEQ ID NO: 72	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVS
SEQ ID NO: 73	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSV
SEQ ID NO: 74	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPS
SEQ ID NO: 75	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWP
SEQ ID NO: 76	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SW
SEQ ID NO: 77	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI S
SEQ ID NO: 78	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI
SEQ ID NO: 79	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIA
SEQ ID NO: 80	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS

	MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNI
SEQ ID NO: 81	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN
SEQ ID NO: 82	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEH
SEQ ID NO: 83	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPE
SEQ ID NO: 84	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRP
SEQ ID NO: 85	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTR
SEQ ID NO: 86	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVT
SEQ ID NO: 87	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSV
SEQ ID NO: 88	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFS
SEQ ID NO: 89	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSF
SEQ ID NO: 90	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVS
SEQ ID NO: 91	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNV
SEQ ID NO: 92	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN

SEQ ID NO: 93	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQG
SEQ ID NO: 94	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQ
SEQ ID NO: 95	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKT
SEQ ID NO: 96	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK
SEQ ID NO: 97	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQW
SEQ ID NO: 98	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
SEQ ID NO: 99	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE
SEQ ID NO: 100	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTL
SEQ ID NO: 101	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQT
SEQ ID NO: 102	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ
SEQ ID NO: 103	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDN
SEQ ID NO: 104	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLD
SEQ ID NO: 105	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL

	DQQRNIIEVPKLYSIDL
SEQ ID NO: 106	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSID
SEQ ID NO: 107	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY SMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSID
SEQ ID NO: 108	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSI
SEQ ID NO: 109	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYS
SEQ ID NO: 110	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLY
SEQ ID NO: 111	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKL
SEQ ID NO: 112	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPK
SEQ ID NO: 113	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVP
SEQ ID NO: 114	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEV
SEQ ID NO: 115	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIE
SEQ ID NO: 116	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNII
SEQ ID NO: 117	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNI
SEQ ID NO: 118	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI

	HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRN
SEQ ID NO: 119	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQR
SEQ ID NO: 120	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQ
SEQ ID NO: 121	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQ
SEQ ID NO: 122	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL D
SEQ ID NO: 123	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL
SEQ ID NO: 124	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDE
SEQ ID NO: 125	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY SMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDE
SEQ ID NO: 126	GNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPG MVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
SEQ ID NO: 127	ADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPEN
SEQ ID NO: 128	RAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAA QTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG TGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS TIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
SEQ ID NO: 129	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSL FCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPEN
SEQ ID NO: 130	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL

	DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYN YITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQ AQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINE NNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADIL SLFCPDADKSCVASNNDQANINIES
SEQ ID NO: 131	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSL FCPDA
SEQ ID NO: 132	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
SEQ ID NO: 133	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKP
SEQ ID NO: 134	GTCGAAGAAGCTTTAAACATCTTTGATGAATGCCGTTCGCCA TGTTCGTTGACCCCGGAACCGGGTAAGCCGATTCAATCAAA ACTGTCTATCCCTAGTGATGTTGTTCTGGATGAAGGTGTTCTG TATTACTCGATGACGATTAATGATGAGCAGAATGATATTAAGG ATGAGGACAAAGGCGAGTCCATTATCACTATTGGTGAATTTG CCACAGTACGCGCGACTAGACATTATGTTAATCAAGATGCGC CTTTTGGTGTCATCCATTTAGATATTACGACAGAAAATGGTAC AAAAACGTACTCTTATAACCGCAAAGAGGGTGAATTTGCAAT CAATTGGTTAGTGCCTATTGGTGAAGATTCTCCTGCAAGCAT CAAAATCTCCGTTGATGAGCTCGATCAGCAACGCAATATCAT CGAGGTGCCTAAACTGTATAGTATTGATCTCGATAACCAAAC GTTAGAGCAGTGGAAAACCCAAGGTAATGTTTCTTTTTCGGT AACGCGTCCTGAACATAATATCGCTATCTCTTGGCCAAGCGT GAGTTACAAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTTCACGCCATAAGC GTTGGGCTCATTGGCATACAGGCTTAGCACTGTGTTGGCTTG TGCCAATGGATGCTATCTATAACTATATCACCCAGCAAAATTG

	TACTTTAGGGGATAATTGGTTTGGTGGCTCTTATGAGACTGTT GCAGGCACTCCGAAGGTGATTACGGTTAAGCAAGGGATTGA ACAAAAGCCAGTTGAGCAGCGCATCCATTTCTCCAAGGGGA ATGCGATGAGCGCACTTGCTGCTCATCGCGTCTGTGGTGTGC CATTAGAAACTTTGGCGCGCAGTCGCAAACCTCGTGATCTGA CGGATGATTTATCATGTGCCTATCAAGCGCAGAATATCGTGAG TTTATTTGTCGCGACGCGTATCCTGTTCTCTCATCTGGATAGC GTATTTACTCTGAATCTTGACGAACAAGAACCAGAGGTGGCT GAACGTCTAAGTGATCTTCGCCGTATCAATGAAAATAACCCG GGCATGGTTACACAGGTTTTAACCGTTGCTCGTCAGATCTAT AACGATTATGTCACTCACCATCCGGGCTTAACTCCTGAGCAA ACCAGTGCGGGTGCACAAGCTGCCGATATCCTCTCTTTATTT TGCCCAGATGCTGATAAGTCTTGTGTGGCTTCAAACAACGAT CAAGCCAATATCAACATCGAGTCTCGTTCTGGCCGTTCATATT TGCCTGAAAACCGTGCGGTAATCACCCCTCAAGGCGTCACA AATTGGACTTACCAGGAACTCGAAGCAACACATCAAGCTCT GACTCGTGAGGGTTATGTGTTCGTGGGTTACCATGGTACGAA TCATGTCGCTGCGCAAACCATCGTGAATCGCATTGCCCCTGT TCCGCGCGGCAACAACACTGAAAACGAGGAAAAGTGGGGC GGGTTATATGTTGCAACTCACGCTGAAGTTGCCCATGGTTAT GCTCGCATCAAAGAAGGGACAGGGGAGTATGGCCTTCCGAC CCGTGCTGAGCGCGACGCTCGTGGGGTAATGCTGCGCGTGT ATATCCCTCGTGCTTCATTAGAACGTTTTTATCGCACGAATAC ACCTTTGGAAAATGCTGAGGAGCATATCACGCAAGTGATTGG TCATTCTTTGCCATTACGCAATGAAGCATTTACTGGTCCAGA AAGTGCGGGCGGGGAAGACGAAACTGTCATTGGCTGGGATA TGGCGATTCATGCAGTTGCGATCCCTTCGACTATCCCAGGGA ACGCTTACGAAGAATTGGCGATTGATGAGGAGGCTGTTGCA AAAGAGCAATCGATTAGCACAAAACCACCTTATAAAGAGCG CAAAGATGAACTTAAG
SEQ ID NO: 135	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQG VLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKP VRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLS HMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHA GVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQ QRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGG SLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVAL YLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLA LTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVVSLTCPVAAGECAG PADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVERLL QAHRQLEERGYVFVGYHGTFLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAI WRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSL PGFYRTGLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRL ETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISAL PDYASQPGKPPREDLK
SEQ ID NO: 136	GCCGAGGAAGCCTTCGACCTCTGGAACGAATGCGCCAAGGC CTGCGTGCTCGACCTCAAGGACGGCGTGCGTTCCAGCCGCA TGAGCGTCGACCCGGCCATCGCCGACACCAACGGCCAGGGC GTGCTGCACTACTCCATGGTCCTGGAGGGCGGCAACGACGC GCTCAAGCTGGCCATCGACAACGCCCTCAGCATCACCAGCG ACGGCCTGACCATCCGCCTCGAAGGTGGCGTCGAGCCGAAC

	AAGCCGGTGCGCTACAGCTACACGCGCCAGGCGCGCGGCAG TTGGTCGCTGAACTGGCTGGTGCCGATCGGCCACGAGAAGC CTTCGAACATCAAGGTGTTCATCCACGAACTGAACGCCGGT AACCAGCTCAGCCACATGTCGCCGATCTACACCATCGAGATG GGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCGCGCGATGCCACCTT CTTCGTCAGGGCGCACGAGAGCAACGAGATGCAGCCGACG CTCGCCATCAGCCATGCCGGGGTCAGCGTGGTCATGGCCCA GGCCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCTGGAGCGAATGGGCC AGCGGCAAGGTGTTGTGCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGT CTACAACTACCTCGCCCAGCAGCGCTGCAACCTCGACGATAC CTGGGAAGGCAAGATCTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGG CGAAGCATGACCTGGACATCAAGCCCACGGTCATCAGTCAT CGCCTGCATTTCCCCGAGGGCGGCAGCCTGGCCGCGCTGAC CGCGCACCAGGCCTGCCACCTGCCGCTGGAGACCTTCACCC GTCATCGCCAGCCGCGCGGCTGGGAACAACTGGAGCAGTGC GGCTATCCGGTGCAGCGGCTGGTCGCCCTCTACCTGGCGGC GCGGCTGTCGTGGAACCAGGTCGACCAGGTGATCCGCAACG CCCTGGCCAGCCCCGGCAGCGGCGGCGACCTGGGCGAAGC GATCCGCGAGCAGCCGGAGCAGGCCCGTCTGGCCCTGACCC TGGCCGCCGCCGAGAGCGAGCGCTTCGTCCGGCAGGGCAC AGGCAACGACGAGGCCGGCGCGGCCAGCGCCGACGTGGTG AGCCTGACCTGCCCGGTCGCCGCCGGTGAATGCGCGGGCCC GGCGGACAGCGGCGACGCCCTGCTGGAGCGCAACTATCCCA CTGGCGCGGAGTTCCTCGGCGACGGCGGCGACATCAGCTTC AGCACCCGCGGCACGCAGAACTGGACGGTGGAGCGGCTGC TCCAGGCGCACCGCCAACTGGAGGAGCGCGGCTATGTGTTC GTCGGCTACCACGGCACCTTCCTCGAAGCGGCGCAAAGCAT CGTCTTCGGCGGGGTGCGCGCGCGCAGCCAGGACCTCGACG CGATCTGGCGCGGTTTCTATATCGCCGGCGATCCGGCGCTGG CCTACGGCTACGCCCAGGACCAGGAACCCGACGCGCGCGGC CGGATCCGCAACGGTGCCCTGCTGCGGGTCTATGTGCCGCGC TCGAGTCTGCCGGGCTTCTACCGCACCGGCCTGACCCTGGC CGCGCCGGAGGCGGCGGGCGAGGTCGAACGGCTGATCGGC CATCCGCTGCCGCTGCGCCTGGACGCCATCACCGGCCCCGA GGAGGAAGGCGGGCGCCTGGAAACCATTCTCGGCTGGCCGC TGGCCGAGCGCACCGTGGTGATTCCCTCGGCGATCCCCACC GACCCGCGCAACGTCGGCGGCGACCTCGACCCGTCCAGCAT CCCCGACAAGGAACAGGCGATCAGCGCCCTGCCGGACTACG CCAGCCAGCCCGGCAAACCGCCGCGCGAGGACCTGAAG
SEQ ID NO: 137	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQG VLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKP VRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLS HMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHA GVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQ QRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPE
SEQ ID NO: 138	GGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRL VALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQAR LALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAAS
SEQ ID NO: 139	ADVVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDG
SEQ ID NO: 140	GDVSFSTRGTQNWTVERLLQAHRQLEERGYVFVGYHGTFLEA AQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDA

	RGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTGLTLAAPEAAGEVERLIGH PLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNV GGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK
SEQ ID NO: 141	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQG VLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKP VRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLS HMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHA GVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQ QRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGG SLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVAL YLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLA LTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVVSLTCPVAAGECAG PADSGDALLERNYPTGAEFLGDG
SEQ ID NO: 142	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQG VLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKP VRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLS HMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHA GVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQ QRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGG SLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVAL YLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLA LTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVVSLTCPVAAGECAG PADSGDALLERNYP
SEQ ID NO: 143	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQG VLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKP VRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLS HMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHA GVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQ QRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGG SLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVAL YLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLA LTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVVSLTCPVA
SEQ ID NO: 144	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQG VLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKP VRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLS HMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHA GVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQ QRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGG SLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVAL YLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLA LTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAAS
SEQ ID NO: 145	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQG VLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNKP VRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLS HMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHA GVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQ QRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGG SLAALTAHQACHLPLETFTRHRQ
SEQ ID NO: 146	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY SMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL

	DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYP VQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQP EQARLALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVVSLTCPVA AGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNW TVERLLQAHRQLEERGYVFVGYHGTFLEAAQSIVFGGVRARS QDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRV YVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPE EEGGRLTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQ AISALPDYASQPGKPPREDLK
SEQ ID NO: 147	MAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQ GVLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEPNK PVRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQL SHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISH AGVSVVMAQTQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLA QQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEG GNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPG MVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAEILSLFCP DADKSCVATNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWT YQELEATHQALTREGYVFVGYTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNT ENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA FTGPESAGGEDTVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVA KEQSISTKPPYKERKDELK

[0259] 携带体可以是衍生自Cholix外毒素的多肽，并且所述多肽具有SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的：至多5个氨基酸残基；至多10个氨基酸残基；至多15个氨基酸残基；至多20个氨基酸残基；至多30个氨基酸残基；至多40个氨基酸残基；至多50个氨基酸残基；至多60个氨基酸残基；至多70个氨基酸残基；至多80个氨基酸残基；至多90个氨基酸残基；至多100个氨基酸残基；至多110个氨基酸残基；至多120个氨基酸残基；至多130个氨基酸残基；至多140个氨基酸残基；至多150个氨基酸残基；至多160个氨基酸残基；至多170个氨基酸残基；至多180个氨基酸残基；至多190个氨基酸残基；至多200个氨基酸残基；至多210个氨基酸残基；至多220个氨基酸残基；至多230个氨基酸残基；至多240个氨基酸残基；至多250个氨基酸残基；至多260个氨基酸残基；和至多265氨基酸残基。细菌携带体的受体结合域可以是衍生自Cholix的多肽，并且所述多肽与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5具有至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或更高的序列同源性。携带体可以是衍生自Cholix的多肽，并且所述多肽与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:133中的任一个具有至多10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或99％序列同源性。氨基酸残基可以是连续的。氨基酸残基还可以是不连续的。携带体可以衍生自Cholix外毒素的结构域I。衍生自外毒素的结构域I的携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列中的任一个氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。衍生自外毒素的结构域I的携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列中的任一个氨基酸序列具有至少90％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少90％序列一

致性。衍生自外毒素的结构域I的携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列中的任一个氨基酸序列具有至少95％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少95％序列一致性。衍生自外毒素的结构域I的携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列中的任一个氨基酸序列具有至少99％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少99％序列一致性。衍生自外毒素的结构域I的携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列中的任一个氨基酸序列具有100％序列一致性，或相比于其功能片段具有100％序列一致性。

[0260] 携带体可以被人工合成。携带体可以是人工合成的多肽，所述多肽相比于Cholix结构域I(例如SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个)具有至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或更高的氨基酸序列同源性。携带体可以是合成的多肽，所述多肽相比于Cholix结构域I(例如SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个)具有至多10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或99％氨基酸序列同源性。可以构成携带体的多肽可以利用固相合成来合成。

[0261] 携带体可以是衍生自Cholix的多肽，并且所述多肽与SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个具有至多10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或99％序列同源性。携带体的氨基酸序列的某些片段可以具有与胞吞转运过程的一个或多个方面可能相关的特定功能。这些功能可以包括穿过原代人小肠上皮细胞的极化单层或完整肠上皮、实现或促进胞吞到上皮细胞中、顶端到基底转运、递送构建体从基底膜释放到基底外侧隔室中、递送到上皮细胞的细胞内囊泡或隔室或胞质溶胶中，和/或递送到上皮细胞(例如极化肠上皮细胞)的核上区域。

[0262] 因此，本公开提供携带体，所述携带体可以具有各种功能(例如胞吞、胞吞转运、细胞内递送等中的一种或多种)。这种携带体可以包含：氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性；以及来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。这种携带体可以包含SEQ ID NO:4(例如哺乳动物细胞中表达的Cholix结构域I)或SEQ ID NO:5(例如细菌细胞中表达的Cholix结构域I)中所列的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。这种携带体可以包含：氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少90％序列一致性；以及来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。携带体可以包含：氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少95％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少95％序列一致性；以及来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。携带体可以包含：氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少99％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少99％序列一致性；以及来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。携带体可以包含：氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有100％序列一致性，或相比于其功能片段具有100％序列一致性；以及来自SEQ ID NO:1的至多347个邻接的氨基酸残基。本文中公开的携带体可以包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列或其功能片段。所述携带体可以包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序

列或其功能片段。所述携带体可以包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列或其功能片段。

[0263] 本公开的功能性携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段或其任何组合具有至少90%序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段或其任何组合具有至少95%序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段或其任何组合具有至少99%序列一致性。携带体可以包含空间结构,在所述空间结构中SEQ ID NO:148或SEQ ID NO:149的一个或多个氨基酸残基邻近于SEQ ID NO:151的一个或多个氨基酸残基,并且SEQ ID NO:148或SEQ ID NO:149的一个或多个氨基酸残基邻近于SEQ ID NO:152的一个或多个氨基酸残基。

[0264] 本公开的携带体可以能够将货物递送穿过上皮细胞(例如极化上皮细胞)。这种携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80%序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少90%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少90%序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少95%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少95%序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少99%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少99%序列一致性。携带体可以进一步包含SEQ ID NO:10的氨基酸残基1-187或1-205或者SEQ ID NO:11的氨基酸残基1-186或1-206中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。携带体可以包含SEQ ID NO:30的残基1-186或SEQ ID NO:31的残基1-187和SEQ ID NO:1的至多206个邻接的氨基酸残基。

[0265] 本公开的方法和组合物可以包含携带体,所述携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:31中的任何一个中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80%序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:31中的任何一个中所列的氨基酸序列具有至少90%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少90%序列一致性。在一些情形中,携带体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:31中的任何一个中所列的氨基酸序列具有至少95%序列一致性,或相比于其功能片段具有至少95%序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:10-SEQ ID

NO:31中的任何一个中所列的氨基酸序列具有至少99％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少99％序列一致性。所述携带体可以包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列或其功能片段。

[0266] 携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。这种携带体可以能够将货物递送到细胞内位置。这种细胞内位置可以是核上区域。这种携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列具有至少90％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少90％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列具有至少95％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少95％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列具有至少99％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少99％序列一致性。携带体可以包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-151或1-187中的一个或多个氨基酸残基的缺失或突变。

[0267] 本公开的方法和组合物提供携带体，所述携带体可以缺少SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-39或SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-38中的任何一个或多个。这种携带体可以能够将货物经由胞吞而递送到细胞内位置。这种位置可以是顶端区域或隔室。携带体可以缺少SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-39或SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-38的全部。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:70中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有80％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:70中所列的氨基酸序列具有至少90％序列一致性，或相比于其功能片段具有90％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:70中所列的氨基酸序列具有至少95％序列一致性，或相比于其功能片段具有95％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:70中所列的氨基酸序列具有至少99％序列一致性，或相比于其功能片段具有99％序列一致性。携带体可以包含SEQ ID NO:5的残基1-151或SEQ ID NO:4的残基1-150和SEQ ID NO:1的至多187个邻接的氨基酸残基。

[0268] 本公开的携带体可以包含Cholix结构域I的截短变体。因此，携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:107中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。这种携带体可以能够将货物经由胞吞而递送到细胞内位置。这种位置可以是顶端和/或基底区域或隔室。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:107中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少90％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少90％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:107中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少95％序列一致性，或相比于其功能片段具有至少95％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:107中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少99％序列一致性，或相比

于其功能片段具有至少99％序列一致性。携带体可以包含SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列或其功能片段。

[0269] 本公开的携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。这种携带体可以能够将货物经由胞吞而递送到细胞内位置。这种位置可以是顶端区域或隔室。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列具有至少90％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少90％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列具有至少95％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少95％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列具有至少99％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少99％序列一致性。携带体可以进一步包含SEQ ID NO:6的氨基酸残基1-151中的一个或多个残基的缺失或突变,或SEQ ID NO:7的氨基酸残基1-150中的一个或多个残基的缺失或突变。本文中所述的携带体可以包含SEQ ID NO:5的残基1-134或SEQ ID NO:4的残基1-133和SEQ ID NO:1的至多151个邻接的氨基酸残基。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106-SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少80％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106-SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少90％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少90％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106-SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少95％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少95％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列相比于SEQ ID NO:106-SEQ ID NO:125中的任一个中所列的氨基酸序列具有至少99％序列一致性,或相比于其功能片段具有至少99％序列一致性。携带体可以包含SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:107中所列的氨基酸序列或其功能片段。

[0270] 本公开的携带体可以衍生自外毒素的结构域I。外毒素可以是Cholix。衍生自Cholix结构域I的携带体可以包含至少一个但至多20个β链。衍生自Cholix结构域I的携带体可以包含至少一个但至多15个β链。衍生自Cholix结构域I的携带体可以包含10至15个β链。衍生自Cholix结构域I的携带体可以包含至少一个但小于10个α-螺旋。衍生自Cholix结构域I的携带体可以包含1至5个α-螺旋。

[0271] 本公开的携带体可以包含Cholix结构域I的氨基酸片段,该片段可以实现、促进和/或增强Cholix衍生的携带体在顶端进入上皮细胞诸如极化肠上皮细胞中的能力。这种片段可以包括SEQ ID NO:148中所列的氨基酸序列,并且可以促进和/或增强Cholix衍生的携带体在顶端进入到顶端上皮/管腔表面上的上皮细胞中。这可以增强携带体的递送和/或转运功能,并增加递送和/或转运到上皮细胞中和/或穿过上皮细胞的货物分子的量。

[0272] 本公开的携带体可以包含Cholix结构域I的氨基酸片段,该片段可以实现、促进和/或增强如本文所述的Cholix衍生的携带体的顶端到基底的胞吞转运。实现、促进和/或

增强递送构建体的顶端到基底胞吞转运的这种氨基酸片段可以包含SEQ ID NO:149或SEQ ID NO:150中所列的氨基酸序列。这可以增强携带体的递送和/或转运功能，并增加递送和/或转运到上皮细胞中和/或穿过上皮细胞的货物分子的量。例如，包含具有SEQ ID NO:149或SEQ ID NO:150的这种片段的携带体可以增加递送和/或转运到基底室的货物分子的量。这可以进一步增强携带体的基底释放。

[0273] 本公开的携带体可以包含Cholix结构域I的氨基酸片段，该片段可以实现、促进和/或增强早期和/或后期的内体分选，从而实现、促进和/或增强Cholix衍生的携带体向上皮细胞内的核上区域的转运。Cholix结构域I的这种肽片段包含SEQ ID NO:151中所列的氨基酸序列，并且可以实现、促进和/或增强本文所述的Cholix衍生的递送构建体的早期内体分选。可以使用这种携带体靶向的核上区域可以包括内质网、高尔基体和/或内体。因此，能够进入这种区域的携带体可以向这种区域提供货物的有效递送。

[0274] 本公开的携带体可以包含Cholix结构域I的氨基酸片段，该片段可以实现、促进和/或增强Cholix衍生的递送构建体穿过完整的上皮层诸如肠上皮的完全胞吞转运。包含SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列的这种片段可以通过使携带体和/或递送构建体从上皮细胞进行基底释放而实现、促进和/或增强Cholix衍生的递送构建体的完全胞吞转运。可以例如通过测量基底外侧隔室或固有层中递送构建体的存在来确定Cholix衍生的递送构建体的完全胞吞转运。这种携带体穿过完整的上皮细胞层递送货物的能力可以具有很大的意义，因为它允许不能自行穿过这种上皮层的药物的口服施用。

[0275] 如本文所述，本公开考虑了令人惊讶的发现，即衍生自Cholix结构域I且缺乏Cholix结构域II、结构域Ib和结构域III的携带体足以快速且有效地进行顶端到基底的胞吞转运(例如，并且足以快速且有效地经由胞吞转运将货物进行顶端-基底转运)。此外，据显示，Cholix结构域I的氨基酸序列的某些部分可以具有与穿过上皮细胞的顶端到基底胞吞转运和/或向上皮细胞的胞质溶胶或内部的递送相关的特定功能。本公开的携带体可以包含SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列中的任何一个。本公开的携带体可以包含SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的Cholix结构域I的一个或多个功能性氨基酸肽片段。本公开的携带体可以包含具有SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的Cholix结构域I。

[0276] 本公开进一步考虑包含Cholix结构域I的一个或多个功能片段的携带体。功能片段可以与成熟Cholix氨基酸序列中的顺序相同，或者功能片段可以有不同的顺序而不损害这种功能片段的功能。因此，携带体可以包含衍生自Cholix结构域I并在SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中示出的一个或多个功能性氨基酸序列。这种氨基酸序列可以联接在一起以形成包含多个Cholix结构域I衍生的肽片段的聚合多肽。本公开的这种携带体可以包含SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的一个或多个氨基酸序列，或其任何组合，它们形成能够穿过上皮层诸如肠上皮进行有效胞吞转运的聚合多肽。这种聚合肽可以包含衍生自Cholix结构域I的多个氨基酸片段，并且可以使用这种聚合多肽代替Cholix结构域I多肽或其截短形式，和/或除Cholix结构域I多肽或其截短形式之外，还可以使用这种聚合多肽。与Cholix结构域I或其截短形式相比，当用作递送构建体时，这种非天然存在的合成聚合肽可以具有更好或更差的胞吞转运。这种合成多肽的功能性可以取决于几个因素，诸如空间结构和几何形状、稳定性和/或可偶联至这种多肽的货物。

[0277] 在穿过上皮细胞的胞吞转运过程期间,本公开的携带体可以不在化学、结构和/或构象方式上显著变化。因此,如本文公开的衍生自Cholix毒素的携带体(包括包含多个Cholix衍生的氨基酸片段的聚合肽)可以用作如本文所述的各种货物分子(例如,治疗性货物分子)的有效递送媒介物。如本文所述的Cholix衍生的携带体不包含结构域II和结构域III,取而代之的是附接至一个或多个货物部分(例如,治疗性货物分子),且与成熟的ntChx相比,没有降低转运和/或胞吞转运能力。

[0278] 如本文所述的携带体穿过上皮层(例如,肠上皮)的转运可以包括多个步骤。递送构建体(例如,Cholix衍生的递送构建体)的转运可以包括在多步骤过程中起作用的Cholix结构域I的元件。例如,转运或胞吞转运可以包括顶端胞吞,涉及肠上皮细胞的顶端、基底和/或核上区域的囊泡运输,以及从基底膜释放以到达固有层。此外,如本文所述的Cholix衍生的递送构建体可以利用受体介导型胞吞过程。受体介导的胞吞可以涉及与SEQ ID NO:148中所列的氨基酸或其片段或衍生物具有至少80%序列一致性的氨基酸序列,其可以提供进入肠上皮细胞的顶端部分中的早期内体囊泡隔室的入口,例如经由胞吞。与SEQ ID NO:151中所列的氨基酸或其片段或衍生物具有至少80%序列一致性的氨基酸序列可以允许、促进或增强Cholix衍生的递送构建体移向与细胞中针对分泌事件的分选位点一致的核上区域。当携带体包括与SEQ ID NO:149或SEQ ID NO:150中所列的氨基酸或其片段或衍生物具有至少80%的序列一致性的氨基酸序列时,包括Cholix衍生的携带体的递送构建体向细胞的基底室的移动可以更有效。与SEQ ID NO:149中所列的氨基酸、其片段或衍生物具有至少80%序列一致性的氨基酸序列可以提供从基底膜分泌的机制,该机制释放完整和功能型的递送构建体(例如,包括货物部分)进入基底外侧隔室或固有层,进而可以从基底外侧隔室或固有层到达生物体(例如,人或啮齿动物)内的各种其他位置(例如,细胞、组织或器官)。

[0279] 除了在胞吞转运期间携带体保持不变或未修饰之外,如本文公开的递送构建体穿过上皮屏障(例如完整的肠上皮)的转运通常不涉及肠上皮细胞中毒或破坏。因此,如本文公开的递送构建体可以包括Cholix结构域I、其片段或截短形式(例如,SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:125中的任何一个)或包含衍生自Cholix结构域I(例如,SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152)的多个氨基酸片段的聚合肽,并且其中其他结构域(例如,结构域II、结构域Ib和III)可以被各种其他部分,例如间隔区、异源性货物(例如,治疗性和/或生物活性货物)、小分子、核酸(例如,适体或干扰RNA)或其任何组合替代,如本文进一步所述。

[0280] 本公开的携带体可以用于以有效方式将各种货物分子递送到上皮细胞和/或穿过上皮细胞递送,例如,当包括与SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一项中所列的氨基酸序列具有80%序列一致性的氨基酸序列时。因此,本公开的携带体可以实现在顶端位点进行有效的胞吞并转运到上皮细胞(例如肠上皮细胞和/或极化肠上皮细胞)的内部,诸如细胞内囊泡或隔室或胞质溶胶和/或核上区域。这种携带体可以包含SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:125中的任一项中所列的氨基酸序列。因此,用于将货物分子递送到上皮细胞中的构建体可以包含截短的Cholix结构域I或Cholix结构域I的片段,其不包含SEQ ID NO:151中所列的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列或其任何组合。

[0281] 本公开的携带体可以包含一个或多个潜在的糖基化位点。一个或多个糖基化位点可以位于Cholix结构域I(例如,SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5)内。如本文所述的携带体可以

包含SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列,其中天冬酰胺残基N98、N154、N165、N224或其任何组合可以是潜在的糖基化位点。可以充当糖基化位点的这些氨基酸残基中的一个或多个的变异或突变可以影响或降低与递送构建体的胞吞转运相关的功能。表3示出了Cholix结构域I的示例性功能肽片段,其被鉴定为提供与顶端到基底胞吞转运相关的一种或多种功能。

表3-衍生自Cholix结构域I的示例性功能肽片段

SEQ ID NO	氨基酸序列
SEQ ID NO:148	ELDQQRNIIEVPKLYSID
SEQ ID NO:149	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD
SEQ ID NO:150	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD
SEQ ID NO:151	DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO:152	KAAQKEGSRHKRWAHWHTGLAL

如本文进一步所述,本公开的携带体可以包含一个或多个功能片段。这种功能片段可以包括在表3中列出的那些。因此,携带体可以包含与SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸序列具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。携带体可以包含与SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸序列具有至少90%序列一致性的氨基酸序列。携带体可以包含与SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸序列具有至少95%序列一致性的氨基酸序列。携带体可以包含与SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸序列具有至少99%序列一致性的氨基酸序列。如本文所述的携带体可以包含SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的至少一个。如本文所述的携带体可以包含SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的至少两个。如本文所述的携带体可以包含SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的至少三个。如本文所述的携带体可以包含SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的至少四个。如本文所述的携带体可以包含SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的全部。因此,如本文所述的携带体可以包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列或其功能片段。

[0282] 如本文所公开的,PE外毒素结构域I(SEQ ID NO:137)包括SEQ ID NO:135的氨基酸1-252,并且已被描述为充当细胞表面受体的配体并且介导PE与细胞的结合的“受体结合域”。因此,本公开的携带体可以衍生自PE,并且可以包含具有SEQ ID NO:137中所列的氨基酸序列的受体结合域多肽。携带体可以包含与SEQ ID NO:137具有大于50%同源性的氨基酸序列。携带体可以包含与SEQ ID NO:137具有大于60%同源性的氨基酸序列。携带体可以包含与SEQ ID NO:137具有大于70%同源性的氨基酸序列。携带体可以包含与SEQ ID NO:137具有大于80%同源性的氨基酸序列。携带体可以包含与SEQ ID NO:137具有大于90%同源性的氨基酸序列。携带体可以包含与SEQ ID NO:137具有大于95%同源性的氨基酸序列。此外,可以对SEQ ID NO:7的氨基酸序列进行保守或非保守置换,只要实质上未消除介导递送构建体与细胞结合的能力即可。携带体可以包含受体结合域,该受体结合域是SEQ ID NO:137的截短形式。携带体可以包含受体结合域多肽,其中SEQ ID NO:137的一个或多个氨基残基被删除。携带体可以包含受体结合域多肽,其中SEQ ID NO:137的一个或多个氨基残基被另一种氨基酸置换。

[0283] 衍生自PE结构域I的本公开的携带体可以包含氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:137的氨基酸序列具有至少80％同一性，或与其功能片段具有至少80％同一性。携带体可以包含在SEQ ID NO:137的氨基酸残基1-252中的一个或多个氨基酸残基中的缺失或突变。携带体可以包含氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少90％序列一致性，或与其功能片段具有至少90％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少95％序列一致性，或与其功能片段具有至少95％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有至少99％序列一致性，或与其功能片段具有至少99％序列一致性。携带体可以包含氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:137的氨基酸序列1-252具有100％序列一致性，或与其功能片段具有100％序列一致性。

[0284] 本公开的携带体(例如，细菌携带体受体结合域)可以是多肽，该多肽衍生自PE并且具有:SEQ ID NO:137的至多5个氨基酸残基；至多10个氨基酸残基；至多15个氨基酸残基；至多20个氨基酸残基；至多30个氨基酸残基；至多40个氨基酸残基；至多50个氨基酸残基；至多60个氨基酸残基；至多70个氨基酸残基；至多80个氨基酸残基；至多90个氨基酸残基；至多100个氨基酸残基；至多110个氨基酸残基；至多120个氨基酸残基；至多130个氨基酸残基；至多140个氨基酸残基；至多150个氨基酸残基；至多160个氨基酸残基；至多170个氨基酸残基；至多180个氨基酸残基；至多190个氨基酸残基；至多200个氨基酸残基；至多210个氨基酸残基；至多220个氨基酸残基；至多230个氨基酸残基；至多240个氨基酸残基；至多250个氨基酸残基；至多260个氨基酸残基；以及至多265个氨基酸残基。细菌携带体受体结合域可以是多肽，该多肽衍生自PE并且与SEQ ID NO:137具有至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或更大的序列同源性。细菌携带体受体结合域可以是多肽，该多肽衍生自PE并且与SEQ ID NO:137具有至多10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或99％序列同源性。氨基酸残基可以是连续的。氨基酸残基可以是不连续的。

[0285] 本公开的携带体可以包含结合域，该结合域是与PE结构域I具有至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或更大的氨基酸序列同源性的人工合成多肽。包含受体结合域的携带体可以是与SEQ ID NO:137中所列的PE结构域I具有至多10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或99％氨基酸序列同源性的合成多肽。可以使用固相合成或重组表达来合成多肽。

[0286] 能够穿过上皮细胞(例如，极化的上皮细胞)递送货物的本公开的携带体可以包含受体结合域多肽(例如，结构域I或其衍生物)，其中一种细菌携带体受体结合域多肽的一个或多个氨基酸残基被第二细菌携带体受体结合域多肽的一个或多个氨基酸残基替代(以下也称为“混合受体结合域多肽”)。例如，携带体可以包含氨基酸序列，其中SEQ ID NO:4的一个或多个氨基酸残基被SEQ ID NO:137的一个或多个氨基酸残基替代。替代地，携带体可以包含氨基酸序列，其中SEQ ID NO:137的一个或多个氨基酸残基被SEQ ID NO:4的一个或多个氨基酸残基替代。此外，这种携带体可以包含氨基酸序列，其中SEQ ID NO:4(Cholix)的氨基酸残基77-87被第二细菌携带体受体结合域多肽(例如，PE结构域I)的氨基酸残基替代。携带体可以包含氨基酸序列，其中SEQ ID NO:4的氨基酸残基188-236被第二细菌携带体受体结合域多肽的氨基酸残基替代。携带体可以包含氨基酸序列，其中SEQ ID NO:137的

氨基酸残基69-71被第二细菌携带体受体结合域多肽的氨基酸残基替代。携带体也可以包括氨基酸序列,其中SEQ ID NO:137的氨基酸残基177-228被第二细菌携带体受体结合域多肽的氨基酸残基替代。因此,本公开的携带体可以包含氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:4具有至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更大的序列同源性并且与SEQ ID NO:137具有至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更大的序列同源性。

[0287] 衍生自外毒素的结构域I的本公开的携带体可以进一步包含外毒素易位结构域的部分,或修饰的易位结构域元件。易位结构域可以是外毒素的结构域II。衍生自外毒素的结构域I的本公开的携带体可以进一步包含非毒性催化结构域的部分,或修饰的无毒催化结构域元件。非毒性催化结构域可以是外毒素的修饰的结构域III,例如那些包含一个或多个氨基酸变异和/或一个或多个氨基酸残基的缺失而使结构域III非毒性的经修饰结构域III(例如,E581A置换(例如,SEQ ID NO:3)或ΔE581缺失)。易位结构域或修饰的易位结构域和非毒性催化结构域或修饰的非毒性催化结构域可以衍生自相同的细菌性毒素。替代地,易位结构域或修饰的易位结构域和非毒性催化结构域或修饰的非毒性催化结构域可以衍生自选自以下的细菌携带体:Cholix携带体(Cholix)和假单胞菌外毒素(PE)、肉毒杆菌毒素、白喉毒素、百日咳毒素、霍乱毒素、不耐热大肠杆菌肠毒素、志贺菌毒素和志贺菌样毒素。

[0288] 如本文所述,Cholix结构域II(SEQ ID NO:126)包含SEQ ID NO:1的氨基酸266-386。本公开的携带体可以包括包含SEQ ID NO:126的整个氨基酸序列的Cholix衍生的携带体,或可以包括SEQ ID NO:126的部分。此外,可以对SEQ ID NO:126进行保守或非保守置换。本文描述了可以被本领域技术人员常规地用来确定胞吞转运结构域是否具有胞吞转运活性的代表性测定法。携带体可以包含SEQ ID NO:126的整个氨基酸序列的至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的氨基酸残基。本公开的携带体可以包含截短的Cholix结构域II,例如被鉴定为$Cholix^{425}$(SEQ ID NO:129)、$Cholix^{415}$(SEQ ID NO:130)、$Cholix^{397}$(SEQ ID NO:131)、$Cholix^{386}$(SEQ ID NO:132)、$Cholix^{291}$(SEQ ID NO:133)和$Cholix^{265}$(SEQ ID NO:4)的那些。

[0289] 如本文所述,PE结构域II(SEQ ID NO:138)包含SEQ ID NO:135的氨基酸253-364。本公开的携带体可以包括包含SEQ ID NO:137的整个氨基酸序列的PE携带体,或可以包括SEQ ID NO:137的部分。例如,在本文中表明,与Cholix外毒素结构域I类似,PE结构域I可以足以于快速且有效进行顶端到基底胞吞转运。因此,如上文针对Cholix衍生的携带体所述,PE结构域II的部分可以用作间隔区以附接进一步有效载荷,诸如异源性货物。此外,可以对SEQ ID NO:137进行保守或非保守置换。本文描述了可以被本领域技术人员常规地用来确定胞吞转运结构域是否具有胞吞转运活性的代表性测定法。如本文所用,只要与包含SEQ ID NO:137的整个氨基酸序列的PE携带体相比,活性为例如至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%,则胞吞转运活性实质上未消除。因此,本公开的携带体可以包含截短的PE结构域II,例如被鉴定为PE^{404}(SEQ ID NO:141)、PE^{395}(SEQ ID NO:142)、PE^{376}(SEQ ID NO:143)、PE^{364}(SEQ ID NO:144)、PE^{277}(SEQ ID NO:145)和PE^{252}(SEQ ID NO:146)的那些。

[0290] 本公开的携带体可以包含受体结合域和易位结构域(例如,结构域II)或修饰的易位结构域(例如,修饰的结构域II),并且可以进一步包含非毒性催化结构域(例如,结构域III)或修饰的非毒性催化结构域(例如,修饰的结构域III)。非毒性催化结构域或修饰的非毒性催化结构域可以衍生自选自以下的细菌携带体:Cholix携带体(Cholix)和假单胞菌外毒素(PE)、肉毒杆菌毒素、白喉毒素、百日咳毒素、霍乱毒素、不耐热大肠杆菌肠毒素、志贺菌毒素和志贺菌样毒素。在各种实施方案中,易位结构域或修饰的易位结构域和非毒性催化结构域或修饰的非毒性催化结构域可以衍生自相同的细菌性毒素。

[0291] 如本文所述,Cholix结构域III(SEQ ID NO:128)包含SEQ ID NO:1的氨基酸426-634,并且已被描述为负责细胞毒性的催化结构域,并且包含内质网滞留序列。结构域III介导延伸因子2("EF2")的ADP核糖基化,其使蛋白质合成失活。"缺乏内源性ADP核糖基化活性"的携带体或"解毒的Cholix"是指本文所述的任何Cholix衍生的携带体(包括修饰的变体),其不包含SEQ ID NO:128所示的整个氨基酸序列(例如,结构域III的一部分)。这种携带体可以以使分子解毒的方式在SEQ ID NO:128内包含一个或多个修饰。例如,SEQ ID NO:128的氨基酸位置156处的谷氨酸(Glu)残基的缺失使分子解毒。在各种实施方案中,SEQ ID NO:128中除ER滞留信号之外的部分可以被另一个氨基酸序列替代。这种氨基酸序列本身可以是非免疫原性的、轻微免疫原性的或高度免疫原性的。高度免疫原性的ER滞留结构域优选用于引发体液免疫应答。例如,Cholix结构域III本身具有高度免疫原性,并且可以在需要稳健的体液免疫应答时用于递送构建体中。

[0292] 如本文所述,PE结构域III(SEQ ID NO:140)包含SEQ ID NO:3的氨基酸405-613,并且已被描述为负责细胞毒性的催化结构域,并且包括内质网滞留序列。结构域III介导延伸因子2("EF2")的ADP核糖基化,其使蛋白质合成失活。"缺乏内源性ADP核糖基化活性"的PE衍生的携带体或"解毒的PE"是指本文所述的任何PE(包括修饰的变体或衍生物),其不包含SEQ ID NO:140和/或已在SEQ ID NO:140中以使分子解毒的方式被修饰。例如,SEQ ID NO:140的氨基酸位置149处的谷氨酸(Glu)残基的缺失使分子解毒。在各种实施方案中,除ER滞留信号之外的PE结构域III中的部分可以被另一个氨基酸序列替代。这种氨基酸序列本身可以是非免疫原性的、轻微免疫原性的或高度免疫原性的。高度免疫原性的ER滞留结构域优选用于引发体液免疫应答。例如,PE结构域III本身具有高度的免疫原性,并且可以在需要稳健的体液免疫应答时用于递送构建体中。

[0293] 本公开考虑这种携带体,其可以包含具有衍生自SEQ ID NO:137中所列的序列的氨基酸序列的受体结合域多肽、具有衍生自SEQ ID NO:138中所列的序列的氨基酸序列的易位结构域,以及具有衍生自SEQ ID NO:140中所列的序列的氨基酸序列的非毒性催化结构域。本公开考虑这种携带体,其可以包含具有衍生自SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所列的序列的氨基酸序列的受体结合域多肽、具有衍生自SEQ ID NO:126中所列的序列的氨基酸序列的易位结构域,以及具有衍生自SEQ ID NO:128中所列的序列的氨基酸序列的非毒性催化结构域。

[0294] 除了包含外毒素的结构域I和/或结构域II和结构域III的部分的携带体之外,本公开提供了可以包含Cholix结构域Ib(SEQ ID NO:127)或其部分的携带体。Cholix结构域Ib(SEQ ID NO:127)由SEQ ID NO:1的氨基酸387-425组成。因此,衍生自外毒素的结构域I的携带体可以进一步包含SEQ ID NO:127中所列的氨基酸序列,或在SEQ ID NO:127内的氨

基酸残基处截短的修饰序列。本文所述的PE结构域Ib(SEQ ID NO:139)由SEQ ID NO:135的氨基酸365-404组成。因此,包括含体结合域和易位结构域或修饰的易位结构域以及非毒性催化结构域或修饰的非毒性催化结构域的PE衍生的携带体可以进一步包含SEQ ID NO:139中所列的氨基酸序列,或在SEQ ID NO:139的氨基酸残基处截短的修饰序列。

[0295] 本公开的携带体可以包含结构域II、结构域Ib或结构域III中一个或多个的部分,其中那些部分(例如,其某些氨基酸序列)可以是本文进一步描述的间隔区的部分。

[0296] 本公开的方法和组合物考虑可以包含第一部分和第二部分的携带体,其中第一部分衍生自第一外毒素,而第二部分衍生自第二外毒素,并且其中携带体可以偶联至货物(例如异源性货物,诸如生物活性货物)。第一外毒素可以是Cholix,而第二外毒素可以是PE。第一部分可以衍生自Cholix的结构域I、结构域II、结构域Ib或结构域III或其任何组合。第一部分可以包含与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:133中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。第一部分可以包含与SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。第一部分可以包含与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。第二部分可以衍生自PE的结构域I、结构域II、结构域Ib或结构域III或其任何组合。第二部分可以包含与SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:145中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段或其任何组合具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。可以将第一部分化学偶联或重组偶联至第二部分。第一部分还可以与第二部分直接或间接偶联。这种携带体可以包含与SEQ ID NO:146或SEQ ID NO:147中所列的氨基酸序列具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。

[0297] 通常,本公开的携带体可以包含多肽,其中该多肽可以包括外毒素的结构域I的至少110个氨基酸残基。携带体可以包含外毒素的结构域I的至少120个氨基酸残基。携带体可以包含外毒素的结构域I的至少130个氨基酸残基。携带体可以包含外毒素的结构域I的至少140个氨基酸残基。携带体可以包含外毒素的结构域I的至少150个氨基酸残基。携带体可以包含外毒素的结构域I的至少50个连续的氨基酸残基。携带体可以包含外毒素的结构域I的至少60个连续的氨基酸残基。携带体可以包含外毒素的结构域I的至少75个连续的氨基酸残基。携带体可以包含外毒素的结构域I的至少100个连续的氨基酸残基。携带体可以包含外毒素的结构域I的至少150个连续的氨基酸残基。

[0298] 本公开的方法和组合物考虑可以在N末端包含一个或多个修饰的携带体。这种修饰可以包括至少一个N末端甲硫氨酸残基。至少一个N末端甲硫氨酸残基可以是如本文所述的N帽的部分。与参考序列相比,包含N帽的携带体可以在前5-10个氨基酸残基中进一步包含一个或多个氨基酸变异。因此,SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的一个或多个第一N末端氨基酸残基可以被其他氨基酸残基置换,只要可以限定功能性Cholix的共有序列不被改变。除了这种氨基酸变异之外,本文所述的包含N帽的携带体可以进一步包含N末端甲硫氨酸残基。N帽也可以仅包含N末端甲硫氨酸残基的添加。包含这种N帽(例如,附加的N-末端甲硫氨酸)的本公开的示例性携带体是列于SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:125中的任一项。如本文所述,这种携带体的功能变体可以包含氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID

NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:125中的任一项中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性，或与其功能片段具有80％序列一致性。

[0299] 通常，并且如本文进一步所述，“Cholix”(本文也称为Cholix毒素或Cholix外毒素)可以包括多种功能变体(例如，功能性种类)，其中该功能变体的氨基酸序列相对于如本文公开的SEQ ID NO:1可以包含一个或多个变异。因此，在本公开中，当提及Cholix时，将具有SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的Cholix毒素用作参考序列。然而，如本文所述，本公开不限于具有SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的Cholix，而是包括落入Cholix功能性种类内的所有Cholix变体。例如，第一Cholix结构域I多肽(例如，第一携带体)可以包含SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列，并且第二Cholix结构域I多肽(例如，第二携带体)可以包含SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列，其中第一多肽和第二多肽能够执行相同的功能，例如穿过上皮细胞胞吞转运，并且与相同的受体，诸如ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和/或串珠蛋白聚糖相互作用。如本文所述，第一携带体和第二携带体可以在相同的表达系统中产生(例如，细菌表达系统，诸如大肠杆菌或哺乳动物表达系统，诸如CHO细胞)。在其他情况下，并且如本文所述，第一携带体和第二携带体在不同的表达系统(例如细菌或哺乳动物表达系统)中产生。

[0300] 本公开的携带体可以包含允许与内源受体相互作用和/或进入内源转运和胞吞转运系统的性质。因此，衍生自Cholix结构域I并且包含SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125或SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:152中的任一项中所列的氨基酸序列的本公开的携带体可以与一种或多种内源受体相互作用。这种内源受体可以包括TMEM132A、GPR75、ERGIC-53和/或串珠蛋白聚糖及其任何组合。这种相互作用可以提供穿过上皮细胞(例如顶端到基底)的胞吞转运和/或向上皮细胞内部的转运。这些相互作用允许快速且有效的递送。这些相互作用进一步提供了转运机制，该机制可以不改变携带体所递送到或所转运穿过的细胞的携带体。例如，本文所述的携带体在从上皮细胞的基底膜释放后没有示出任何化学修饰，表明本公开的携带体可以利用一种或多种内源性转运系统将货物递送到上皮细胞中和/或穿过上皮细胞。可以与携带体和/或包含携带体的递送构建体相互作用的受体包括但不限于ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53或串珠蛋白聚糖中的任何一种或其任何组合。例如，携带体和/或包含携带体的递送构建体与ERGIC-53(也称为LAMN1)的相互作用可以是胞吞和/或胞吞转运过程的组成型部分，因为该受体是在携带体的管腔内施用后可以颠覆其细胞分布的唯一的相互作用蛋白。而且，并且如本文所证明，ERGIC-53(LAMN1)已经涉及从高尔基体到ER的间接逆行途径，表明该途径可以描述为有效且快速的途径。

[0301] 本公开提供了包括携带体的方法和组合物，该携带体允许穿过细胞例如上皮细胞的快速且有效的货物转运和递送。如本文所述的携带体可以以约10^{-10}cm/sec至约10^{-2}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。携带体可以以约10^{-9}cm/sec至约10^{-3}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。携带体可以以约10^{-8}cm/sec至约10^{-4}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。携带体可以以约10^{-7}cm/sec至约10^{-5}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。携带体可以以约10^{-6}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。携带体可以以至少10^{-8}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。携带体可以以至少10^{-7}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。携带体可以以至少10^{-6}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。携带体可以以至少10^{-5}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。携带体可以以至少

10^{-4}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。携带体可以以至少10^{-3}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。携带体可以以至少10^{-2}cm/sec的转运速率穿过上皮细胞转运货物。

递送构建体

[0302] 本公开的方法和组合物提供了快速且有效地将货物转运到上皮细胞内和/或穿过上皮细胞的携带体分子。如本文所述，可以通过将货物偶联至携带体来实现货物的递送和/或转运。这种构建体在本文中可以指“递送构建体”。如本文所述，本公开考虑可以包含小分子、多肽、适体、其片段或其任何组合的携带体。如本文所述，携带体可以衍生自外毒素。外毒素可以是Cholix或PE。携带体可以直接或间接偶联到货物。携带体可以共价或非共价偶联至货物。因此，递送构建体可以进一步包含将携带体联接至货物的间隔区。间隔区可以是将携带体联接至货物的任何分子，并且可以包括低聚或多聚的间隔区(例如，聚乙二醇等)和氨基酸。此外，可以通过合成或重组(例如在大肠杆菌或CHO细胞中)产生包含偶联至货物的携带体和任选的间隔区和/或另一功能性部分的递送构建体。

[0303] 如本文公开的，术语“递送构建体”、“毒素衍生的递送构建体”、“嵌合构建体”、“蛋白质”和“融合蛋白”可以互换使用，并且可以指包含至少一个递送或携带体结构域(例如，Cholix或PE结构域I衍生的携带体，小分子、适体或其任何组合)和至少一种异源性货物分子诸如治疗性货物分子的构建体。术语“异源性货物”可以指与这些外毒素无关联。如本文进一步所述，细菌携带体(例如，Cholix或PE)的毒性(例如，肠上皮细胞的中毒)可能不是携带体穿过完整上皮层诸如肠上皮进行有效转运的必要需求。相反，本文证明了衍生自外毒素诸如Cholix和PE的结构域I(例如，结构域I的截短形式)的携带体足以穿过上皮细胞(例如极化的上皮细胞)进行快速且有效的胞吞转运。

[0304] 通常，递送构建体(例如，隔离性递送构建体)包含提供了货物向某位置的快速且有效的递送和/或转运的携带体，其中该位置可以是器官、组织、细胞或细胞隔室。货物分子可以直接或间接偶联至携带体。偶联到携带体的货物可以是异源性货物(例如，不衍生自携带体本身)。因此，本文所述的递送构建体可以包含偶联至异源性货物的携带体。携带体可以包含某些功能，这些功能允许将货物快速且有效地转运到一位置，例如上皮细胞内的位置或基底外侧隔室内的位置。本文考虑的携带体可以衍生自外毒素。外毒素可以是Cholix或PE。衍生自Cholix的携带体可以包含与SEQ ID NO:1具有至少80％序列一致性，或与其功能片段具有至少80％序列一致性的氨基酸序列。应该指出，Cholix(本文中也称为Cholix毒素或Cholix外毒素)可以包括多种功能变体(例如，功能性种类)，其中该功能变体的氨基酸序列相对于如本文公开的SEQ ID NO:1可以包含一个或多个变异。因此，在本公开中，当提及Cholix时，将具有SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的Cholix毒素用作参考序列。然而，如本文所述，本公开不限于具有SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的Cholix，而是包括落入Cholix的功能性种类内的所有Cholix变体。例如，第一Cholix结构域I多肽(例如，第一携带体)可以包括SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列，并且第二Cholix结构域I多肽(例如，第二携带体)可以包括SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列，其中第一多肽和第二多肽能够执行相同的功能，例如穿过上皮细胞胞吞转运，并且与相同的受体，诸如ribophilin 1、SEC24(也可以称为COPII外壳复合物组分)、细胞角蛋白8(CK-8)、跨膜蛋白132(TMEM132)、葡萄糖调节的蛋白75(GRP75)、内质网高尔基体中间隔室53(ERGIC-53，数字53可以指其分子量约为53kDa)和/或串珠蛋白聚糖(也称为基底膜特异性硫酸乙酰肝素蛋白聚糖核心蛋白或HSPG)

相互作用。如本文所述，第一携带体和第二携带体可以在相同的表达系统中产生(例如，细菌表达系统，诸如大肠杆菌或哺乳动物表达系统，诸如CHO细胞)。如本文所述，第一携带体和第二携带体可以在不同的表达系统(例如细菌或哺乳动物表达系统)中产生。

[0305] 重要的是，本文考虑的递送构建体可以提供优于常规递送方式的优点。这种优点可以包括但不限于：a)有助于生产递送构建体；b)有助于嵌合体构建体的重折叠；c)有助于递送构建体的配制；d)有助于降低货物对蛋白水解破坏的敏感性；e)在储存期间提高递送构建体的稳定性；f)在结构域I的细菌携带体元件在不带有间隔区或具有不可裂解的间隔区的情况下偶联至异源性(例如，生物活性)货物的实施方案中，结构域I的细菌携带体元件可以在胞吞转运之后起到将嵌合体保留在体内的选定位置的作用，这导致生物活性(或诊断性)货物更多地暴露于特定细胞，以提供改善的药效学；g)在结构域I的细菌携带体元件在带有间隔区的情况下偶联至异源性(例如，生物活性)货物且该间隔区可以被存在于上皮细胞的基底外侧膜上的酶或存在于受试者的血浆中的酶裂解的实施方案中，这种裂解将允许异源性(例如，生物活性)货物在穿过上皮膜胞吞转运后立即从构建体的其余部分释放；h)将异源性货物直接递送至上皮细胞的内部，诸如上皮细胞的细胞内囊泡或隔室或胞质溶胶或核上区域；i)将异源性(例如，生物活性)货物直接递送至粘膜下GI空间和肝门系统可以减少通过肠胃外途径施用该货物时观察到的全身毒性，并且能够进入难以经由非口服或GI途径来靶向的粘膜下目标生物学；j)通过使用内源转运和递送机制，本文公开的递送构建体不损害上皮层；k)一旦转运穿过GI上皮，与非融合状态的生物活性货物相比，递送构建体或生物活性货物将呈现出延长的血清半衰期；l)与在受试者血浆中观察到的相比，递送构建体的口服施用可以将增加的有效浓度的生物活性货物递送至受试者的肝脏；以及m)无需使用针来穿刺受试者的皮肤就可以将生物活性货物递送至受试者的能力，从而通过避免疼痛或与之相关的潜在并发症来改善这些受试者的生活质量，此外还改善了患者/护理者的便利性和顺应性。

[0306] 本公开提供了用于将货物分子递送和转运穿过上皮细胞(例如，经由胞吞转运)和/或进入到上皮细胞内部的方法和组合物。本文公开的方法和组合物可以包括递送构建体，其中该递送构建体包括偶联至异源性货物的携带体(例如，经由间隔区)。本文所述的使用本公开的携带体的转运和递送过程可以包括在上皮细胞的顶端侧的胞吞。取决于携带体是被构造成将货物转运到上皮细胞内还是穿过上皮细胞，转运过程可以包括在基底侧释放递送构建体。此外，在将货物转运到那些不同位置时可能涉及各种机制。例如，将货物递送至上皮细胞的细胞内囊泡或隔室或胞质溶胶可以包括将包含偶联至该货物的携带体的递送构建体从囊泡释放到细胞内囊泡或隔室或胞质溶胶中。作为另一个示例，递送构建体的胞吞转运可以包括囊泡胞吞转运，并且照这样，可以包括在胞吞转运期间将递送构建体包封在囊泡中，使得递送构建体可以与或可以不与细胞内胞质溶胶接触。

[0307] 本公开的方法和组合物可以包括将货物转运到某个位置，使得该货物在该位置停留一定的时间量。例如，货物分子可以保留在使用本文所述的组合物来靶向的细胞内或基底外侧位置。保留可导致货物分子引起某种反应或生物学作用(例如治疗作用)。因此，本公开提供了允许将货物递送至穿过上皮细胞内的位置的方法和组合物，使得递送构建体(和货物)在该位置处保留特定的时间量。可以例如通过使货物从携带体上裂解或通过使携带体可逆地或不可逆地结合存在于该位置的某种蛋白质(例如受体)，来调节这种保留。

[0308] 本公开的递送构建体可以包含携带体，其中携带体可以被构造为靶向上皮细胞内部或穿过上皮细胞的某个位置。这种位置可以是器官、组织、细胞或细胞隔室。通过靶向这种位置，本文所述的方法和组合物可以用于各种应用，例如，包括在体外或体内穿过完整的上皮膜而递送货物的那些应用。

[0309] 如本文所述，可以以本文所述的任何方式将携带体偶联至异源性货物。递送构建体包含通过间隔区偶联至异源性货物的携带体。间隔区可以包含本文列举的任何部分，并且可以包含SEQ ID NO:166-SEQ ID NO:213中所列的氨基酸序列中的任何一个。间隔区可以是可裂解的间隔区。间隔区可以是不可裂解的间隔区。间隔区可以包括SEQ ID NO:210中所列的氨基酸序列、或其片段或衍生物。

[0310] 通常，并且如本文所述，本文公开的任何携带体(例如，表2和表3中列出的那些)可以与本文所述的任何一种货物分子(例如，表11和表12中列出的那些)组合，并且任选地与本文所述的任何间隔区(例如，表7-10中所列的那些以及具有SEQ ID NO:207-SEQ ID NO:213中所列的氨基酸序列的那些)组合，以形成递送构建体。因此，本文所述的携带体可以衍生自外毒素。携带体可以衍生自外毒素的结构域I。外毒素可以是Cholix或PE。本文考虑的递送构建体可以包括衍生自Cholix的携带体，其中该携带体可以包含偶联至异源性货物的与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:125中的任一项中所列的氨基酸序列具有至少80％序列一致性的氨基酸序列。携带体可以包含与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:125中的任一项中所列的氨基酸序列具有至少90％序列一致性的氨基酸序列。携带体可以包含与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:125中的任一项中所列的氨基酸序列具有至少95％序列一致性的氨基酸序列。携带体可以包含与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:125中的任一项中所列的氨基酸序列具有至少99％序列一致性的氨基酸序列。可以衍生出携带体的外毒素可以是PE。因此，包含携带体的递送构建体可以包含偶联至异源性货物的具有与SEQ ID NO:137中所列的氨基酸序列或其功能片段具有至少80％序列一致性的氨基酸序列。

[0311] 如本公开中所述的示例性递送构建体在以下表4中示出。

表4-示例性递送构建体的氨基酸序列

SEQ ID NO	氨基酸序列
SEQ ID NO: 153	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPE HNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPM DAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQK PVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDD LSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLS DLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG AQAGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQL

	AFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREET QQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNV YDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHN DDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 154	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPE HNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPM DAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQK PVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDD LSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLS DLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG AQAGGGGSGGGGSGGGGSMHSSALLCCLVLLTGVRASPGQG TQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNL LLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIK AHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFN KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
SEQ ID NO: 155	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPE HNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPM DAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQK PVEQRIHFSKGGGGSGGGGSGGGGSMAALQKSVSSFLMGTL ATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFML AKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTL EEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQR NVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
SEQ ID NO: 156	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPE HNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPM DAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQK PVEQRIHFSKMRSSKNVIKEFMRFKVRMEGTVNGHEFEIEGE GEGRPYEGHNTVKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGSKVYV KHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQ DGCFIYKVKFIGVNFPSDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDG VLKGEIHKALKLKDGGHYLVEFKSIYMAKKPVQLPGYYYVD SKLDITSHNEDYTIVEQYERTEGRHHLFL
SEQ ID NO: 157	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYY SMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFG VIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISV DELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEH NIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMD AIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP VEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDL SCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSD LRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRA

	VITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQ TIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG TGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDATVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELKMRSSK NVIKEFMRFKVRMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEGHNTVKL KVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGSKVYVKHPADIPDYKKLSFPE GFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGCFIYKVKFIGVNFPS DGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIHKALKLKDGG HYLVEFKSIYMAKKPVQLPGYYYVDSKLDITSHNEDYTIVEQ YERTEGRHHLFL
SEQ ID NO: 158	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDEGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQL AFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREET QQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNV YDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHN DDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 159	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSR LFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQT SLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRS VFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQ IFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRI VQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 160	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPE HNIAISWPSVSYKGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAM LRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSL VYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTY SKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRS VEGSCGF
SEQ ID NO: 161	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPE HNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLGGGGSGGG GSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYI PKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISL LLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQT LMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYC FRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 162	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS

	VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPE HNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPM DAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKGGGGSGGGGS GGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPK EQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLI QSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLM GRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFR KDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 163	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPE HNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPM DAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGGGG SGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEF EEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLEL LRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLE EGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNY GLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 164	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKIS VDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPE HNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPM DAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQK PVEQRIHFSKGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRA HRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTP SNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYG ASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKF DTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEG SCGF
SEQ ID NO: 165	GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQ DAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPAS IKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSV TRPEHNIAISWPSVSYKAGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLF DNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSL CFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF ANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIF KQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIV QCRSVEGSCGF

[0312] 本公开的方法和组合物可以包括递送构建体，该递送构建体包含氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:153-SEQ ID NO:165中的任一项中所列的氨基酸序列具有至少80％的序列一致性，或与其功能片段具有至少80％的序列一致性。递送构建体可以包含氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:153-SEQ ID NO:165中的任一项中所列的氨基酸序列具有至少90％的序列一致性，或与其功能片段具有至少90％的序列一致性。递送构建体可以包含氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:153-SEQ ID NO:165中的任一项中所列的氨基酸序列具有至少95％的序列一致性，或与其功能片段具有至少95％的序列一致性。递送构建体可以包含氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:153-SEQ ID NO:165中的任一项中所列的氨基酸序列具有至少99％的序列一致性，或与其功能片段具有至少99％的序列一致性。递送构建体可以包含氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:153-SEQ ID NO:165中的任一项中所列的氨基酸序列具有100％的序列一致性，或与其功能片段具有100％

的序列一致性。

[0313] 可以形成如本文所述的递送构建体的各种携带体、间隔区和异源性货物的示例性组合在以下表5中示出。

表5-示例性递送构建体

携带体(SEQ ID NO)	间隔区(SEQ ID NO)	生物活性货物(SEQ ID NO)
SEQ ID NO: 4-5	无间隔区	SEQ ID NO: 214-220
SEQ ID NO: 4-5	SEQ ID NO: 187-206	SEQ ID NO: 214-220
SEQ ID NO: 4-5	SEQ ID NO: 207-211	SEQ ID NO: 214-220
SEQ ID NO: 137	无间隔区	SEQ ID NO: 214-220
SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 187-206	SEQ ID NO: 214-220
SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 207-211	SEQ ID NO: 214-220

[0314] 本公开的递送构建体可以在穿过上皮细胞和/或进入上皮细胞(例如极化肠上皮细胞)内部的转运和/或递送过程中与一种或多种特定的蛋白质、酶或受体相互作用。一种或多种受体可以是内源受体。因此,本公开的递送构建体可以使用内源受体系统,其提供穿过上皮细胞或完整上皮(例如,受试者的单层Caco-2细胞和/或完整肠上皮)和/或到上皮细胞内部的快速且有效的货物转运和递送。包含具有SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:125中的任一项中所列的氨基酸序列的携带体的递送构建体可以能够将异源(例如,治疗性或生物活性)货物递送和转运到上皮细胞的内部,例如到上皮细胞的基底侧和/或上皮细胞的核上区域(例如,内质网、高尔基体和/或内体)。上皮细胞的内部可以是上皮细胞的细胞内囊泡或隔室或胞质溶胶。可以将货物(例如,异源性货物)递送到上皮细胞的基底侧(例如,基底侧的位置或隔室)。异源性货物可以被递送至上皮细胞的核上区域。递送构建体向上皮细胞内部的转运可以包括将递送构建体从在递送构建体的胞吞期间在上皮细胞的顶端表面上形成的囊泡中释放。递送和/或转运到细胞内部的位置可以包括将递送构建体保留在囊泡中和/或从该囊泡释放递送构建体,使得递送构建体可以接触上皮细胞的胞质溶胶(例如,由于囊泡中的包囊作用,在胞吞转运期间,构建体可能会或可能不会与上皮细胞的胞质溶胶接触)。因此,包含Cholix结构域I的截短形式的携带体可以从囊泡中释放,例如,包含SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:107中的任一项中所列的氨基酸序列的那些、或其功能片段或衍生物。

[0315] 包含具有SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:29、SEQ ID SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:141-SEQ ID NO:145中的任一项中所列的氨基酸序列的携带体的本公开的递送构建体可以能够穿过上皮细胞递送和转运异源性(例如,治疗性或生物活性)货物。穿过上皮细胞(例如,极化肠上皮细胞)的转运可以经由胞吞转运发生。本文所述的递送构建体利用的胞吞转运机制是内源运输系统,其包含与递送构建体相互作用的多种不同的受体。递送构建体的携带体可以包含允许这些受体相互作用的结构元件。可以与本文所公开的携带体相互作用的受体包括ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和串珠蛋白聚糖或其组合。本文所述的携带体可以与网格蛋白或GPR78或其组合无相互作用或可以无显著相互作用。

[0316] 与其他转运机制相比,使用包含那些受体的内源系统可能具有多个优点。使用内源转运系统可以具有以下优点:(i)可以在体内穿过完整的上皮细胞层诸如单层或上皮而不会损坏或破坏细胞或单层结构;(ii)可以实现快速有效的递送和转运;(iii)外毒素衍生

的构建体的不同结构域或区域与特定受体的相互作用允许以使得特异性靶向细胞或受试者内的某些区域或隔室的方式调节这些相互作用。例如,可以通过使用外毒素结构域I的某些截短形式,诸如具有SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:125的任一个中所列的氨基酸序列或其功能片段的那些截短形式,来提供向上皮细胞内部的(例如,异源性货物)递送和转运。上皮细胞可以位于受试者(例如,啮齿动物或人)的肠中。在各种实施方案中,可以通过使用外毒素结构域I的某些截短形式或衍生物,诸如具有SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:129-SEQ ID NO:133或SEQ ID NO:141-SEQ ID NO:145中的任一项中所列的氨基酸序列的那些截短形式或衍生物,来提供经由胞吞转运(例如,通过使用内源性胞吞作用系统)穿过上皮层的(例如,异源性货物)递送和转运。本文所述的递送构建体将治疗活性和/或诊断性货物快速且有效地递送至那些位置的能力能够为治疗、预防和/或诊断各种疾病(例如炎症疾病、自身免疫性疾病、激素缺乏疾病、肥胖症和代谢障碍以及癌症)提供了新的选择。

[0317] 除了携带体、货物和任选的间隔区之外,本公开的递送构建体还可以包含一个或多个功能部分。功能部分可以是可检测剂、亲和手柄(例如,可点击的官能团,诸如叠氮化物)、条形码(例如,核酸条形码)、细胞穿透剂或调节递送构建体的药代动力学(PK)和/或药效学(PD)特征。递送构建体可以包含细胞穿透剂。细胞穿透剂可以是肽。细胞穿透剂可以包括聚阳离子、聚有机酸、内体释放聚合物、聚(2-丙基丙烯酸)、聚(2-乙基丙烯酸)、Tat肽、Arg贴(Arg patch)、打结的肽、CysTAT、S19-TAT、R8(SEQ ID NO:73)、pAntp、Pas-TAT、Pas-R8(SEQ ID NO:76)、Pas-FHV、Pas-pAntP、F2R4(SEQ ID NO:79)、B55、金精、IMT-P8、BR2、OMOTAG1、OMOTAG2、pVEC、SynB3、DPV1047、C105Y、Transpotan、MTS、hLF、PFVYLI(SEQ ID NO:93)、maurocalcine、imperatoxin、hadrucalin、hemicalcin、opicalcin-1、opicalcin-2、midkin(62-104)、MCoTI-II或氯毒素。如本文所述,细胞穿透剂可以经由N-或C-末端偶联至递送构建体。细胞穿透剂可以提供对多种细胞类型的进入。一旦递送构建体穿过上皮层(例如,受试者的上皮),细胞穿透剂可以提供例如用于治疗性货物递送的附加功能。

[0318] 本公开的方法和组合物考虑了可以形成多聚体的递送构建体。包含多个递送构建体的多聚体可以在溶液中形成。可以通过携带体和/或异源性货物的多聚化形成多聚体。多聚体可以是异聚体或同聚体。同聚体可以是同二聚体。同二聚体可以通过异源性货物的二聚化形成。例如,包含SEQ ID NO:217中所列的氨基酸序列的递送构建体可以形成二聚体。在这种情况下,这种递送构建体的二聚化可以归因于货物例如IL-10(例如,SEQ ID NO:217)的二聚化。

附接异源性货物的插入位点

[0319] 本公开的方法和组合物可以包含递送构建体,其包含偶联至货物例如异源性货物的携带体。非限制性地,异源性(例如,生物活性)货物可以通过本领域技术人员已知的任何方法附接到携带体(例如,小分子、多肽、适体或核酸)上。可以将异源性货物引入携带体的不破坏携带体的胞吞和/或胞吞转运的任何部分。

[0320] 本公开提供了包含多肽携带体的递送构建体。因此,异源性货物可以直接偶联至这种多肽携带体(例如结构域I或其截短形式,例如SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125)的N末端或C末端。异源性货物可以经由携带体受体结合域的氨基酸的侧链偶联至携带体。异源性货物可以用可裂解间隔区偶联至携带体,使得在可裂解间隔区处的裂解将异源性货物与递送构建体的其余部分分开。异源性货物也可以是包含短前导肽的多肽,所述短前导肽在可裂

解间隔区裂解后保持与多肽附接。例如，异源性货物可以包含大于1个氨基酸、大于5个氨基酸、大于10个氨基酸、大于15个氨基酸、大于20个氨基酸、大于25个氨基酸、大于30个氨基酸、大于50个氨基酸或大于100个氨基酸的短前导肽。生物活性货物可以包含少于100个氨基酸、少于50个氨基酸、少于30个氨基酸、少于25个氨基酸、少于20个氨基酸、少于15个氨基酸、少于10个氨基酸或少于5个氨基酸的短前导肽。生物活性货物可以包含在1-100个氨基酸、5-10个氨基酸、10-50个氨基酸或20-80个氨基酸之间的短前导肽。

[0321] 如本文所述，本公开提供了包含携带体的方法和组合物，所述携带体衍生自外毒素的结构域I，其中所述外毒素可以是Cholix或PE。在天然Cholix(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)和PE(例如SEQ ID NO:135)中，结构域Ib环对于毒素的任何已知活性，包括细胞结合、易位、ER滞留或ADP核糖基化活性，不是必需的。因此，结构域Ib可以被完全删除，或被修饰成包含异源性货物，例如生物活性货物。因此，可以将异源性货物(例如，生物活性货物)插入到Cholix或PE携带体的结构域Ib中。例如，可以将异源性货物(例如，生物活性货物)在未交联的位置395和402处的半胱氨酸之间插入到Cholix衍生的携带体结构域Ib中。这可以通过减少半胱氨酸之间的二硫键，通过从Ib结构域完全删除一个或两个半胱氨酸，通过将一个或两个半胱氨酸突变为其他残基例如丝氨酸，或通过其他类似技术来实现。替代地，可以将生物活性货物在位置395和402的半胱氨酸之间插入到结构域Ib环中。在这种实施方案中，半胱氨酸之间的二硫键可用于约束生物活性货物结构域。

[0322] 本文所述的方法和组合物可以包含产生的递送构建体，其使得异源性货物作为融合蛋白(例如，递送构建体)与携带体(和任选的间隔区)一起表达。非限制性地，在这种情况下，可以通过本领域技术人员已知的任何方法将异源性货物插入到递送构建体中。例如，对应于异源性货物的氨基酸可以直接插入受体结合域，同时删除或不删除天然氨基酸序列。替代地，异源性货物可以不作为融合蛋白与携带体(和任选的间隔区)一起表达，非限制性地，可以通过本领域技术人员已知的任何合适方法将异源性货物偶联至携带体，包括肽缀合化学和/或点击化学。

间隔区

[0323] 本公开内容的方法和组合物可以包含递送构建体，其包含偶联至货物(例如异源性货物)的携带体，其中携带体能够在体外(例如，上皮细胞单层)或体内(例如受试者的肠上皮)将异源性货物递送到上皮细胞中和/或穿过上皮细胞递送。可以以本文所述的任何方式将这种携带体与异源性货物偶联。携带体可以直接或间接与货物偶联。携带体也可以与货物共价或非共价偶联。

[0324] 本公开提供了递送构建体，其包含经由间隔区与异源性货物偶联的携带体。间隔区可以包含本文所列举的任何部分。间隔区可以是将携带体联接至货物的任何分子，并且可以包括低聚或多聚的间隔区(例如，聚乙二醇等)、其他小分子间隔区(例如，衍生自二碳酸诸如琥珀酸、天冬氨酸等的小分子间隔区)和氨基酸(包含短肽序列等)。因此，如本文所述的“间隔区”通常是指可以附接到或偶联到本公开的分子的化学部分。间隔区可以位于第一分子与第二分子之间。间隔区可以将第一分子(例如，多肽、小分子、核酸等)与第二分子(例如，多肽、小分子、核酸等)连接、附接、联接或偶联。间隔区可以减少第一分子与第二分子之间的空间位阻。间隔区可以是与肽或多肽的C-末端偶联的氨基酸序列。如本文公开的间隔区的氨基酸序列的长度可以在1-100个氨基酸残基之间。间隔区的长度可以在5-75个

氨基酸残基之间。间隔区的长度可以在5-50个氨基酸残基之间。在一些情况下，间隔区的长度可以在2-25个氨基酸残基之间。携带体可以包含SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中所列的任何一个氨基酸序列，在其C末端与间隔区偶联(并且该间隔区可以经由其C末端进一步与异源性货物偶联)。间隔区可以是氨基酸间隔区。间隔区可以包含SEQ ID NO:166-SEQ ID NO:213中所列的任何氨基酸序列。间隔区可以包含外毒素的结构域II、结构域Ib或结构域III的一部分或其任何组合。例如，本文所述的递送构建体可以包含与间隔区偶联的包含SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一个所列的氨基酸序列的携带体，其中间隔区子包含SEQ ID NO:126的氨基酸残基1-82。

[0325] 本公开提供了包含一个或多个间隔区的递送构建体，所述间隔区在本文中进一步描述。间隔区可以包含氨基酸序列。间隔区可以包含SEQ ID NO:126中的任何一个的至多82个氨基酸残基。因此，间隔区可以包含SEQ ID NO:126中所列的氨基酸序列的前82个氨基酸残基。Cholix结构域II的氨基酸残基可以是连续的氨基酸残基(例如，SEQ ID NO:126的残基1-82)。

[0326] 可以与本文所述的方法和组合物结合使用的其他间隔区包括包含SEQ ID NO:207-SEQ ID NO:211中所列的氨基酸序列的那些。间隔区包含SEQ ID NO:210中所列的氨基酸序列、或其片段或衍生物。

[0327] 本公开的方法和组合物可以包含间隔区，所述间隔区可以包含外毒素的结构域II、结构域Ib和/或结构域III的一部分。例如，包含SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中的任一项中所列的氨基酸序列的携带体可以进一步与间隔区偶联(例如，经由C末端)，其中所述间隔区包含来自SEQ ID NO:126-SEQ ID NO:128和/或SEQ ID NO:138-SEQ ID NO:140中的任一项的约80至约90个氨基酸残基。间隔区可以包含SEQ ID NO:126-SEQ ID NO:128和/或SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:139中的任一项的至多85个氨基酸残基。间隔区可以包含SEQ ID NO:126-SEQ ID NO:128和/或SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:139中的任一项的至多82个氨基酸残基。间隔区可以包含SEQ ID NO:126-SEQ ID NO:128和/或SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:139中的任一项的至多80个氨基酸残基。间隔区可以包含SEQ ID NO:126-SEQ ID NO:128和/或SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:139中的任一项的至多50个氨基酸残基。间隔区可以包含SEQ ID NO:126-SEQ ID NO:128和/或SEQ ID NO:137-SEQ ID NO:139中的任一项的至多25个氨基酸残基。

[0328] 间隔区可以包含SEQ ID NO:126中的任何一个的至多82个氨基酸残基。间隔区可以包含SEQ ID NO:126中所列的氨基酸序列的前82个氨基酸残基。Cholix结构域II的氨基酸残基可以是连续的氨基酸残基(例如，SEQ ID NO:126的残基1-82)。

[0329] 本公开的间隔区可以是可裂解间隔区。本公开的间隔区可以是不可裂解间隔区。

可裂解间隔区

[0330] 当前描述的方法和组合物允许异源性货物(例如，生物活性或治疗活性的货物)被递送至上皮细胞内部或穿过上皮细胞的位置，其中异源性货物可以偶联至携带体，形成本文所述的递送构建体。这种递送构建体可以进一步包含可以将携带体间接地偶联至货物(例如，异源性货物)的间隔区。本文所述的间隔区可以是可裂解间隔区。存在于递送构建体中的可裂解间隔区的数目至少部分取决于异源性货物相对于递送构建体的位置和异源性货物的性质。当异源性货物可以通过在单个间隔区处裂解而与递送构建体的其余部分分离

时,递送构建体可以包含单个可裂解间隔区。此外,在异源性货物是例如二聚体或其他多聚体的情况下,可以通过在可裂解间隔区处裂解,将生物活性货物的每个亚基与递送构建体的其余部分和/或生物活性货物的其他亚基分离。

[0331] 可裂解间隔区可以被存在于上皮细胞的基底外侧膜处或附近的裂解酶裂解。通过选择将要被这种酶裂解的可裂解间隔区,在穿过粘膜胞吞转运并从上皮细胞释放到膜基底外侧上的细胞基质中之后,可以从递送构建体的其余部分中释放出生物活性货物。此外,可以使用存在于上皮细胞内部的裂解酶,使得可裂解间隔区在从基底外侧膜释放递送构建体之前被裂解,只要该裂解酶在递送构建体进入极化的上皮细胞中的运输途径之前不会裂解递送构建体而导致递送构建体和生物活性货物从细胞的基底外侧膜释放即可。

[0332] 本公开的携带体可以通过酶来裂解。存在于极化上皮细胞的基底外侧膜上的酶可以选自例如,组织蛋白酶GI、糜蛋白酶I、弹性蛋白酶I、枯草杆菌蛋白酶AI、枯草杆菌蛋白酶AII、凝血酶I或尿激酶I。表6呈现了这些酶以及被具体肽酶识别和裂解的氨基酸序列。

表6-存在于基底外侧粘膜附近或在胞吞转运路径后方的肽酶

肽酶	裂解的氨基酸序列	SEQ ID NO
组织蛋白酶GI	AAPF	SEQ ID NO:166
糜蛋白酶I	GGF	SEQ ID NO:167
弹性蛋白酶I	AAPV	SEQ ID NO:168
枯草杆菌蛋白酶AI	GGL	SEQ ID NO:169
枯草杆菌蛋白酶AII	AAL	SEQ ID NO:170
凝血酶I	FVR	SEQ ID NO:171
尿激酶I	VGR	SEQ ID NO:172
弗林蛋白酶	RQPR	SEQ ID NO:173

[0333] 可裂解间隔区可以比递送构建体的其余部分呈现出更大的裂解倾向。如本领域技术人员所知,肽酶和蛋白酶可以裂解许多肽和多肽序列。可以选择可裂解间隔区,使得其在施用递送构建体的过程中相对于递送构建体中存在的其他氨基酸序列优先被裂解。在将递送构建体递送到受试者的血流中之后,递送构建体的携带体可以基本上是完整的(例如,约99%、约95%、约90%、约85%、约80或约75%)。在将递送构建体递送到受试者的血流中之后,递送构建体的货物可以基本上是完整的(例如,约99%、约95%、约90%、约85%、约80或约75%)。在将递送构建体递送到受试者的血流中之后,可裂解间隔区可以基本上被裂解(例如,约99%、约95%、约90%、约85%、约80或约75%)。

[0334] 在受试者血浆中发现的裂解酶可以用于裂解可裂解间隔区。存在于受试者血浆中的本领域技术人员已知的任何裂解酶均可以用于裂解可裂解间隔区。使用这种酶来裂解可裂解间隔区,与使用在极化上皮细胞的基底外侧膜附近发现的裂解酶相比,不是更优选的,因为据信在基底外侧膜附近会发生更有效的裂解。然而,如果技术人员确定由血浆酶介导的裂解足够有效而允许裂解足够比例的递送构建体来避免不利影响,则这种血浆裂解酶可以用于裂解递送构建体。因此,可裂解间隔区可以用选自以下的酶来裂解:胱天蛋白酶-1、胱天蛋白酶-3、蛋白质原转化酶1、蛋白质原转化酶2、蛋白质原转化酶4、蛋白质原转化酶4PACE 4、脯氨酰寡肽酶、内皮素裂解酶、二肽基肽酶IV、信号肽酶、中性溶酶、肾素和酯酶(参见,例如,美国专利号6,673,574,通过引用以其整体并入本文)。表7呈现了这些酶以及

被具体肽酶识别的氨基酸序列。肽酶在由星号标识的氨基酸的N末端侧裂解包含这些序列的肽。

表7-示例性血浆蛋白酶

蛋白酶	裂解的氨基酸序列	SEQ ID NO
胱天蛋白酶-1	Tyr-Val-Ala-Asp-Xaa*	SEQ ID NO: 174
胱天蛋白酶-3	Asp-Xaa-Xaa-Asp-Xaa*	SEQ ID NO: 175
蛋白质原转换酶 1	Arg-$(Xaa)_n$-Arg-Xaa*; n = 0、2、4 或 6	SEQ ID NO: 176
蛋白质原转换酶 2	Lys-$(Xaa)_n$-Arg-Xaa*; n = 0、2、4 或 6	SEQ ID NO: 177
蛋白质原转换酶 4	Glu-Arg-Thr-Lys-Arg-Xaa*	SEQ ID NO: 178
蛋白质原转换酶 4 PACE 4	Arg-Val-Arg-Arg-Xaa*	SEQ ID NO: 179
	癸酰基-Arg-Val-Arg-Arg-Xaa*	SEQ ID NO: 180
脯氨酰寡肽酶内皮素裂解酶与二肽基肽酶 IV 组合	Pro-Xaa*-Trp-Val-Pro-Xaa	SEQ ID NO: 181
信号肽酶	Trp-Val*-Ala-Xaa	SEQ ID NO: 182
中性溶酶与二肽基肽酶 IV 组合	Xaa-Phe*-Xaa-Xaa	SEQ ID NO: 183
	Xaa-Tyr*-Xaa-Xaa	SEQ ID NO: 184
	Xaa-Trp*-Xaa-Xaa	SEQ ID NO: 185
肾素与二肽基肽酶 IV 组合	Asp-Arg-Tyr-Ile-Pro-Phe-His-Leu*-Leu-(Val、Ala 或 Pro)-Tyr-(Ser、Pro 或 Ala)	SEQ ID NO: 186

[0335] 因此，可裂解间隔区可以是本领域技术人员已知的可被存在于上皮细胞的基底外侧膜处的酶裂解的任何可裂解间隔区。可裂解间隔区可以包含肽。可裂解间隔区可以包含核酸，诸如RNA或DNA。此外，可裂解间隔区可以包含碳水化合物，诸如二糖或三糖。

[0336] 替代地，可裂解间隔区可以是本领域技术人员已知的可被施用了递送构建体的受试者血浆中存在的酶裂解的任何可裂解间隔区。这种可裂解间隔区可以包含肽。这种可裂解间隔区可以包含核酸，诸如RNA或DNA。这种可裂解间隔区可以包含碳水化合物，诸如二糖或三糖。

[0337] 可裂解间隔区可以选自或获自表8中呈现的示例性列表。

表8-示例性间隔区的氨基酸序列

蛋白酶	间隔区氨基酸序列	SEQ ID NO
枯草杆菌蛋白酶A	SGGGGSGKAGSRGLT	SEQ ID NO:187
弗林蛋白酶	SGGGGSGGGGLRQPR	SEQ ID NO:188
PC5a	SGGGGSGKKVERFRY	SEQ ID NO:189
凝血酶	SGGGGSGGGGLMTPR	SEQ ID NO:190
Pro-matripase	SGGGGSGKAGSFSEG	SEQ ID NO:191
组织蛋白酶G	SGGGGSGKAGSAAPF	SEQ ID NO:192
TEV	GGGGSGGGENLYFQS	SEQ ID NO:193

[0338] 此外，可裂解间隔区可以是包含氨基酸序列的间隔区，所述氨基酸序列是烟草蚀斑病毒(TEV)蛋白酶的已知底物。因此，可裂解间隔区可以包含例如GGGGSGGGENLYFQS(SEQ ID NO:193)中所列的氨基酸序列。

[0339] 本公开的新颖的递送构建体可以包含用于抑制、干扰或阻断生物活性货物结合上

皮细胞表面的受体的能力的肽序列(或类似结构域)。因此,取决于要递送的生物学货物,会将用于抑制、干扰或阻断生物活性货物结合在上皮细胞表面的其受体的能力的肽序列(或类似结构域)专门引导至生物活货物性结合的受体。

[0340] 各种生物活性货物可以与哺乳动物细胞表面发现的GM-1-神经节苷脂结合。因此,本公开的可裂解间隔区可以包含用于抑制、干扰或阻断生物活性货物结合上皮细胞表面的GM-1的能力的肽序列。美国专利号8,877,161教导了许多干扰配体与GM-1结合的肽。表9呈现了肽序列的几个示例,其可以全部或部分掺入可裂解间隔区中,以用于制备本公开的递送构建体。

表9-示例性GM-1结合肽

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

[0341] 在制备本公开的递送构建体中使用的可裂解间隔区可以包含例如SEQ ID NO:185、SEQ ID NO:186、SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:188、SEQ ID NO:189和SEQ ID NO:190的氨基酸序列、或其变体或片段,如下文表10所描绘的。

表10-示例性的含可裂解GM-1结合肽的间隔区

间隔区氨基酸序列	SEQ ID NO
SGGGGWKTWFPRGLT	SEQ ID NO:201
SGGGGWKTWFPRQPR	SEQ ID NO:202
SGGGGWKTWFPRFRY	SEQ ID NO:203
SGGGGWKTWFPMTPR	SEQ ID NO:204
SGGGGWKTWFPFSEG	SEQ ID NO:205
SGGGGWKTWFPAAPF	SEQ ID NO:206

非裂解间隔区

[0342] 本公开的递送构建体可以包含偶联至异源性货物(例如,生物活性货物)的携带体,其中货物可以通过由一个或多个氨基酸(例如,最多达25个氨基酸)组成的间隔区与携带体分离。间隔区可以是肽间隔区或可用于偶联以联接第一和第二分子的任何其他分子实体。通常,间隔区除了连接这些蛋白质或在它们之间保持一定的最小距离或其它空间关系外,将不具有特定的生物活性。然而,可以对间隔区的组成氨基酸进行选择,以影响分子的一些性质,例如折叠、净电荷或疏水性。

[0343] 间隔区可以能够与递送构建体和(例如,生物活性)货物形成共价键。合适的间隔区是本领域技术人员公知的,并且包括但不限于直链或支链碳间隔区、杂环碳间隔区或肽间隔区。间隔区可以通过它们的侧基(例如,通过到半胱氨酸的二硫键)连接至递送构建体和/或生物活性货物的组成氨基酸。间隔区可以连接至递送构建体和/或(例如,生物活性)

货物的末端氨基酸的α碳氨基和/或羧基。

[0344] 具有一个能够与在细菌携带体上的基团以及在生物活性货物上具有反应性的另一个基团反应的官能团的双官能间隔区可以用来形成期望的缀合物。或者，衍生化可以涉及靶向部分的化学处理。在多肽诸如抗体或抗体片段上产生例如游离巯基的程序是已知的(参见美国专利号4,659,839)。

[0345] 用于将包括放射性核素金属螯合物、毒素和药物在内的各种化合物附接至蛋白质(例如抗体)的许多程序和间隔分子是已知的。参见，例如，欧洲专利申请号188,256；美国专利号4,671,958、4,659,839、4,414,148、4,699,784、4,680,338、4,569,789以及4,589,071；和Borlinghaus等人(1987)Cancer Res.47:4071-4075。

[0346] 可以使用包含例如氨基酸序列GTGGS(SEQ ID NO:207)、GGGGS(SEQ ID NO:208)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:209)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:210)或GGGGSGGG(SEQ ID NO:211)的一种或多种不可裂解的肽间隔区将待递送至某个位置(例如，受试者如人体内的位置)的货物(例如，生物活性货物)偶联至携带体，其中携带体将所述货物(例如，生物活性货物)靶向特定细胞，包括但不限于免疫系统的细胞，例如巨噬细胞、抗原呈递细胞和树突细胞(例如，在将货物运送穿过上皮细胞时)。通常，不可裂解间隔区可以包含一个或多个$(GGGGS)_x$(SEQ ID NO:212)，x＝1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。不可裂解间隔区可以包含一个或多个$(GS)_x$(SEQ ID NO:213)，x＝1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

递送构建体的生产

[0347] 可以使用各种方法来产生本公开的递送构建体。生产方法的选择可以取决于递送构建体和/或其组分(例如，携带体、货物和/或间隔区)的分子结构。因此，对于一些递送构建体，有机合成方法对于产生这种递送构建体可能是有利的。本公开的递送构建体可以是多肽。这种多肽可以例如使用重组DNA方法论来产生。通常，这涉及创建编码递送构建体的DNA序列，将DNA置于在特定启动子控制下的表达盒中，在宿主中表达分子，分离所表达的分子，以及若需要，将分子折叠成活性构象形式。

[0348] 可以通过任何合适的方法来制备编码本文所述的递送构建体的DNA，包括例如克隆和限制适当的序列，或者通过诸如Narang等人(1979)Meth.Enzymol.68:90-99的磷酸三酯法；Brown等人(1979)Meth.Enzymol.68:109-151的磷酸二酯法；Beaucage等人(1981)Tetra.Lett.,22:1859-1862的二乙基亚磷酰胺法；美国专利号4,458,066的固体支持法等方法直接化学合成。

[0349] 化学合成产生单链寡核苷酸。通过与互补序列杂交或通过使用单链作为模板用DNA聚合酶聚合，可以将其转化为双链DNA。本领域技术人员将认识到，尽管DNA的化学合成仅限于约100个碱基的序列，但可以通过连接较短的序列获得较长的序列。

[0350] 或者，可以克隆子序列，并使用适当的限制酶裂解适当的子序列。然后可以将片段连接以产生期望的DNA序列。可以使用DNA扩增方法诸如聚合酶链反应(PCR)来克隆编码本公开的递送构建体的DNA。因此，例如，使用含有例如NdeI的限制位点的有义引物和含有HindIII的限制位点的反义引物对生物活性货物的基因进行PCR扩增。这可以产生编码生物活性货物序列并具有末端限制位点的核酸。具有“互补”限制位点的递送构建体可以类似地被克隆，然后连接至生物活性货物和/或与生物活性货物附接的间隔区。核酸序列的连接和向载体中的插入产生了编码与细菌携带体受体结合域连接的生物活性货物的载体。在各种

实施方案中,通过例如固相DNA合成来人工合成编码本公开的递送构建体的DNA。

[0351] 本文所述的生产方法可以用于生产本公开的递送构建体或其(功能)变体。例如,“Cholix”(在本文中也称为Cholix毒素或Cholix外毒素)可以包括多种功能变体(例如,功能属),其中所述功能变体可以包含一个或多个变异,所述变异是其氨基酸序列相对于本文公开的SEQ ID NO:1的变异。因此,在本公开中,当提及Cholix时,将具有SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的Cholix毒素用作参考序列。然而,如本文所述,本公开不限于具有SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的Cholix,而是涵盖落入Cholix功能属内的所有Cholix变体。例如,具有SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的Cholix外毒素的变体可以是氨基酸序列如SEQ ID NO:2中所列的Cholix外毒素,其中两个变体均能够执行相同的功能,例如穿过上皮细胞的胞吞转运,并与相同的受体,例如ribophilin1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和/或串珠蛋白聚糖相互作用。

[0352] 此外,多肽的生产方法可以在某种程度上影响这种多肽的氨基酸序列(例如,由于翻译后修饰)。例如,第一携带体和第二携带体在相同的表达系统(例如,细菌表达系统诸如大肠杆菌,或哺乳动物表达系统,例如CHO细胞)中产生。在其他情况下,并且如本文所述,第一携带体和第二携带体在不同的表达系统(例如细菌或哺乳动物表达系统)中产生。例如,细菌表达系统包括大肠杆菌,而哺乳动物表达系统包括CHO细胞。通过细菌产生的多肽可以包含N帽,其中N帽可以包含在多肽的N末端的一个或多个修饰。N帽可以包含N末端甲硫氨酸残基。可以通过细菌产生并包含这种N末端甲硫氨酸的Cholix结构域I衍生的携带体多肽的示例包括包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:107和SEQ ID NO:135中所列的氨基酸序列的那些。

货物

[0353] 本公开提供了允许在体外(例如,单层Caco-2细胞)和体内(例如,受试者的肠上皮)将货物快速且有效地递送到和/或穿过上皮细胞(例如,极化上皮细胞)的方法和组合物。通过将货物(例如,生物活性货物)偶联至携带体以形成递送结构,可以实现这种快速且有效的递送。可以修饰这种递送构建体以靶向上皮细胞内的某些位置或穿过上皮细胞(如完整上皮膜)转运货物。

[0354] 在各种实施方案中,本公开的组合物和方法提供了将各种货物分子有效转运和递送至受试者(例如,啮齿动物或人)的不同位置(例如,器官,组织或细胞)。本公开的递送构建体可以允许递送到上皮细胞中和/或允许穿过上皮细胞层诸如受试者的肠上皮的快速胞吞转运(例如,囊泡胞吞转运)。当前描述的递送机制允许转运和递送各种货物分子。本文所述的递送构建体可以偶联到至少一个、至少两个、至少三个、至少五个或至少10个货物分子。货物可以是异源性货物,例如,与携带体异源。例如,本文所述的递送构建体包含偶联至异源性货物的Cholix结构域I衍生的携带体(例如,具有SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:125中所列的氨基酸序列的那些),其中异源性货物为非Cholix衍生的货物分子(例如,不衍生自或不包含Cholix毒素结构域I、II、Ib和III的片段)。

[0355] 异源性货物可以是生物活性货物。生物活性货物可以包含治疗分子和/或诊断分子。因此,本公开的递送构建体可以用于将生物活性货物递送到受试者(例如,啮齿动物或人)。如本文所用,“生物活性货物”包括但不限于:大分子、小分子、肽、多肽、核酸、mRNA、miRNA、shRNA、siRNA、反义分子、抗体、DNA、质粒、疫苗、聚合物纳米颗粒或催化活性材料。

[0356] 本公开的生物活性货物可以是当引入到受试者的血流中时可以执行期望的生物活性的大分子。例如，生物活性货物可以具有受体结合活性、酶活性、信使活性(即，充当激素、细胞因子、神经递质或其他信号传导分子)、发光或其他可检测的活性，或调节性活性，或其任何组合。为了某些诊断目的，生物活性货物可以与药学上可接受的γ-发射部分缀合，或本身可以是药学上可接受的γ-发射部分，包括但不限于铟和锝、磁性颗粒、不透射线的材料(例如空气或钡)和荧光化合物。

[0357] 本文所述的异源性货物可以是生物活性货物。作为递送构建体的一部分的生物活性货物可以在受试者的血液以外的受试者生物隔室中发挥作用。例如，在各种实施方案中，生物活性货物可以在淋巴系统中发挥其作用。在其他情况下，生物活性货物可以在器官或组织例如受试者的肝脏、心脏、肺、胰腺、肾脏、脑、骨髓中发挥作用。同样地，生物活性货物在血液、淋巴液或其他生物体液中可能或不能以可检测浓度存在，但仍可以在其作用部位以足够的浓度积累，从而发挥生物学作用。

[0358] 生物活性货物可以是包含一个以上多肽亚基的蛋白质。例如，蛋白质可以是二聚体、三聚体或更高阶的多聚体。在各种实施方案中，蛋白质的两个或更多个亚基可以用共价键，诸如二硫键连接。蛋白质的亚基可以与非共价相互作用保持在一起。本领域技术人员可以常规地鉴定这种蛋白质并使用例如免疫测定法确定亚基是否正确缔合。

[0359] 待递送到特定位置(例如，在受试者中)的生物活性货物可以选自例如细胞因子和细胞因子受体，诸如白细胞介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、淋巴因子抑制因子、巨噬细胞集落刺激因子、血小板衍生生长因子、干细胞因子、肿瘤生长因子β、肿瘤坏死因子、淋巴毒素、Fas、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、干扰素α、干扰素β、干扰素γ、生长因子和蛋白质激素，诸如红细胞生成素、血管生成素、肝细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、角质形成细胞生长因子、神经生长因子、肿瘤生长因子α、血小板生成素、甲状腺刺激因子、甲状腺释放激素、神经营养因子、表皮生长因子、VEGF、睫状神经营养因子、LDL、生长素介质、胰岛素生长因子、胰岛素样生长因子I和II、趋化因子诸如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、瘦素、RANTES、淋巴细胞趋化因子、嗜酸性粒细胞趋化因子1、嗜酸性粒细胞趋化因子2、TARC、TECK、WAP-1、WAP-2、GCP-1、GCP-2;α-趋化因子受体，例如CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7;以及β-趋化因子受体，例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7。

[0360] 表11提供了在本公开的构建体和方法中使用的合适的生物活性货物的说明性但非限制性的列表。

表11-示例性生物活性货物

货物	RefSeq (NCBI/Uniprot)
白细胞介素	
IL-10	NP_000563
IL-19	NP_037503
IL-20	NP_061194
IL-22	NP_065386
IL-24	NP_006841
IL-26	NP_060872
TNFSF配体	
肿瘤坏死因子-α (“TNF-α“)	NP_000585.2
淋巴毒素-α (“LT-α“)	NP_ 000586.2
淋巴毒素-β (“LT-β“)	NP_002332.1
CD30配体	NP_ 001235.1
CD40配体	NP_000065.1
CD70配体	NP_001243.1
OX40配体	NP_001284491.1
41BB配体	NP_ 001552.2
Apo1配体(或FasL或CD95L)	NP_ 000630.1
Apo2配体(或TRAIL, AIM-1或AGP-1)	NP_ 001177871.1
Apo3配体(或TWEAK)	NP_003800.1
APRIL	NP_ 001185551.1
LIGHT	NP_ 003798.2
OPG配体(或RANK配体)	NP_ 003692.1
BlyS (或THANK)	NP_ 001139117.1
BCMA	NP_ 001183.2
TACI	NP_ 036584.1
TNFSFRs	
TNFR1	NP_001056.1
TNFR2	NP_001057.1
淋巴毒素βR	NP_001257916.1
CD40	NP_001241.1
CD95 (或FAS或APO-1)	NP_000034.1
OPG	NP_002537.3
RANK	NP_ 001257878.1
CD30	NP_001234.3
CD27	NP_001233.1
OX40 (或CD134)	NP_003318.1
41BB	NP_ 001552.2
NGFR	NP_ 002498.1
BCMA	NP_ 001183.2
TAC1	NP_ 036584.1
EDA2R	NP_001186616.1
TROY	NP_ 001191387.1

DR6	NP_055267.1
DR5 (或TRAILR2)	NP_003833.4
DR4	NP_003835.3
DR3	NP_001034753.1
HVEM	NP_001284534.1
LTβR	NP_001257916.1
GITR	NP_004186.1
DcR3	NP_003814
Fn14 (或TWEAKR)	NP_057723.1
BAFF	NP_443177.1
葡萄糖代谢相关蛋白质	
胰高血糖素蛋白质原	NP_002045.1
胰高血糖素肽	NP_002045.1 (aa 53-81)
胰高血糖素样肽1	NP_002045.1 (aa 98-128)
胰高血糖素样肽2	NP_002045.1 (aa 146-178)
肠高血糖素	P01275 (aa 21-89)
肠高血糖素相关多肽	P01275 (aa 21-50)
胃抑制性多肽前蛋白	NP_004114.1
胃抑制性多肽	NP_004114.1 (aa 52-93)
二肽基肽酶4	P27487
葡萄糖转运体成员4	NP_001033.1
胰高血糖素前体	AAA52567.1
胰岛素受体底物1	NP_005535.1
胰岛素	P01308
载脂蛋白A-II	P02652
溶质载体家族2，促进的葡萄糖转运体成员1	P11166
糖原合酶1	P13807
糖原合酶2	P54840
酪氨酸蛋白磷酸酶非受体1型	P18031
RAC-α丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	P31749
过氧化物酶体增殖物激活受体γ	P37231
己糖激酶3	P52790
磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸3-磷酸酶和双特异性蛋白	P60484
丙酮酸脱氢酶激酶1	Q15118
钙结合和含卷曲螺旋结构域蛋白1	Q9P1Z2
Max样蛋白X	Q9UH92
果糖二磷酸醛缩酶A	P04075
胰高血糖素样肽1受体	P43220
胰高血糖素样肽2受体	O95838
胃抑制性多肽受体	P48546
胰岛素样生长因子1受体	P08069.1
胰岛素样生长因子2受体	P11717.3

胰岛素受体	P06213
GLP-1激动剂-艾塞那肽	DB01276
GLP-1激动剂-利拉鲁肽	DB06655
生长激素相关蛋白质	
促生长素	P01241
合成人生长激素	AAA72260.1
合成人生长激素部分	CAA01435
合成人生长激素部分	CAA00380
人生长激素2	P01242
促生长素释放因子	P01286.1
食欲调节激素	Q9UBU3
瘦素	P41159
生长激素受体蛋白质	
生长激素受体	P10912
生长激素释放激素受体	Q02643
生长激素促分泌素受体	Q92847
生长激素释放激素受体形式a	P78470
生长激素受体	E9PCN7

[0361] 本文所述的生物活性货物可以是激素。这种激素可以是生长激素。激素可以是具有例如SEQ ID NO:214中所列的氨基酸序列的人生长激素。

[0362] 生物活性货物可以是影响受试者的代谢和/或与受试者的代谢相互作用的分子。因此,本文所述的生物活性货物可以是可用于预防、治疗和/或诊断代谢疾病或病症的药物。因此,本文所述的生物活性货物可以是胰高血糖素样肽(GLP)。GLP可以是具有SEQ ID NO:215中所列的氨基酸序列的GLP-1。可以与本文所述的方法和组合物结合使用的激素可以是胰岛素(从成熟蛋白质中去除了c肽元件)或其衍生物。胰岛素肽可以包含SEQ ID NO:216中所列的氨基酸序列。

[0363] 生物活性货物可以是白细胞介素。具体地,可以与本文所述的方法和组合物一起使用的白细胞介素可以包括IL-10和IL-22,其分别具有SEQ ID NO:217和SEQ ID NO:218中所列的氨基酸序列。

[0364] 本文公开的生物活性货物可以调节递送构建体的空间取向。例如,货物分子可以诱导两种或更多种递送构建体的多聚化。这种多聚体可以是同聚体或异聚体。多聚体可以是同二聚体。例如,包含SEQ ID NO:217中所列的氨基酸序列的递送构建体可以形成二聚体。这种二聚化可以被IL-10诱导(因为IL-10可以形成天然的二聚体并因此促进包含IL-10作为货物的递送构建体的二聚化)

[0365] 生物活性货物还可以包括毒素,诸如内毒素、肠毒素或外毒素。例如,生物活性货物可以是具有SEQ ID NO:219中所列的氨基酸序列的ExtB多肽(它将形成天然五聚体)。

[0366] 可以根据本公开递送的生物活性货物的其他示例包括但不限于抗肿瘤化合物,诸如亚硝基脲类,例如卡莫斯汀、洛莫斯汀、司莫斯汀、链脲佐菌素;甲基肼类,例如丙卡巴肼、达卡巴嗪;类固醇激素,例如糖皮质激素、雌激素、孕激素、雄激素、四氢脱氧皮质酮;免疫活性化合物诸如免疫抑制剂,例如乙胺嘧啶、甲氧蝶呤、青霉胺、环孢霉素、硫唑嘌呤;和免疫刺激剂,例如左旋咪唑、二硫代氨基甲酸二乙酯、脑啡肽、内啡肽;抗微生物化合物诸如抗生

素，例如β-内酰胺、青霉素、头孢菌素、碳青霉烯和单环内酰胺、β-内酰胺酶抑制剂、氨基糖苷、大环内酯、四环素、壮观霉素；抗疟药、抗阿米巴剂；抗原虫药；抗真菌药，例如两性霉素β；抗病毒药，例如阿昔洛韦、碘苷、利巴韦林、三氟吡啶、维达宾、更昔洛韦；杀寄生虫药；驱肠虫剂；放射性药物；胃肠道药物；血液学化合物；免疫球蛋白；凝血蛋白，例如抗血友病因子、IX因子复合物；抗凝剂，例如双香豆素、肝素钠；溶纤维剂抑制剂，例如氨甲环酸；心血管药物；外周抗肾上腺素药物；中枢性降压药，例如甲基多巴、盐酸甲基多巴；降压直接血管扩张药，例如二氮嗪、盐酸肼苯哒嗪；影响肾素-血管紧张素系统的药物；外周血管扩张药，例如酚妥拉明；抗心绞痛药物；强心苷；变力扩血管药(inodilator)，例如氨力农、米力农、依诺昔酮、甲硫咪唑酮、伊马唑旦、舒马唑；抗心律失常药；钙进入阻滞剂；影响血脂的药物，例如雷尼替丁、波生坦、曲格列酮；呼吸系统药物；拟交感神经药，例如沙丁胺醇、甲磺酸比托特罗、盐酸多巴酚丁胺、盐酸多巴胺、麻黄碱So、肾上腺素、盐酸芬氟拉明、盐酸异丙肾上腺素、盐酸甲氧噻啶、去甲肾上腺素酒石酸氢盐、盐酸去氧肾上腺素、盐酸利托君；拟胆碱药，例如氯化乙酰胆碱；抗胆碱酯酶，例如氯化腾喜龙；胆碱酯酶再激活剂；肾上腺素阻断药，例如，盐酸醋丁洛尔、阿替洛尔、盐酸艾司洛尔、盐酸拉贝洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、甲磺酸酚妥拉明、盐酸普萘洛尔；抗毒蕈碱药物，例如，甲溴辛托品、硫酸阿托品、克利溴铵、格隆溴铵、异丙托溴铵、氢溴酸莨菪碱；神经肌肉阻滞药；去极化药物，例如阿曲库胺苯磺酸盐、己芴溴铵、碘二甲箭毒、氯化琥珀酰胆碱、氯化筒箭毒碱、维库溴铵；中枢作用的肌肉松弛剂，例如巴氯芬；神经递质和神经递质剂，例如乙酰胆碱、腺苷、三磷酸腺苷；氨基酸神经递质，例如兴奋性氨基酸、GABA、甘氨酸；生物胺神经递质，例如多巴胺、肾上腺素、组胺、去甲肾上腺素、章鱼胺、5-羟色胺、酪胺；神经肽、一氧化氮、K^+通道毒素；抗帕金森药物，例如，amaltidine HCl、甲磺酸苯扎托品、卡比多巴；利尿药，例如双氯非那胺、醋甲唑胺、苄氟噻嗪、泊利噻嗪；抗偏头痛药物，例如卡前列素甲氨丁三醇甲磺酸盐，马来酸美西麦角。

[0367] 可以根据本公开递送的生物活性货物的其他示例包括但不限于激素，例如垂体激素，例如绒毛膜促性腺激素、替可克肽、促卵泡激素、促生长素、iorticotropin、普罗瑞林、促甲状腺素、血管加压素、赖氨加压素；肾上腺激素，例如二丙酸倍氯米松、倍他米松、地塞米松、去炎松；胰激素，例如胰高血糖素、胰岛素；甲状旁腺激素，例如dihydrochysterol；甲状腺激素，例如降钙素依替膦酸二钠、左甲状腺素钠、碘塞罗宁钠、复方甲状腺素(liotrix)、甲状腺球蛋白、醋酸特立帕肽；抗甲状腺药；雌激素；孕激素和拮抗剂；激素避孕药；睾丸激素、胃肠激素，例如肠促胰酶肽、enteroglycan、甘丙肽、胃抑制多肽、表皮生长因子-尿抑胃素、胃抑制多肽、胃泌素释放肽、胃泌素、五肽胃酸激素、四肽胃泌素、胃动素、YY肽、促胰液素、血管活性肠肽或辛卡利特。

[0368] 可以根据本公开递送的生物活性货物的其他示例包括但不限于酶，例如透明质酸酶、链激酶、组织纤溶酶原激活剂、尿激酶、PGE-腺苷脱氨酶；静脉内麻醉剂，诸如氟哌利多、依托咪酯、柠檬酸芬太尼/氟哌利多、海索比妥、盐酸氯胺酮、美索比妥钠、硫戊比妥钠、硫喷妥钠；抗癫痫药，例如卡马西平、氯硝西泮、双丙戊酸钠、乙琥胺、美芬妥英、对甲双酮、苯妥英、普利米酮。在各种实施方案中，生物活性货物是选自透明质酸酶、链激酶、组织纤溶酶原激活物、尿激酶、PGE-腺苷脱氨酶的酶。

[0369] 本文所述的生物活性货物还可包含治疗性和/或诊断性抗体、抗体片段、双抗体、微抗体或单链可变片段(例如，scFv)或其组合。例如，本文所述的生物活性货物可以是抗肿

瘤坏死因子α(抗TNFα)剂。抗TNFα剂是抗TNFα抗体或其功能片段。抗TNFα抗体可以是阿达木单抗(AbbvieHUMIRA®,Drug Bank DB 00051)或英夫利昔单抗(CentocorREMICADE®,Drug Bank DB 00065)或功能片段(例如其结合片段)。

[0370] 可以根据本公开递送的生物活性货物的其他示例包括但不限于化疗剂,诸如对多种类型的人癌症(包含白血病、淋巴瘤、癌、肉瘤、骨髓瘤等)有效的化疗或抗肿瘤剂,例如阿霉素、丝裂霉素、顺铂、柔红霉素、博来霉素、放线菌素D和新制癌菌素。

[0371] 可以根据本公开递送的生物活性货物的其他示例包括调节性T细胞(Treg)的抑制剂,该调节性T细胞是诸如表达CD4、CD25和Foxp3的Treg,以及Tr1、Th3、CD8+CD28-、Qa-1限制性T细胞等Treg,和IL-17Treg细胞。这种Treg抑制剂已在本领域中被广泛研究和描述(参见,例如Casares等人,Journal of Immunology,185(9):5150-5159,2010以及其中所列的参考文献)。

[0372] 表12示出了可以与本文公开的方法和组合物结合使用的各种异源性货物的示例性氨基酸序列。例如,以下表12中所示的任何异源性货物分子可以与本文公开的任何携带体,例如以上表2和/或表3中列出的那些携带体组合。

表12-示例性异源性货物氨基酸序列

SEQ ID NO	序列
SEQ ID NO: 214	FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 215	MKIILWLCVFGLFLATLFPISWQMPVESGLSSEDSASSESFASKIKRHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSG
SEQ ID NO: 216	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVC
	GERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN
SEQ ID NO: 217	MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
SEQ ID NO: 218	MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
SEQ ID NO: 219	MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYASTQSNKKDLCEHYRQIAKESCKKGFLGVRDGTAGACFGAQIMVAAKGC
SEQ ID NO: 220	MRSSKNVIKEFMRFKVRMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEGHNTVKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGSKVYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGCFIYKVKFIGVNFPSDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIHKALKLKDGGHYLVEFKSIYMAKKPVQLPGYYYVDSKLDITSHNEDYTIVEQYERTEGRHHLFL

[0373] 本公开的货物分子可以包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:214-SEQ ID NO:220中所列的氨基酸序列中的任何一个具有至少80%序列同一性、与其功能片段具有至少80%序列同一性和/或其任何组合。本公开的货物分子可以包含氨基酸序列,所述氨

基酸序列与SEQ ID NO:214-SEQ ID NO:220中所列的氨基酸序列中的任何一个具有至少90％序列同一性、与其功能片段具有至少80％序列同一性和/或其任何组的氨基酸序列。本公开的货物分子可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列与SEQ ID NO:214-SEQ ID NO:220中所列的氨基酸序列中的任何一个具有至少95％序列同一性、与其功能片段具有至少80％序列同一性和/或其任何组合。本公开的货物分子可以包含氨基酸序列，所述氨基酸序列与SEQ ID NO:214-SEQ ID NO:220中所列的氨基酸序列中的任何一个具有至少99％序列同一性、与其功能片段具有至少80％序列同一性和/或其任何组合。本公开的货物分子可以包含SEQ ID NO:214-SEQ ID NO:220中所列的氨基酸序列中的任何一个、其功能片段和/或其任何组合。

[0374] 通常，本文描述和公开的货物可以保留在使用本文描述的组合物靶向的位置。保留可以导致货物分子引起某种响应或生物学效果(例如治疗效果)。分子(例如，异源性货物)向位置(例如，细胞内隔室或核上区域)的递送可以指分子在该位置的保留。分子在某个细胞内或细胞外区域或隔室中的保留可以持续一定的时间，例如至少2分钟、至少5分钟、至少10分钟、至少15分钟、30分钟或至少60分钟。分子的保留可以取决于多种因素，诸如保留分子的位置和/或在分子(例如，携带体、递送构建体和/或异源性货物)之间发生的分子相互作用的类型。例如，通过穿过极化上皮细胞的胞吞转运将异源性货物递送至基底外侧隔室可以包括将异源性货物在基底外侧位置保留足以引起某种效果的时间，诸如在治疗和/或生物活性货物的情况下的治疗效果。递送构建体可以被配置成例如通过使用pH依赖性和/或酶依赖性间隔区在特定位置释放货物。当货物从携带体中释放时，货物分子可以引起一定的效果和/或响应。例如，以及在具有生物学和/或治疗活性的货物的情况下，这种货物在从携带体释放后可以在体外或体内引起其治疗作用。货物在仍绑定到携带体时，也可能能够引起响应。这可能取决于货物和/或递送构建体。

[0375] 异源性货物可以是可检测剂，诸如荧光分子或放射性部分。如本文所述的可检测剂可用于检测可检测剂在不同位置例如在受试者内部或细胞内部所偶联到的分子。可检测剂还可以具有其他特征和功能，例如治疗或其他生物学特性。例如，本文所述的偶联至携带体的放射性核素可允许检测携带体，但还可以具有治疗特性，例如，作为治疗性放射性核素。通常，携带体可以缀合、联接或融合至可检测剂，诸如荧光团、近红外染料、造影剂、纳米颗粒、含金属的纳米颗粒、金属螯合物、X射线造影剂、正电子发射断层显像剂、金属、放射性同位素、染料、放射性核素螯合剂或其他可用于成像的合适材料。

[0376] 递送构建体可以包含约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种可检测剂。可以用作可检测剂的放射性同位素的非限制性示例包括α发射体、β发射体、正电子发射体和γ发射体。金属或放射性同位素可以选自锕、镅、铋、镉、铯、钴、钶、钆、铱、铅、镥、锰、钯、钋、镭、钌、钐、锶、锝、铊和钇。金属可以是锕、铋、铅、镭、锶、钐或钇。放射性同位素可以是锕225或铅212。可以与本文所述的嵌合结合剂结合使用的近红外染料可能不容易被生物组织和体液淬灭。荧光团可以是发出波长在650nm至4000nm之间的电磁辐射的荧光剂，这种发射用于检测这种试剂。在本公开中可以用作缀合分子的荧光染料的非限制性示例包括DyLight-680、DyLight-750、VivoTag-750、DyLight-800、IRDye-800、VivoTag-680、Cy5.5或吲哚菁绿(ICG)。近红外染料可包括花菁染料(例如，Cy7、Cy5.5和Cy5)。在本公开中用作缀合分子的荧光染料的其他非限制性示例可包括吖啶橙或黄、Alexa Fluor(例如Alexa Fluor 790、750、700、680、

660和647)及其任何衍生物、7-放线菌素D、8-苯胺基萘-1-磺酸、ATTO染料及其任何衍生物、金胺-罗丹明染色剂及其任何衍生物、苯并蒽酮、bimane、9-10-双(苯基乙炔基)蒽、5,12-双(苯基乙炔基)并四苯、双苯酰亚胺、脑彩虹、钙黄绿素、羧基荧光素及其任何衍生物、1-氯-9,10-双(苯基乙炔基)蒽及其任何衍生物、DAPI、DiOC6、DyLight Fluor及其任何衍生物、黑附球菌酮(epicocconone)、溴化乙锭、FlAsH-EDT2、Fluo染料及其任何衍生物、FluoProbe及其任何衍生物、荧光素及其任何衍生物、Fura及其任何衍生物、GelGreen及其任何衍生物、GelRed及其任何衍生物、荧光蛋白及其任何衍生物、m亚型蛋白及其任何衍生物例如mCherry、hetamethine染料及其任何衍生物、hoeschst染色剂、亚氨基香豆素、印度黄、吲哚-1及其任何衍生物、laurdan、萤光黄及其任何衍生物、萤光素及其任何衍生物、萤光素酶及其任何衍生物、部花菁及其任何衍生物、nile染料及其任何衍生物、二萘嵌苯、焰红染料、phyco染料及其任何衍生物、碘化丙锭、萤光黄、罗丹明及其任何衍生物、ribogreen、RoGFP、红荧烯、二苯乙烯及其任何衍生物、磺酰罗丹明及其任何衍生物、SYBR及其任何衍生物、synapto-pHluorin、四苯基丁二烯、三钠四钠、德克萨斯红、达旦黄、TSQ、伞形酮、蒽酮紫、黄色荧光蛋白和YOYO-1。其他合适的荧光染料可包括但不限于荧光素和荧光素染料(例如,异硫氰酸荧光素或FITC、萘基荧光素、4′,5′-二氯-2′,7′-二甲氧基荧光素、6-羧基荧光素或FAM等)、羰花菁、部花菁、苯乙烯基染料、氧杂菁染料、藻红蛋白、赤藓红、曙红、罗丹明染料(例如,四甲基羧基罗丹明或TAMRA、羧基罗丹明6G、羧基-X-罗丹明(ROX)、丽丝胺罗丹明B、罗丹明6G、罗丹明绿、罗丹明红、四甲基罗丹明(TMR)等)、香豆素和香豆素染料(例如甲氧基香豆素、二烷基氨基香豆素、羟基香豆素、氨甲基香豆素(AMCA)等)、俄勒冈绿染料(例如,俄勒冈绿488、俄勒冈绿500、俄勒冈绿514等)、德克萨斯红、德克萨斯红-X、光谱红、光谱绿、花菁染料(例如,CY-3、Cy-5、CY-3.5、CY-5.5等)、ALEXA FLUOR染料(例如ALEXA FLUOR 350、ALEXA FLUOR 488、ALEXA FLUOR 532、ALEXA FLUOR 546、ALEXA FLUOR 568、ALEXA FLUOR 594、ALEXA FLUOR 633、ALEXA FLUOR 660、ALEXA FLUOR680等)、BODIPY染料(例如,BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR、BODIPY TR、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665等)、IR染料(例如,IRD40、IRD 700、IRD 800等),等等。其他合适的可检测剂在PCT/US14/56177中描述。放射性同位素的非限制性示例包括α发射体、β发射体、正电子发射体和γ发射体。金属或放射性同位素可以选自锕、镅、铋、镉、铯、钴、铕、钆、铱、铅、镥、锰、钯、钋、镭、钌、钐、锶、锡、铊和钇。金属可以是锕、铋、铅、镭、锶、钐或钇。放射性同位素可以是锕225或铅212。另外,以下放射性核素可用于诊断和/或治疗:碳(例如,^{11}C或^{14}C)、氮(例如,^{13}N)、氟(例如,^{18}F)、镓(例如^{67}Ga或^{68}Ga)、铜(例如,^{64}Cu或^{67}Cu)、锆(例如,^{89}Zr)、镥(例如,^{177}Lu)。

[0377] 本文公开的递送构建体可以与放射增敏剂或光敏剂缀合、偶联或融合。放射增敏剂的示例包括但不限于:ABT-263、ABT-199、WEHI-539、紫杉醇、卡铂、顺铂、奥沙利铂、吉西他滨、依他硝唑、米索硝唑、替拉扎明和核酸碱基衍生物(例如卤代嘌呤或嘧啶,例如5-氟脱氧尿苷)。光敏剂的示例可包括但不限于:在照射时产生热量的荧光分子或珠子,纳米颗粒、卟啉和卟啉衍生物(例如二氢卟酚、菌绿素、异菌绿素、酞菁和萘酞菁)、金属卟啉、金属酞菁、白芷素、chalcogenapyrrillium染料、叶绿素、香豆素、黄素和相关化合物,诸如咯嗪和核黄素、富勒烯、脱镁叶绿酸、焦脱镁叶绿酸、花菁(例如,部花菁540)、脱镁叶绿素、sapphyrin、texaphyrin、红紫素、卟啉烯、吩噻嗪鎓、亚甲基蓝衍生物、萘二甲酰亚胺、尼罗

蓝衍生物、醌、苉酯化合物(例如,金丝桃素、竹红菌素和尾孢菌素)、补骨脂素、醌、类视黄醇、罗丹明、噻吩、verdin、氧杂蒽染料(例如曙红、赤藓红素、玫瑰红)、卟啉的二聚和低聚形式,以及前药诸如5-氨基乙酰丙酸。有利地,这种方法可以允许同时使用治疗剂(例如药物)和电磁能量(例如辐射或光)两者来高度特异性地靶向病变细胞(例如癌细胞)。本公开的蛋白质可以例如直接地或经由间隔区与药剂缀合、偶联、融合、或共价或非共价偶联。

[0378] 可以使用螯合剂将放射性核素附接至本文所述的携带体或递送构建体。示例性螯合剂部分可以包括2,2′,2″-(3-(4-(3-(1-(4-(1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)-1-氧-5,8,11,14,17,20,23-七氧杂-2-氮杂二十五烷-25-基)硫脲基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-2,5,8-三基)三乙酸;2,2′,2″-(3-(4-(3-(1-(4-(1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)-1-氧-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十一氧杂-2-氮杂三十七烷-37-基)硫脲基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-2,5,8-三基)三乙酸;2,2′-(7-(4-(3-(1-(4-(1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)-1-氧-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十一氧杂-2-氮杂三十七烷-37-基)硫脲基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4-二基)二乙酸;2,2′,2″-(3-(4-(3-(1-(4-(1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)-3,7-双氧-11,14,17,20,23,26,29-七氧杂-2,8-二氮杂三十一烷-31-基)硫脲基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-2,5,8-三基)三乙酸;2,2′,2″-(3-(4-(3-(1-(4-(1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)-3,7-双氧-11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41-十一氧杂-2,8-二氮杂四十三烷-43-基)硫脲基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-2,5,8-三基)三乙酸;2,2′,2″-(3-(4-(3-(25,28-双氧-28-((6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基)氨基)-3,6,9,12,15,18,21-七氧杂-24-氮杂二十八基)硫脲基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-2,5,8-三基)三乙酸;2,2′,2″-(3-(4-(3-(37,40-双氧-40-((6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基)氨基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十一氧杂-36-氮杂四十基)硫脲基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-2,5,8-三基)三乙酸;2,2′,2″-(3-(4-(1-(4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)-3-氧-6,9,12,15,18,21,24-七氧杂-2-氮杂二十七烷-27-氨基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-2,5,8-三基)三乙酸;2,2′,2″-(2-(4-(1-(4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯氧基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十一氧杂三十六烷-36-氨基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三基)三乙酸;2,2′,2″-(3-(4-(3-(5-氨基-6-((4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苄基)氨基)-6-氧己基)硫脲基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-2,5,8-三基)三乙酸;2,2′-(7-(4-(3-(5-氨基-6-((4-6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苄基)氨基)-6-氧己基)硫脲基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4-二基)二乙酸;2,2′,2″-(3-(4-(3-(5-氨基-6-((5-氨基-6-((4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苄基)氨基)-6-氧己基)氨基)-6-氧己基)硫脲基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-2,5,8-三基)三乙酸;以及2,2′,2″-(3-(4-(3-(5-氨基-6-((5-氨基-6-((5-氨基-6-((4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苄基)氨基)-6-氧己基)氨基)-6-氧己基)氨基)-6-氧己基)硫脲基)苄基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-2,5,8-三基)三乙酸。

用途

[0379] 本公开提供了用于在体外或体内(例如,在啮齿动物或人中)将货物分子转运和/或递送至细胞内的某些位置(例如核上位置)或穿过细胞(例如上皮细胞)的方法和组合物。通过将这种货物偶联至携带体分子,可以将其引导至一组位置。这种携带体分子可以在细胞表面上和在细胞内与特有的受体相互作用以便靶向递送货物。本文描述了各种这种携带

体、货物及其用途。

[0380] 本文考虑了可用于将货物递送至细胞(例如,上皮细胞)内的位置或穿过细胞(例如,上皮细胞)的递送构建体。这种携带体可以是小分子、多肽、适体、抗体、核酸、以上任何一个的片段或以上任何的组合。本文所述的递送构建体可以用于各种应用,包括但不限于治疗、预防和/或诊断应用。如果例如治疗活性的货物分子偶联至本文所述的携带体,从而能够靶向递送至(例如,在诸如人的受试者中的)各个位置,则可以提供这种治疗、预防和/或诊断应用。

药物组合物和递送方法

[0381] 本公开的药物组合物涉及用于向人受试者施用的组合物。药物组合物包含单独或组合的本文所述的非天然存在的递送构建体。药物组合物可包含能够改变非天然存在的递送构建体的特征,例如稳定、调节和/或激活其功能的其他分子。组合物可以例如为固体或液体形式,并且可以特别地以粉末、片剂、溶液或气雾剂的形式存在。本公开的药物组合物可以任选地并且另外地包含药学上可接受的运载体。“药学上可接受的运载体”是指无毒的固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、封装材料和任何标准药学运载体、赋形剂、缓冲剂和赋形剂,例如磷酸盐缓冲盐溶液、5%葡萄糖水溶液和乳剂,例如油/水或水/油乳剂,以及各种类型的润湿剂和/或佐剂。

[0382] 通常将药物组合物适当地配制用于递送构建体所预期的立即使用。例如,如果不立即施用递送构建体,则可以将递送构建体配制成适于储存的组合物。一种这种组合物是递送构建体与合适的稳定剂一起的冻干制剂。替代地,可以将递送构建体组合物配制为与一种或多种合适的稳定剂一起储存在溶液中。可以使用本领域技术人员已知的任何这种稳定剂而没有限制。例如,适用于冻干制剂的稳定剂包括但不限于糖、盐、表面活性剂、蛋白质、离液剂、脂质和氨基酸。适用于液体制剂的稳定剂包括但不限于糖、盐、表面活性剂、蛋白质、离液剂、脂质和氨基酸。可以在组合物中使用的特定稳定剂包括但不限于海藻糖、血清清蛋白、磷脂酰胆碱、卵磷脂和精氨酸。用于稳定递送构建体的冻干或液体制剂的其他化合物、组合物和方法可以参见,例如,美国专利号6,573,237、6,525,102、6,391,296、6,255,284、6,133,229、6,007,791、5,997,856和5,917,021。

[0383] 在各种实施方案中,将本公开的药物组合物配制用于口服递送。配制用于口服施用的药物组合物利用了细菌毒素介导胞吞转运穿过胃肠道(GI)上皮和/或递送到GI上皮细胞(例如肠道)内部的能力。预期这些药物组合物的口服施用将导致递送构建体通过消化性粘膜例如肠粘膜的极化上皮细胞吸收,然后在粘膜的基底外侧释放生物活性货物。在各种实施方案中,上皮细胞选自鼻上皮细胞、口腔上皮细胞、肠上皮细胞、直肠上皮细胞、阴道上皮细胞和肺上皮细胞。本公开的药物组合物可以包含添加胞吞转运增强剂以促进融合蛋白穿过GI上皮的转移。这种增强剂是本领域已知的。参见Xia等人,(2000)J.Pharmacol.Experiment.Therap.,295:594-600;以及Xia等人,(2001)Pharmaceutical Res.,18(2):191-195,各自通过引用以其整体并入本文。

[0384] 不受任何理论的束缚,假设一旦运送穿过GI上皮,本公开的递送构建体将在血清中显示延长的半衰期,即,与非融合状态下的生物活性货物相比,递送构建体的生物活性货物显示出延长的血清半衰期。这样,制备本公开的药物组合物的口服制剂,使得它们适合于转运至GI上皮并在胃中保护递送构建体。这种制剂可以包含运载体和分散剂组分,并且可

以是任何合适的形式，包括气雾剂(用于口服或肺部递送)、糖浆剂、酏剂、片剂(包含咀嚼片)、硬胶囊或软胶囊、锭剂、糖果、水性或油性悬浮液、乳剂、扁囊剂或颗粒剂以及可分散粉末。在各种实施方案中，药物组合物以适合于简单口服精确剂量的固体剂型例如片剂、胶囊等的形式使用。

[0385] 口服制剂可以包含递送构建体和一种或多种当递送构建体在胃中时可以对其进行保护的化合物。例如，保护性化合物应该能够防止递送构建体的酸和/或酶水解。在各种实施方案中，口服制剂包含递送构建体和一种或多种可以促进该构建体从胃向小肠转移的化合物。可以保护递送构建体免于在胃中降解的一种或多种化合物也可以促进构建体从胃向小肠的转移。例如，如在Mrsny等人，Vaccine 17:1425-1433,1999中所述，包含碳酸氢钠可用于促进胃内递送的物质从胃向十二指肠的快速运动。配制组合物以使递送构建体可以穿过胃并接触小肠中的极化上皮膜的其他方法包括但不限于在DeYoung,Int J Pancreatol,5Suppl:31-6,1989中描述的肠衣技术以及在美国专利号6,613,332、6,174,529、6,086,918、5,922,680和5,807,832中提供的方法，各自均通过引用整体并入本文。

[0386] 可以根据本领域已知的用于制造药物组合物的任何方法来制备用于口服用途的药物组合物，并且这种组合物可以包含一种或多种选自甜味剂的试剂，以提供药学上讲究且可口的制剂。例如，为了制备口服可递送的片剂，将递送构建体与至少一种药物赋形剂混合，并且根据已知方法将固体制剂压缩以形成片剂，以递送至胃肠道。片剂组合物通常与添加剂一起配制，例如糖或纤维素运载体、粘合剂(诸如淀粉糊或甲基纤维素)、填充剂、崩解剂或其他通常用于制造医疗制剂的添加剂。为了制备可口服递送的胶囊，将DHEA与至少一种药物赋形剂混合，并将固体制剂置于适于递送至胃肠道的胶囊容器中。可以如在Remington's Pharmaceutical Sciences,第十八版.1990(Mack Publishing Co.Easton Pa.18042)第89节中总体描述地制备包含递送构建体的组合物。

[0387] 可以将药物组合物配制成包含与非毒性药学上可接受的赋形剂混合的递送构建体的口服递送片剂，该赋形剂适合于制造片剂。这些赋形剂可以是惰性稀释剂，例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;制粒和崩解剂，例如玉米淀粉、明胶或阿拉伯胶，以及润滑剂，例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂可以是不包衣的，或者可以用已知技术包衣，以延迟在胃肠道中的崩解和吸收，从而在更长的时间内提供持续的作用。例如，可以使用延时材料，例如单独或与蜡一起使用的单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0388] 可以将药物组合物配制成硬明胶胶囊，其中将递送构建体与惰性固体稀释剂例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合，或者配制成软明胶胶囊，其中将递送构建体与水性或油性介质，例如落花生油、花生油、液体石蜡或橄榄油。

[0389] 水性悬浮液可以包含与适合于制备水性悬浮液的赋形剂混合的递送构建体。这些赋形剂是悬浮剂，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、西黄蓍胶和阿拉伯胶;分散剂或润湿剂可以是天然存在的磷脂，例如卵磷脂，或环氧烷与脂肪酸的缩合产物，例如聚氧乙烯硬脂酸酯，或环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物，例如十七烷基乙基氧鲸蜡醇，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物，例如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物，例如聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯。水性悬浮液还可包含一种或多种防腐剂，例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯、一种或多种着色剂、一种或多种调味剂和一种或多种

甜味剂例如蔗糖或糖精。

[0390] 可以通过将递送构建体悬浮在植物油(例如落花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或矿物油(例如液体石蜡)中来配制油性悬浮液。油性悬浮液可包含增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以添加诸如上述的甜味剂和调味剂以提供可口的口服制剂。这些组合物可以通过添加抗氧化剂例如抗坏血酸来保存。

[0391] 药物组合物可以是水包油乳剂的形式。油相可以是植物油,例如橄榄油或花生油,或矿物油,例如阿拉伯树胶或西黄蓍胶、天然存在的磷脂,例如大豆卵磷脂,以及衍生自脂肪酸或己糖醇酐的酯或偏酯,例如脱水山梨醇单油酸酯,以及相同偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯。乳剂还可以包含甜味剂和调味剂。

[0392] 药物组合物可以是片剂或胶囊的形式,并且该片剂或胶囊可以被包衣或封装以保护治疗或生物活性货物免受胃中的酶促作用并确保有足够的生物活性货物被受试者吸收以产生有效的反应。这种包衣或封装方法包括,例如,封装在由具有疏水主链和亲水支链作为药物运载体的聚合物组成的纳米颗粒中,封装在微粒中,插入到乳剂中的脂质体中,以及与其他分子缀合。在一些情况下,胶囊或片剂以pH依赖性方式释放递送构建体。如本文所述用于施用递送构建体的胶囊或片剂可包含一种或多种肠溶衣。

[0393] 纳米颗粒的示例包括包覆有壳聚糖和Carbopol的粘膜粘附性纳米颗粒(Takeuchi等人,Adv.Drug Deliv.Rev.47(1):39-54,2001)和含有带电荷的组合聚酯——聚(2-磺丁基乙烯醇)和聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)的纳米颗粒(Jung等人,Eur.J.Pharm.Biopharm.50(1):147-160,2000)。

[0394] 可以使用封装的或包衣的片剂,其以逐层方式释放生物活性货物,从而在预定时间范围内在沿着胃肠道移动时释放生物活性货物。另外,可以将包含生物活性货物的片剂放置在较大的片剂中,从而保护内部片剂不受环境和加工条件的影响,例如温度、化学试剂(例如溶剂)、pH和湿度。外片剂和包衣进一步用于在胃环境中保护生物活性货物。

[0395] 可以使用聚酯微球、玉米醇溶蛋白微球、类蛋白微球、聚氰基丙烯酸酯微球和基于脂质的系统来配制本文所述的药物组合物用于口服递送(参见例如DiBase和Morrel,Oral Delivery of Microencapsulated Proteins,in Protein Delivery:Physical Systems,Sanders and Hendren(eds.),第255-288页(Plenum Press 1997))。

[0396] 表面活化剂或表面活性剂促进通过粘膜或衬里吸收多肽。有用的表面活化剂或表面活性剂包括脂肪酸及其盐、胆汁盐、磷脂或烷基糖。脂肪酸及其盐的示例包括辛酸(C_8)、癸酸(C_{10})、月桂酸(C_{12})和肉豆蔻酸(C_{14})的钠盐、钾盐和赖氨酸盐。胆汁盐的示例包括胆酸、鹅去氧胆酸、甘氨胆酸、牛磺胆酸、甘氨鹅去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、脱氧胆酸、甘氨脱氧胆酸、牛磺脱氧胆酸、石胆酸和熊去氧胆酸的盐。磷脂的示例包括单链磷脂,诸如溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰甘油、溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰肌醇和溶血磷脂酰丝氨酸;或双链磷脂,诸如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰甘油、二酰基磷脂酰乙醇胺、二酰基磷脂酰肌醇和二酰基磷脂酰丝氨酸。烷基糖的示例包括烷基葡糖苷或烷基麦芽糖苷,例如癸基葡糖苷和十二烷基麦芽糖苷。

[0397] 本公开涉及允许口服施用本公开的药物组合物的方法和组合物。不受任何特定理论或作用机理的束缚,据信口服递送构建体可导致递送构建体通过消化性粘膜(例如肠粘膜)的极化上皮细胞吸收,随后裂解递送构建体并在粘膜基底外侧释放生物活性货物。因

此，当生物活性货物在肝脏中发挥生物活性时，例如发挥由IL-10与其同源受体结合而介导的活性时，基于在受试者中观察到的血浆浓度，据信该生物活性货物发挥了超出预期的作用，即口服施用递送构建体可以向受试者的肝脏中递送比在受试者血浆中观察到的浓度更高的有效浓度的生物活性货物。

[0398] 本公开涉及口服施用本公开的药物组合物的方法。这种方法可以包括但不限于由患者或护理人员口服施用组合物的步骤。这种施用步骤可包括以一定间隔施用，例如每天一次或两次，这取决于递送构建体、疾病或患者状况或个体患者。这种方法还包括施用各种剂量的单独的递送构建体。例如，药物组合物的初始剂量可以处于较高水平以诱导期望的作用，诸如血糖水平的降低。一旦达到期望的效果，随后可以减少后续剂量。对施用方案的这种改变或修改可以由主治医师或卫生保健工作者进行。

[0399] 这些药物组合物可以以合适的剂量向受试者施用。剂量方案可以由主治医生根据特定的临床因素确定。如医学领域公知的，任何一名患者的剂量均取决于许多因素，包含患者的体型、体表面积、年龄、所要施用的特定化合物、性别、施用时间和途径、总体健康状况以及同时施用的其他药物。对于给定情况的治疗有效量将容易地通过常规实验确定，并且在普通临床医生或医师的技能和判断之内。技术人员知道向个体施用的药物组合物的有效量尤其取决于生物活性货物的性质。观察到变化所需的治疗时间和治疗后发生应答的间隔根据期望的效果而变化。可以通过本领域技术人员公知的常规测试来确定具体的量。

[0400] 生物活性货物的量是有效实现特定活性剂的目的的量。组合物中的量通常是药理学、生物学、治疗上或化学上有效的量。但是，当该组合物以剂量单位形式如胶囊、片剂或液体使用时，该量可以小于药理学、生物学、治疗上或化学上有效的量，因为该剂量单位形式可以包含多种运载体/生物或化学活性剂组合物，或者可以包含药理学、生物学、治疗上或化学上有效量的细分的量。然后可以以累积单位施用总有效量，该累积单位总共包含药理学、生物学、治疗上或化学上活性量的生物活性货物。

[0401] 如本文所用，术语“共施用”，“共同施用”和“与……组合”是指本公开的递送构建体和一种或多种其他治疗剂，旨在表示并且确实是指和包含以下内容：当将本公开的递送构建体和治疗剂一起配制成单一剂型且该剂型基本上在同一时间向患者释放所述组分时，本公开的递送构建体和治疗剂的这种组合同时施用给需要治疗的患者；当本公开的递送构建体和治疗剂彼此分开配制成单独的剂型且它们基本上同时被患者服用并且之后基本上同时向所述患者释放所述组分时，本公开的递送构建体和治疗剂的这种组合基本上同时施用给需要治疗的患者；当本公开的递送构建体和治疗剂彼此分开配制成单独的剂型且它们在连续时间点(施用时间有显著间隔)被患者服用并且之后基本上不同时间向所述患者释放所述组分时，本公开的递送构建体和治疗剂的这种组合先后施用给需要治疗的患者；以及当本公开的递送构建体和治疗剂被配制成以可控的方式释放所述组分的单一剂型且它们在相同和/或不同的时间点以同时、连续和/或重叠的方式向患者释放时(其中每个部分可以以相同或不同的途径施用)，本公开的递送构建体和治疗剂的这种组合先后施用给需要治疗的患者。

[0402] 组合疗法可包括在相同药物组合物中或在分开的药物组合物中同时施用隔离性递送构建体组合物和第二药剂组合物。在各种实施方案中，隔离性递送构建体组合物和第二试剂组合物先后施用，即，隔离性递送构建体组合物在施用第二试剂组合物之前或之后

施用。

[0403] 隔离性递送构建体组合物和第二试剂组合物的施用可以是同时的，即，隔离性递送构建体组合物和第二试剂组合物的施用时间彼此重叠。

[0404] 隔离性递送构建体组合物和第二试剂组合物的施用可以是非同时的。例如，在各种实施方案中，在施用第二试剂组合物之前终止隔离性递送构建体组合物的施用。可以在施用隔离性递送构建体组合物之前终止施用第二试剂组合物。

治疗方法

[0405] 配制用于口服递送的药物组合物可以用于治疗特别适合口服配制和递送的某些类型的疾病或医学病症。这类的疾病或病症包括例如病毒性疾病或感染、癌症、代谢性疾病、肥胖症、自身免疫性疾病、炎症疾病、变态反应、移植物抗宿主病、系统性微生物感染、贫血、心血管疾病、精神病、遗传疾病、神经变性疾病、造血细胞疾病、内分泌系统或生殖系统疾病、胃肠道疾病。在许多慢性疾病中，本公开的递送构建体的口服制剂特别有用，因为它们允许通过家庭口服施用进行长期的患者护理和治疗，而无需依赖注射治疗或药物方案。

[0406] 本公开的药物组合物可包含本文所述的任何递送构建体，其包含本文所述的携带体、货物和/或间隔区的任何组合。具体而言，本文所述的递送构建体允许口服施用，随后可以运输递送构建体穿过受试者的上皮细胞或进入受试者的上皮细胞。已经穿过这种上皮层而运输的递送构建体随后可以到达受试者内的各个部分和/或器官和/或组织。递送构建体以及在各种情况下递送构建体所包含的货物可在到达粘膜下隔室时起作用。例如，生物活性货物可以是能够引发免疫反应的货物，因此一旦递送构建体到达粘膜下隔室，就可以将这种货物呈递给免疫细胞。

[0407] 本公开涉及用于治疗、预防和/或防止受试者中的炎症疾病的方法，其包括向受试者施用本公开的药物组合物。“炎症疾病”包括与急性或慢性炎症相关的所有疾病。急性炎症为身体对有害刺激物的初始应答，并且通过血浆和白细胞(诸如粒细胞)从血液向受损组织内的移动而产生。许多生化事件使炎症应答传播并成熟，涉及局部血管系统、免疫系统和受损组织内的各种细胞。长期的炎症称为慢性炎症，导致存在于炎症部位的细胞类型的进行性转变，并且其特征为炎性过程引起的组织的同时破坏与愈合。炎症疾病可能由例如灼伤、化学刺激物、冻伤、毒素、病原体感染、身体伤害、由于超敏反应引起的免疫反应、电离辐射或异物，例如碎片、污垢和碎屑而引起。炎症疾病的示例是是本领域公知的。

[0408] 炎症疾病可以选自炎性肠病、银屑病和细菌性脓毒症。如本文所用，术语“炎性肠病”是指结肠和小肠的一组炎性病症，包含例如克罗恩病、溃疡性结肠炎、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、缺血性结肠炎、改道性结肠炎、白塞综合征和未定型结肠炎。可用于预防和/或治疗这种炎症疾病的递送构建体包括那些包含SEQ ID NO:154和/或SEQ ID NO:155中所列的氨基酸序列的构建体。

[0409] 根据本公开的“克罗恩病”是T辅助1型(Th1)炎性肠病，其免疫应答模式包括产量增加的白细胞介素12、肿瘤坏死因子(TNF)和γ干扰素(Romagnani.Inflamm Bowel Dis 1999;5:285-94)，这可能会对受其折磨的患者的生活产生毁灭性的影响。克罗恩病的常见症状包括腹泻、痉挛、腹痛、发烧甚至直肠出血。克罗恩病及其相关联的并发症通常导致患者需要手术，而且往往不止一次。目前克罗恩病没有治愈方法，而且长期有效的治疗选择受到限制。治疗的目标是控制炎症，纠正营养不足并缓解腹痛、腹泻和直肠出血等症状。虽然

治疗可以通过减少个人复发的次数来帮助控制疾病，但是无法治愈。治疗可以包括药物、营养补充剂、手术或这些选项的组合。可以给予治疗的常见治疗方法包括抗炎药，包括柳氮磺吡啶、可的松或类固醇，包括泼尼松，免疫系统抑制剂，例如6-巯基嘌呤或硫唑嘌呤，以及抗生素。

[0410] 根据本公开的“银屑病”是影响皮肤和关节的疾病。通常会导致皮肤上出现红色鳞屑斑块。由银屑病引起的鳞片状斑称为银屑病斑，是发炎和皮肤过度分泌的区域。皮肤迅速聚集在这些部位，并呈现银白色外观。斑块经常出现在肘部和膝盖的皮肤上，但会影响包括头皮和生殖器在内的任何区域。推断银屑病是免疫介导的，不会传染。该疾病是一种慢性复发性疾病，其严重程度从轻微的局部性斑块到全身覆盖不等。手指甲和脚趾甲经常受到影响(银屑病性指甲营养不良)并且可以看作是单独的发现。银屑病也可引起关节发炎，这被称为银屑病关节炎。银屑病患者中有10％至15％患有银屑病关节炎。

[0411] 如本文所用，术语“细菌性脓毒症”是指由于细菌在血流中的循环而导致的危及生命的状况。脓毒症导致促炎性细胞因子的全身性系统产生，这会由于微循环的失效而导致组织损伤和最终败血性休克。

[0412] 本公开涉及用于治疗、预防和/或防止受试者中的自身免疫性疾病的方法，包括向受试者施用本公开的药物组合物。与本公开有关的自身免疫性疾病是源自并且针对个体自身组织的疾病或病症，或其共同分离(co-segregate)或表现，或由此产生的病症。在各种实施方案中，自身免疫性疾病选自系统性红斑狼疮(SLE)、寻常型天疱疮、重症肌无力、溶血性贫血、血小板减少性紫癜、格雷夫斯病、斯耶格伦氏病、皮肌炎、桥本病、多发性肌炎、炎性肠病、糖尿病、类风湿性关节炎和硬皮病。可以用于治疗那些疾病的示例性递送构建体可以包括那些与例如抗TNFα抗体或其功能结合片段偶联的包含SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:125中所列的任何携带体的递送构建体。

[0413] 根据本公开的“类风湿性关节炎”是一种自身免疫性疾病，其引起身体的免疫系统攻击骨关节(Muller B等人，Springer Semin.Immunopathol.，20:181-96，1998)。类风湿性关节炎是一种慢性全身性炎症疾病，可影响许多组织和器官，但主要侵袭滑膜关节。该过程产生滑膜的炎性反应(滑膜炎)，继发于滑膜细胞增生、滑液过多和滑膜中血管翳的发育。疾病过程的病理通常导致关节软骨的破坏和关节的强直。类风湿性关节炎还可以在肺、心包、胸膜和巩膜中产生弥漫性炎症，还可以形成结节性病变，最常见于皮肤下的皮下组织。

[0414] 本公开涉及用于治疗、预防和/或防止受试者中的癌症的方法和组合物，包括向受试者施用本公开的药物组合物。要治疗的癌症包括但不限于非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、胰腺癌、结肠癌、胃癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑素瘤和利妥昔单抗抗性NHL和白血病。

[0415] 治疗有效量的本公开的药物组合物将与一种或多种其他治疗剂组合施用。这种治疗剂在本领域中可以被接受为用于本文所述的特定疾病状态，例如炎症疾病、自身免疫性疾病或癌症的标准治疗。预期的示例性治疗剂包括但不限于细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DMARD、抗炎药、化疗剂、放疗剂或其他活性和辅助剂。

[0416] 本公开涉及用于治疗、预防和/或防止受试者中的代谢障碍的方法，包括向受试者施用本公开的药物组合物。在各种实施方案中，代谢障碍选自：糖尿病、肥胖症、由于肥胖症

引起的糖尿病、高血糖症、血脂异常症、高甘油三酯血症、X综合征、胰岛素抵抗、糖耐量减低(IGT)、糖尿病血脂异常症和高血脂症。

[0417] 本公开涉及在受试者中治疗、预防和/或防止受试者中的脂肪肝疾病(例如,非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD);非酒精性脂肪性肝炎(NASH))、胃肠疾病或神经变性疾病的方法,包括向受试者施用本公开的药物组合物。

[0418] 本公开涉及用于治疗、预防和/或防止受试者中的生长激素缺乏性生长障碍的方法和组合物,所述方法包括向受试者施用本公开的药物组合物。在各种实施方案中,所述疾病选自:生长激素缺乏症(GHD)、特纳综合征(TS)、努南综合征、普拉德-威利综合征、含身材矮小症同源框的基因(SHOX)缺陷、慢性肾功能不全,和特发性身材矮小症短肠综合征,因罕见垂体瘤或它们的治疗所致的生长激素缺乏症,以及与HIV/AIDS相关联的肌萎缩疾病。

[0419] 本公开的受试者可以是人或啮齿动物。受试者可以是人。受试者可受到以下一种或多种的影响:炎性肠病、银屑病、细菌性脓毒症、系统性红斑狼疮(SLE)、寻常型天疱疮、重症肌无力、溶血性贫血、血小板减少性紫癜、格雷夫斯病、斯耶格伦氏病、皮肌炎、桥本疾病、多肌炎、炎性肠病、多发性硬化症(MS)、糖尿病、类风湿性关节炎、硬皮病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、急性成淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑素瘤、利妥昔单抗抗性NHL或白血病、糖尿病、肥胖症、由肥胖症导致的糖尿病、高血糖、血脂异常症、高甘油三酯血症、X综合征、胰岛素抵抗、糖耐量减低(IGT)、糖尿病血脂异常症、高脂血症、生长激素缺乏症(GHD)、特纳综合征(TS)、努南综合征、普拉德-威利综合征、含身材矮小症同源框的基因(SHOX)缺陷、慢性肾功能不全或特发性矮小矮肠综合征。

[0420] 本文所述的方法和组合物也可用于诊断疾病或状况。诊断疾病或状况可以包括侵入性和非侵入性诊断方式。具体而言,本文所述的组合物可用于例如通过测量某些标志物(例如生物标志物)或抗原的表达来非侵入性地诊断疾病。可以通过将货物偶联到携带体来进行这种诊断,其中货物可以对某种标志物(例如,在某种器官、组织或细胞中的存在或浓度代表某种疾病或状况的生物分子)具有结合亲和力。本文所述的诊断可进一步包括监测对治疗(例如,受试者的治疗)的反应。例如,如果对治疗的反应与某些标志物(例如,生物标志物)的减少相关,则本公开的递送构建体可用于在某个位置测量此类标志物(例如,黏膜下隔室中的某个免疫细胞群体)。除了非侵入性诊断之外,本文所述的方法和组合物还可用于提供生物学和/或治疗相关的信息,例如在从受试者获取活检样品后,可进行免疫组织化学研究,例如检测在某些组织等中的递送构建体的积累。

[0421] 非侵入性诊断可以包括分子和/或核成像。例如,递送构建体可以包含用荧光和/或放射性化合物标记的货物,使得可以在施用后在受试者中确定这种递送构建体的位置和/或浓度。如本文所述的具有诊断适用性的任何部分均可用于提供诊断和/或治疗诊断(治疗和诊断)剂。

编码递送构建体的多核苷酸

[0422] 本公开的方法和组合物提供了包含编码非天然存在的递送构建体和/或杂种递送构建体多肽的核苷酸序列的多核苷酸。这些多核苷酸可用于例如制备递送构建体和/或杂种递送构建体多肽。本公开提供了表达系统,其包含编码细菌携带体受体结合域的重组多核苷酸序列,和编码生物活性货物的多核苷酸序列的多间隔区插入位点。多间隔区插入位

点可以在多核苷酸序列中的任何位置，只要多间隔区插入不破坏细菌毒素的递送构建体即可。表达系统可包含编码可裂解的间隔区的多核苷酸序列，使得在可裂解的间隔区处的裂解将由插入多间隔区插入位点的核酸所编码的生物活性货物与所编码的递送构建体的其余部分分开。因此，在其中多间隔区插入位点在编码的构建体的末端的实施方案中，多核苷酸包含一个核苷酸序列，该核苷酸序列编码在多间隔区插入位点和多核苷酸的其余部分之间的可裂解的间隔区。在其中多间隔区插入位点不在编码的构建体的末端的实施方案中，多间隔区插入位点可以在各自编码可裂解间隔区的核苷酸序列的侧翼。

[0423] 可以用于制备编码递送构建体(可用于本公开的递送构建体)的多核苷酸的各种体外方法包括但不限于逆转录、聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、基于转录的扩增系统(TAS)、自我维持的序列复制系统(3SR)和QP复制酶扩增系统(QB)。可以使用本领域技术人员已知的可用于构建重组核酸的任何这类技术。例如，可以使用基于递送构建体的DNA序列或编码受体结合域的核苷酸的引物，通过cDNA的聚合酶链反应来分离编码该蛋白质或其一部分的多核苷酸。

[0424] 使用这些克隆和体外扩增方法的指南在例如美国专利号4,683,195;Mullis等人，1987,Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.51:263;以及Erlich编,1989,PCR Technology,Stockton Press,NY中描述。还可以通过在严格、中等严格或高度严格的杂交条件下，使用选自期望多核苷酸序列的探针来筛选cDNA文库的基因组，来分离编码递送构建体或其一部分的多核苷酸。

[0425] 此外，多核苷酸还可在编码的递送构建体的氨基末端处编码分泌序列。这种构建体可用于在哺乳动物细胞中产生递送构建体，因为它们简化了递送构建体和/或杂种递送构建体多肽的分离。

[0426] 此外，本公开的多核苷酸还涵盖编码递送构建体的多核苷酸的衍生形式。这种衍生物可以通过本领域技术人员已知的任何方法制造而没有限制。例如，可以通过位点特异性诱变来制备衍生物，包括置换、插入或删除编码递送构建体的多核苷酸的一个、两个、三个、五个、十个或更多个核苷酸。或者，可以通过随机诱变制备衍生物。一种用于随机诱变核酸的方法包括在存在0.1mM $MnCl_2$和不平衡核苷酸浓度的情况下，在PCR反应中扩增核酸。这些条件增加了PCR反应中所用的聚合酶的不准确掺入率，并导致了扩增核酸的随机诱变。

[0427] 因此，本公开提供了可以编码一个或多个递送构建体的多核苷酸。递送构建体包含细菌携带体和要递送至受试者的生物活性货物;以及任选的不可裂解或可裂解的间隔区。在可裂解间隔区处的裂解可将生物活性货物与递送构建体的其余部分分开。可裂解间隔区可以被存在于受试者的极化上皮细胞的基底外侧膜或受试者的血浆中的酶裂解。

[0428] 多核苷酸可以在严格的杂交条件下与本公开的任何多核苷酸杂交。多核苷酸可以在严格条件下与编码本公开的任何递送构建体的核酸杂交。

[0429] 本公开提供用于表达递送构建体和/或杂种递送构建体多肽的表达载体。通常，表达载体是重组多核苷酸分子，包含与编码多肽的核苷酸序列可操作地联接的表达控制序列。通过包含适当的启动子、复制序列、选择标记等，表达载体可以容易地适于在原核生物或真核生物中起作用，以产生稳定的转录和翻译或mRNA。构建表达载体和在包含表达载体的细胞中表达基因的技术是本领域公知的。参见，Sambrook等人，2001,Molecular Cloning--A Laboratory Manual,第三版,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring

Harbor,N.Y.和Ausubel等人编,现行版,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and Wiley Interscience,NY。

[0430] 用于表达载体的有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导的MMTV启动子、SV40启动子、MRP pol III启动子、组成型MPSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(例如人即刻早期CMV启动子)和组成型CMV启动子。

[0431] 表达载体应包含与表达递送构建体的细胞相容的表达和复制信号。可用于表达递送构建体的表达载体包括病毒载体,例如逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒、质粒载体、粘粒等。为了将表达载体转染到哺乳动物细胞中,优选病毒和质粒载体。例如,其中表达控制序列包含CMV启动子的表达载体pcDNA1(Invitrogen,San Diego,Calif.)提供了良好的转染率和在这些细胞中的表达率。

[0432] 可以通过本领域技术人员已知的任何方法将表达载体体引入细胞中以表达递送构建体,而没有限制。这种方法包括但不限于例如细胞从溶液中直接摄取分子;使用例如脂质体或免疫脂质体通过脂质转染促进摄取;粒子介导的转染等。参见例如美国专利号5,272,065;Goeddel等人编,1990,Methods in Enzymology,vol.185,Academic Press,Inc.,CA;Krieger,1990,Gene Transfer and Expression--A Laboratory Manual,Stockton Press,NY;Sambrook等人,1989,Molecular Cloning--A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,NY;以及Ausubel等人编,现行版,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and Wiley Interscience,NY。

[0433] 表达载体还可包含纯化部分,其简化了递送构建体和/或杂种递送构建体多肽的分离。例如,可以在蛋白质的氨基末端掺入例如六个组氨酸残基的聚组氨酸部分。聚组氨酸部分允许通过镍螯合层析在单个步骤中方便地分离蛋白质。在各种实施方案中,纯化后可以从递送构建体的其余部分裂解纯化部分。在其他实施方案中,该部分不干扰递送构建体的功能结构域的功能,因此不需要被裂解。

[0434] 本公开提供了可以包含用于表达递送构建体和/或杂种递送构建体多肽或其部分的表达载体的细胞。可以根据表达高浓度递送构建体以促进蛋白质纯化的能力来选择细胞。在各种实施方案中,细胞是原核细胞,例如大肠杆菌。如实施例中所述,当在大肠杆菌中表达时,将递送构建体适当折叠并包含适当的二硫键。该细胞可以是真核细胞。有用的真核细胞包括酵母和哺乳动物细胞。非限制性地,本领域技术人员已知的可用于表达重组多肽的任何哺乳动物细胞均可用于表达递送构建体。例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞可用于表达递送构建体。如下所述,可以通过重组而产生本公开的递送构建体和/或杂种递送构建体多肽。但是,递送构建体也可以使用本领域技术人员已知的方法通过化学合成来产生。

[0435] 可以使用各种方法来产生本公开的递送构建体。生产方法的选择可以取决于递送构建体和/或其组分(例如,携带体、货物和/或间隔区)的分子结构。因此,对于一些递送构建体,有机合成方法对于产生这种递送构建体可能是有利的。本公开的递送构建体可以是多肽。这种多肽可以例如使用重组DNA方法论来产生。通常,这涉及创建编码递送构建体的DNA序列,将DNA置于在特定启动子控制下的表达盒中,在宿主中表达分子,分离所表达的分子,以及若需要,将分子折叠成活性构象形式。

[0436] 可以通过任何合适的方法来制备编码本文所述的递送构建体的DNA,包括例如克隆和限制适当的序列,或者通过诸如Narang等人(1979)Meth.Enzymol.68:90-99的磷酸三

酯法;Brown等人(1979)Meth.Enzymol.68:109-151的磷酸二酯法;Beaucage等人(1981)Tetra.Lett.,22:1859-1862的二乙基亚磷酰胺法;美国专利号4,458,066的固体支持法等方法直接化学合成。

[0437] 化学合成产生单链寡核苷酸。通过与互补序列杂交或通过使用单链作为模板用DNA聚合酶聚合,可以将其转化为双链DNA。本领域技术人员将认识到,尽管DNA的化学合成仅限于约100个碱基的序列,但可以通过连接较短的序列获得较长的序列。

[0438] 或者,可以克隆子序列,并使用适当的限制酶裂解适当的子序列。然后可以将片段连接以产生期望的DNA序列。可以使用DNA扩增方法诸如聚合酶链反应(PCR)来克隆编码本公开的递送构建体的DNA。因此,例如,使用含有例如NdeI的限制位点的有义引物和含有HindIII的限制位点的反义引物对生物活性货物的基因进行PCR扩增。这可以产生编码生物活性货物序列并具有末端限制位点的核酸。具有“互补”限制位点的递送构建体可以类似地被克隆,然后连接至生物活性货物和/或与生物活性货物附接的间隔区。核酸序列的连接和向载体中的插入产生了编码与细菌载体受体结合域连接的生物活性货物的携带体。在各种实施方案中,通过例如固相DNA合成来人工合成编码本公开的递送构建体的DNA。

[0439] 本文所述的生产方法可以用于生产本公开的递送构建体或其(功能)变体。例如,“Cholix”(在本文中也称为Cholix毒素或Cholix外毒素)可以包含多种功能变体(例如,功能属),其中所述功能变体可以包含一个或多个变异,所述变异是其氨基酸序列相对于本文公开的SEQ ID NO:1的变异。因此,在本公开中,当提及Cholix时,将具有SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的Cholix毒素用作参考序列。然而,如本文所述,本公开不限于具有SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的Cholix,而是包含落入Cholix功能属内的所有Cholix变体。例如,具有SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的Cholix外毒素的变体可以是氨基酸序列如SEQ ID NO:2中所列的Cholix外毒素,其中两个变体能够执行相同的功能,例如穿过上皮细胞的胞吞转运,并与相同的受体,例如ribophilin 1、SEC24、CK-8、TMEM132、GRP75、ERGIC-53和/或串珠蛋白聚糖相互作用。

[0440] 此外,多肽的生产方法可以在某种程度上影响这种多肽的氨基酸序列(例如,由于翻译后修饰)。例如,第一携带体和第二携带体在相同的表达系统(例如,细菌表达系统诸如大肠杆菌,或哺乳动物表达系统,例如CHO细胞)中产生。在其他情况下,并且如本文所述,第一携带体和第二携带体在不同的表达系统(例如细菌或哺乳动物表达系统)中产生。例如,细菌表达系统包含大肠杆菌,而哺乳动物表达系统包含CHO细胞。通过细菌产生的多肽可以包含N帽,其中N帽可以包含在多肽的N末端的一个或多个修饰。N帽可以包含N末端甲硫氨酸残基。可以通过细菌产生并包含这种N末端甲硫氨酸的Cholix结构域I衍生的携带体多肽的示例包括包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:107和SEQ ID NO:135中所列的氨基酸序列的那些。

实验方法

[0441] 胞吞转运测试。可以根据递送构建体穿过上皮膜的能力来测试隔离性递送构建体的胞吞转运功能。因为胞吞转运作用首先需要与上皮细胞接合,所以这些测定也可以用来评估递送构建体的功能。

[0442] 非限制性地,可以通过本领域技术人员已知的任一方法来测试递送构建体的胞吞转运活性。在各种实施方案中,可以通过评估递送构建体进入与其结合的非极化细胞的能

力来测试胞吞转运活性。在Cholix衍生的携带体的情况下，且在不打算受任何特定理论或作用机制的约束的情形下，本文描述的是，允许递送构建体穿过极化上皮细胞的胞吞转运功能和进入非极化细胞的功能存在于相同的结构域中，即，本文描述为结构域I的结构域。因此，例如，可以通过检测构建体在细胞内部的物理存在来评估递送构建体进入细胞的能力。例如，递送构建体可以用例如荧光标志物标记，并且将递送构建体暴露于细胞外。然后，洗涤细胞，去除任何未进入细胞的递送构建体，并确定剩余标签的量。在这种情况下检测到的标签表示递送构建体已经进入到细胞中。

[0443] 可通过评估递送构建体穿过极化上皮细胞的能力来测试递送构建体的胞吞转运能力。例如，递送构建体可以用例如荧光标志物(例如，RFP)来标记，并与一层上皮细胞的顶端膜接触。在由上皮细胞形成的膜的基底侧检测到的荧光表明了胞吞转运结构域正在适当地起作用。

[0444] 可以采用雄性Wistar大鼠来测试体内胞吞转运作用。每笼可容纳雄性Wistar大鼠3-5只，光/暗周期为12/12小时，研究时体重为225-275克(大约6-8周大)。采用使用了持续异氟醚麻醉的非恢复方案在光照阶段进行实验。切一个4-5cm的能使空肠中段露出的腹部中线切口。在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中制备浓度为3.86x 10^{-5}M试品的原液，使用29号针经管腔内注射(ILI)施用50μL(每250g大鼠)。然后，采用永久性标志物标记注射部位的肠系膜。在研究结束时，可以分离出一个3-5mm的捕捉到了被标记肠段的区域，并进行显微评估处理。根据1986年英国动物(科学程序)法案、1986年欧洲共同体理事会指令(86/609/EEC)和巴斯大学的伦理审查程序进行体内实验。

[0445] 可裂解间隔区的裂解测试。一般以裂解分析法来测试可裂解间隔区的功能。本领域技术人员已知的任何适宜的裂解分析法都可以用于测试可裂解间隔区，没有限制。基于细胞和无细胞的分析法都可用来测试酶裂解可裂解间隔区的能力。

[0446] 用于测试可裂解间隔区的裂解的示例性无细胞分析法包括制备极化上皮细胞的提取物，将承载可裂解间隔区的被标记递送构建体暴露于提取物的与膜相关酶对应的部分。在此类分析法中，标签可附接在待递送的生物活性货物或递送构建体的剩余部分上。在这些酶之中，裂解酶位于极化上皮细胞的基底侧膜附近，如上所述。例如，可通过将递送构建体与例如抗体结合并洗掉未结合分子来检测裂解。如果标签附接在待递送的生物活性货物上，则应在与抗体结合的分子上观察到少量的标签或者无标签。或者，分析法中使用的结合剂可以对生物活性货物具有特异性，并且可标记构建体的剩余部分。无论哪种情况，都可以评估裂解。

[0447] 还可以采用基于细胞的分析法来测试裂解，所述基于细胞的分析法通过组装在半渗透膜上的极化上皮细胞来测试裂解。例如，可使标记的递送构建体或者包含可裂解间隔区的递送构建体的一部分在允许间隔区裂解的条件下与适宜的上皮细胞如Caco-2细胞的顶端或基底侧接触。可通过采用特异性地结合递送构建体或其一部分的试剂检测标签是否存在来检测裂解。例如，对递送构建体有特异性的抗体可用于结合递送构建体，所述构建体包含相对于递送构建体被抗体结合的部分而言位于可裂解间隔区远端的标签。然后再通过检测在与抗体结合的分子上是否存在标签来评估裂解。如果发生裂解，则在与抗体结合的分子上应观察到少量标签或无标签。通过进行此类实验，可鉴定优先在基底侧膜而非顶端膜处进行裂解的酶，并且进一步地，可确认此类酶裂解递送构建体中的可裂解间隔区的能

力。

[0448] 进一步地,还可使用美国专利6,759,207中所述的荧光报告基因测定法来测试裂解。简而言之,在此类测定法中,荧光报告基因在允许裂解酶裂解报告基因的条件下与单层适宜上皮细胞的基底侧接触。报告基因的裂解改变荧光报告基因的结构,从而使其从非荧光构造变为荧光构造。观察到的荧光的量表示存在于基底侧膜处的裂解酶的活性。

[0449] 进一步地,还可使用分子内淬灭的分子探针如美国专利6,592,847所述的那些来测试裂解。此类探针一般包含有受到适宜波长的光激发时会发出光子的荧光部分和与荧光部分接近时会吸收光子的淬灭部分。探针的裂解使淬灭部分与荧光部分分离,使得可检测到荧光,从而表明已发生了裂解。因此,可使用这类探针来鉴定和评估由特定裂解酶进行的裂解,具体方法是在允许裂解酶裂解探针的条件下将单层适宜上皮细胞的基底侧与探针接触。观察到的荧光的量表示被测试的裂解酶的活性。

[0450] 体内研究。每笼可容纳雄性Wistar大鼠3-5只,光/暗周期为12/12小时,禁食一晚后对其进行研究时,体重为225-275克(约6-8周大)。所有的实验都是在光照阶段进行的,并且采用使用了持续异氟醚麻醉的非恢复方案进行。切一个4-5cm的腹部中线切口,以露出小肠(空肠中段至回肠近端)。用29号皮下注射针,以200μL/kg(或约50μL/250g大鼠)的体积,管腔内注射在磷酸盐缓冲盐水中制备的外毒素A(PE)-RPF或Cholix-RFP截短嵌合体的等摩尔原液。用永久墨水笔标记每个管腔内注射部位的相邻肠系膜。以选定的时间间隔,对动物实施安乐死,并分离出一个3-5mm的捕获被标记肠段的区域。所有实验均按照1986英国动物(科学程序)法案、1986欧洲共同体理事会指令(86/609/EEC)和巴斯大学的伦理审查程序进行。

[0451] 显微术。分离的组织在冰冷的PBS中短暂冲洗,然后在冰上用4%多聚甲醛固定,之后用针对外毒素A(PE)、Cholix或RFP的一抗标记。使用Zeiss LSM 510荧光显微镜来评估可识别这些一抗的荧光标记二抗的组织分布。DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)作用核染色剂。

[0452] 免疫组织化学。在逐渐降低的乙醇浓度下对组织载玻片再水化。将载玻片分别浸入histoclear(x2)、100%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇和PBS中5分钟。将载波片在10mM柠檬酸钠(pH 6)中煮10分钟。从煮器中取出,冷却20分钟。干燥载玻片,并用ImmEdge疏水性笔在每个组织切片周围加一个蜡边。通过将PBS直接移液到组织上来洗涤组织切片。洗3x 5分钟。通过将含0.2%Triton x-100的PBS移液到切片上来渗透组织。在室温下温育45分钟。用PBS洗涤3x 5分钟。通过将含2%BSA和2%驴血清以及0.1%Triton x-100的PBS移液到切片上来阻断组织切片。在室温下温养2小时。去除阻断溶液并添加一抗。将抗体在含0.05%Triton x-100和1%BSA的PBS中稀释至所需浓度。在4℃下温育过夜。用PBS洗涤3x 5分钟。与二抗温育。在含0.05%Triton x-100和1%BSA的PBS中将抗体稀释至所需浓度。在室温下温育2小时。用PBS洗涤3x 5分钟。在室温下与200nM DAPI温育45分钟。用PBS洗涤3x 5分钟。通过分别浸入70%乙醇、100%乙醇、histoclear和100%乙醇中5分钟来使组织切片脱水。在每个组织切片上滴一滴萤光屏安装介质,并用玻璃盖玻片盖住。轻轻地对盖玻片施加压力,以消除气泡。使安装介质干燥4小时。在4℃下储存载玻片,并用共焦荧光显微镜成像。

[0453] Cholix结构域I相互作用蛋白的评估。为了鉴定Cholix和/或PE相互作用伴侣(例

如,受体、酶等)以及确定与Cholix或PE外毒素(例如,那些外毒素的结构域I或其截短形式)相互作用的囊泡隔室,可以进行一系列的拉下(pull-down)操作以鉴定潜在的相互作用伴侣,然后可使用表面等离子共振进行计算机模拟缔合,使用极化Caco-2人肠上皮细胞进行体外胞吞转运研究(其中可以实现特定靶标的基因敲减),以及体内胞吞转运研究(其中Cholix元件和特定受体可共定位于已建立的囊泡结构中)。在不受任何理论约束的情况下,假设胞吞转运过程可涉及某些元件,这些元件通常限于极化肠上皮细胞的特定囊泡元件内,但却可以被例如Cholix结构域I或其截短形式招募或"劫持",从而离开晚期内体并在顶端受体介导的胞吞后避免溶酶体降解。

实施例

[0454] 以下实施例仅对本公开进行了说明,并不旨在以任何方式限制本公开。

实施例1

Cholix和PE衍生的递送构建体的制备

[0455] 本实施例描述了递送构建体的示例性制备,所述递送构建体包含与异源性货物联合的截短的Cholix携带体(在结构域II和/或Ib中的截短)和截短的PE携带体(结构域II和/或Ib中的截短)。在本实施例中,将各种非天然存在的递送构建体制备为单个的氨基酸序列并包含经修饰的Cholix携带体序列和/或经修饰的PE携带体序列、聚甘氨酸丝氨酸肽间隔区序列和异源性货物。

[0456] 制备以下经修饰的Cholix和/或PE携带体并将其用于制备构建体1-12:1)在SEQ ID NO:1的425位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体($Cholix^{425}$,SEQ ID NO:129);2)SEQ ID NO:1的415位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体($Cholix^{415}$,SEQ ID NO:130);3)SEQ ID NO:1的397位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体($Cholix^{397}$,SEQ ID NO:131);4)在SEQ ID NO:1的386位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体($Cholix^{386}$,SEQ ID NO:132);5)在SEQ ID NO:1的291位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体($Cholix^{291}$,SEQ ID NO:133);6)在SEQ ID NO:1的265位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体($Cholix^{265}$,SEQ ID NO:4);7)在SEQ ID NO:3的404位氨基酸残基处截短的经修饰的PE携带体(PE^{404},SEQ ID NO:140);8)在SEQ ID NO:3的395位氨基酸残基处截短的经修饰的PE携带体(PE^{395},SEQ ID NO:141);9)在SEQ ID NO:3的375位氨基酸残基处截短的经修饰的PE携带体(PE^{375},SEQ ID NO:142);10)在SEQ ID NO:3的364位氨基酸残基处截短的经修饰的PE携带体(PE^{364},SEQ ID NO:143);11)在SEQ ID NO:3的277位氨基酸残基处截短的经修饰的PE携带体(PE^{277},SEQ ID NO:144);以及12)在SEQ ID NO:3的252位氨基酸残基处截短的经修饰的PE携带体(PE^{252},SEQ ID NO:145)。在每个构建体1-12中,将聚甘氨酸-丝氨酸肽间隔区GTGGS(SEQ ID NO:201)用于在每个经修饰的毒素的C末端处联合红色荧光蛋白(RFP,SEQ ID NO:220)。RFP模拟了生物活性货物的存在。

[0457] 从商业来源获得密码子优化的基因并将其克隆至pET26(+)表达载体中,所述pET26(+)表达载体用于使用制造商推荐的方案转化BL21(DE3)感受态大肠杆菌。用卡那霉素/琼脂平板筛选克隆,在37℃下温育过夜。通过1mM-IPTG诱导实现蛋白质在所选克隆的发酵培养基中的表达。将沉淀的细菌裂解以收集包涵体,将所述包涵体在50mM Tris、20mM EDTA、2.5%Triton X-100、0.5M NaCl、pH 8中彻底洗涤,然后通过在100mM Tris、pH 8、7M盐酸胍中声波处理来促进溶解。在离心使不溶性物质沉淀并添加二硫苏糖醇后,使用含有

100mM Tris、pH 8、0.5M L-精氨酸、1M尿素、2mM EDTA、1mM氧化谷胱甘肽(新鲜制成)和1mM还原谷胱甘肽(新鲜制备)的混洗缓冲液来重折叠上清液中的蛋白质,所述混洗缓冲液在4℃下用25mM Tris、pH 8、0.1M尿素和1mM EDTA进行透析。经过0.45μm过滤后,采用离子交换和大小排阻层析来纯化所需的蛋白质。采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析最后的蛋白质样品,并于-80℃进行储存。

实施例2

评估外毒素衍生的携带体分子的递送功能的体内实验

[0458] 本实施例描述了一项评估本文所述的外毒素衍生的携带体分子的上皮运输与递送功能的示例性体内研究。

[0459] 所述体内研究采用了雄性成年Wistar大鼠,7-8周大,平均体重大约250g。如果有需要,采用非复原方案进行实验。一般来说,大鼠吸入异氟醚而麻醉,并在必要时,通过吸入CO_2进行安乐死。实验开始于在腹部开一个约4厘米长的切口,以接近小肠空肠中段。制造切口后,使用1mL注射器,通过27号针头,将大约50μL的含有一种递送构建体或多种递送构建体的浓度约为1-1.5mg/mL的制备溶液注入没有食物的肠腔区域。紧邻注射部位的肠系膜用标志物标记,将肠返回腹腔,用夹子闭合切口。在特定时间点,取回被注射的肠,手术分离并用4℃等渗PBS溶液冲洗。

[0460] 将洗涤、切下的样品在4℃下固定(PBS中4%多聚甲醛)过夜,然后通过分级的一系列乙醇/水溶液脱水并在氯仿中温育过夜。将脱水的组织浸泡在蜡中,切片,并装在聚赖氨酸载玻片上,并用柠檬酸钠进行抗原修复处理。此后,切片用含0.2%Triton-X100的PBS渗透,然后再在PBS中洗涤三次以及用2%BSA+2%动物血清阻断,增加二抗。一抗在含1%BSA、0.1%Triton-X100的PBS中稀释,并在4℃的加湿空气中温育过夜。荧光二抗先在含1%BSA、0.1%Triton-X100的PBS中稀释并在室温下温育2小时,然后再进行共聚焦显微镜处理。有时,收集注射部位处大约1厘米的肠段以用于生化研究。

实施例3

特异性标志物蛋白在胞吞转运和细胞内递送期间与Cholix衍生的递送构建体的相互作用的评估

[0461] 本实施例示出了特定细胞隔室的蛋白质或标志物的示例性列表,使用免疫组织化学(IHC)染色和免疫荧光共聚焦显微术并在评估本公开的递送构建体时对齐进行分析。

[0462] 以下表13示出了本文使用的示例性细胞隔室特异性蛋白质标志物。例如,在实验过程中,使用针对IL-10的单克隆抗体(mAb)和/或针对Cholix携带体(例如,截短结构域I)的多克隆抗体(pAb),跟踪了包含IL-10作为异源性货物的Cholix衍生的递送构建体。

表13—细胞隔室特异性蛋白质标志物

靶标	pAb/mAb	物种反应性	宿主	IHC (P)的稀释倍数	注释	储存	分类号
Cholix[3]86携带体	pAb		兔子	1/500	全抗血清	-20°C	
IL-10	mAb ; pAb	人	小鼠、山羊	1/25		-20°C	
EEA1	pAb	小鼠、大鼠、人	兔子	1/200	早期内体	-20°C	Ab2900
Rab7	mAb	小鼠、大鼠、人	兔子	1/100	晚期内体	-20°C	Ab1267712
Rab11	pAb	小鼠、大鼠、人，兔子、狗	兔子	1/500	循环内体	-20°C	Fisher71-5300
LAMP1	pAb	小鼠、大鼠、人	兔子	1/500	溶酶体标志物	-20°C	Ab24170
GM130	pAb	小鼠、大鼠、人	兔子	1/500	顺式高尔基体	-20°C	
Glantin	mAb	大鼠、人	小鼠	1/20	高尔基体	-20°C	Ab37266
58K高尔基体蛋白	mAb	小鼠、大鼠、人	小鼠	1/100	高尔基体	-20°C	Nb600-4512
TGN38	mAb	小鼠、大鼠、人	小鼠	1/1000	反式高尔基体	-20°C	Nb300-575
钙联接蛋白	pAb	小鼠、大鼠、人	兔子	1/500	内质网	-20°C	Ab22595
网格蛋白	mAb	小鼠、大鼠、人	小鼠	1/500	网格蛋白介导的胞吞	-20°C	Ab2731

实施例4

在结构域II或结构域Ib内截短的Cholix和PE衍生的携带体的经上皮体内递送

[0463] 本实施例描述了包含与生物活性货物联合的截短的Cholix携带体(例如,在结构域II和/或Ib中截短)和截短的PE携带体(例如,在结构域II和/或Ib中截短)的递送构建体穿过极化小肠上皮(例如,经由顶端-基底侧胞吞转运)的经上皮转运。

[0464] 使用如实施例1中所述制备的各种递送构建体的纯化的分离单体形式,使用大鼠管腔内注射模型进行一系列体内转运研究(参见下文的附加方法部分)。在本分析中,在该非恢复性研究期间,使大鼠保持在异氟醚麻醉状态下。在这段时间,在腹部中线切口,然后使小肠暴露,并选择空肠中段,用不褪色的记号笔标识相邻的肠系膜。在该部位,约5μg的构建体7-12以50μL的注射量施用。将测试蛋白质溶解于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中并用28号针注射。管腔内注射后,将小肠段返回到腹腔,并在规定的时间段回收该小肠段。

[0465] 一旦回收完毕,用PBS冲洗暴露于构建体7-12的组织片段,用多聚甲醛轻轻地固定,并准备用于荧光显微镜检查(参见下文的附加方法部分),其中,使用针对PE或Cholix的多克隆抗体来检测递送构建体,所述PE或Cholix用标记有红色荧光染料的二抗识别。图1

(构建体12(图1A-图1C)、构建体11(图1D-图1F)和构建体10(图1G-图1I))和图2(构建体9(图2A-图2C)、构建体8(图2D-图2F)和构建体7(图2G-图2I))中描绘了构建体7-12是否发生了转运。

[0466] 构建体7-12中的每一个均被摄取到固有层内有限的细胞群中,这与先前针对全长PE观察到的一致。发现即使对于构建体12(PE^{252}-RFP,例如,与具有SEQ ID NO:220的氨基酸偶联的具有SEQ ID NO:137的氨基酸),PE穿过极化小肠上皮发生的高效经皮转运也是令人惊讶和显著的,这表明通过结构域I(SEQ ID NO:137)内发现的元件不仅可以实现穿过极化小肠上皮细胞的经上皮转运,而且还可以实现靶向粘膜下层隔室内的特定细胞。

[0467] 基于使用构建体7-12的惊人发现,评估仅包含Cholix(SEQ ID NO:4)的结构域I的构建体6(Cholix^{265}-RFP)。Cholix^{265}-RFP(例如,与SEQ ID NO:220偶联的SEQ ID NO:4或5的氨基酸)转运穿过大鼠小肠在体内产生的免疫荧光评估结果与用PE构建体12观察的类似。使用针对Cholix和RFP组分的抗体进行评估可用于说明嵌合体的这两个元件都被转运(参见,例如,图3)。观察到的这两个抗体的染色图案相似,这说明这两种元件穿过上皮移动并终止在固有层内的相同细胞群中。该数据说明Cholix的结构域I(SEQ ID NO:4)可足以转运蛋白质货物(26.9kDa)并将其递送至选定的细胞群中(图3A-图3F)。

实施例5

嵌合Cholix-PE构建体穿过大鼠空肠的转运

[0468] 在本实施例中,制备了包含SEQ ID NO:146(构建体13)和SEQ ID NO:146(构建体14)中所列的氨基酸序列的递送构建体,并对其进行评估,如实施例2中所述。本实施例的嵌合Cholix-PE构建体包含来自本文所述的Cholix外毒素或PE外毒素的混合结构域I、II、Ib和III。

[0469] 嵌合携带体构建体13(SEQ ID NO:146)包含衍生自SEQ ID NO:1(SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-265)中所列的序列的Chloix结构域I、衍生自SEQ ID NO:138中所列的序列的PE易位结构域II、衍生自SEQ ID NO:139中所列的序列的PE结构域Ib和衍生自SEQ ID NO:140中所列的序列的非毒性PE催化结构域III。嵌合携带体构建体14(SEQ ID NO:147)包含衍生自SEQ ID NO:137中所列的序列的PE结构域I、衍生自SEQ ID NO:126中所列的序列的Cholix携带体易位结构域II、衍生自SEQ ID NO:127中所列的序列的Cholix携带体结构域Ib和衍生自SEQ ID NO:128中所列的序列的非毒性Cholix携带体催化结构域III。

[0470] 如构建体13的图4(1分钟后,图4A-图4E)和图5(20分钟后,图5A-图5E)与构建体14的图6(1分钟后,图6A-图6E)和图7(20分钟后,图7A-图7E)所示,嵌合携带体构建体能够在体内转运穿过大鼠空肠和固有层中的靶细胞。因此,此处证明了包含来自两种或更多种不同外毒素(例如,Cholix和PE)的部分或结构域的嵌合递送构建体也可以高效地将货物运递送上皮细胞中和穿过上皮细胞。

实施例6

截短的Cholix结构域I递送构建体的制备及首次体内转运研究

[0471] 本实施例说明了截短的Cholix衍生的携带体多肽的胞吞转运功能,其中,重要的是,在Cholix外毒素的结构域I内的各个位置处发生截短。

[0472] 根据上述实施例1中所述的蛋白质生产程序(细菌生产),用不可裂解的聚甘氨酸-丝氨酸肽间隔区GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:210)将人生长激素(HGH)(SEQ ID NO:214)

与各种经修饰的Cholix携带体多肽的C末端偶联,以制备以下的递送构建体用于评估:1)SEQ ID NO:160,其包含在SEQ ID NO:5的187位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体;2)SEQ ID NO:159,其包含在SEQ ID NO:5的151位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体;3)SEQ ID NO:158,其包含在SEQ ID NO:5的134位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体;4)SEQ ID NO:161,其包含在SEQ ID NO:5的206位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体;5)SEQ ID NO:162,其包含在SEQ ID NO:5的245位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体;6)SEQ ID NO:163,其包含在SEQ ID NO:5的251位氨基酸残基处截短的经修饰的Cholix携带体;和8)SEQ ID NO:165,其包含含有SEQ ID NO:5的40-187位氨基酸残基的经修饰的Cholix携带体。

[0473] 为了分析产生的融合蛋白,将构建体注入大鼠小肠腔中,并在注射后5、10或15分钟,收集注射部位。固定组织并切片,然后用抗Cholix抗体和抗HGH抗体染色。使用共焦显微术,用荧光二抗显现蛋白质的位置。如图8A-图8C所示,在5、10和15分钟时,在上皮细胞中可见到包含SEQ ID NO:165的氨基酸序列的构建体,并且其被限制于细胞顶侧膜附近的区域。蛋白质没有明显的离开该隔室穿过细胞的移动,并且在固有层中也没有蛋白质出现。这表明,具有SEQ ID NO:165的氨基酸序列的多肽携带体足以通过其受体结合位点和/或通过与TMEM132和/或LRP1的相互作用被摄取到上皮细胞中,但缺少用于胞吞转运的部分序列,导致积聚在上皮细胞中。相比之下,包含SEQ ID NO:161-SEQ ID NO:164的氨基酸序列的构建体被证明在摄取后迅速移动穿过上皮细胞并转运出细胞进入固有层。如图9所示,在5分钟时,在上皮细胞的顶端隔室中也可见到具有SEQ ID NO:160的Cholix衍生的构建体。在10和15分钟时,少量的蛋白质移动到细胞的基底侧,但未出现在固有层中。

[0474] 这表明,N-末端可以参与转运途径,但不足以通过细胞进行完全的胞吞转运。图8A-8C和图9中所示的令人惊讶的发现代表了一种潜在的特异性地将附接在这些截短处的货物递送至上皮细胞的方法,因为货物被摄取进细胞中,却不能从其中转运出去,因而积聚在内部。

实施例7

非毒性全长Cholix构建体的体外顶端到基底胞吞转运

[0475] 本实施例说明了一种改良的非毒性Cholix(ntChx)体外穿过极化小肠上皮细胞的顶端到基底外侧胞吞转运。

[0476] 在本实施例中,通过用于ADP-核糖基化的酶促袋内的特定谷氨酸残基的氨基酸变异(用丙氨酸置换)而产生E581A置换和具有SEQ ID NO:3(ntChx)中所列的氨基酸序列的多肽,使Cholix构建体变得非毒性。

[0477] 在37℃下,测量非毒性E581A Cholix(ntChx)穿过体外原代人小肠上皮的合流片(0.6cm^2过滤器表面积)的转运,其中,将2.5-200μg/mL的浓度施加到顶端表面,并通过ELISA法测定2h后基底隔室中ntChx的量(图10A)。所测试的浓度范围表明,顶端ntChx浓度为2.5-20μg/mL时的表观渗透性比顶端浓度为20μg/mL以上时的表观渗透性高大约2倍,不过所有浓度都显示出对这种约70kDa蛋白质的显著转运效率。渗透速率的转变可能与受体介导的转运机制一致,即对于该体外研究所用的原代人小肠上皮的0.6cm^2过滤器表面积系统,其饱和值为约20μg/mL。重要的是,当通过蛋白质印迹分析(图10B)评估时,转运的ntChx在其表观大小上似乎没有被明显修饰(例如,化学修饰)(图10B)。

[0478] 用于评估ntChx在5、10和20μg/mL的浓度下的胞吞转运的时间进程表明，ntChx胞吞转运在大约20-25分钟的滞后阶段后开始呈线性(图10C)。利用这些转运值，计算ntChx在37℃下体外穿过原代人小肠上皮的渗透性为约1.92×10^{-5}cm/sec。当在4℃下执行相同的体外转运方案时，该渗透率降低(图10C)。可以假设，在该体外模型中，在顶端施加ntChx的量下，ntChx的顶端浓度在约90min后开始耗尽。综上所述，这些数据表明，ntChx是通过一个需要能量的、高效的、受体介导的胞吞转运过程进行转运的。这种过程可取决于能够与参与胞吞的顶端表面受体(例如，低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1))相互作用的ntChx的量，所述胞吞导致进入不受显著分解代谢影响的胞吞转运途径。

[0479] 小肠上皮的顶端膜表面pH值可在5-7之间(17)。据观察，以20μg/mL进行体外测试并在120分钟后检查的穿过原代人小肠上皮的胞吞转运在顶端介质的pH为7时的效率大约是pH为5时的2倍，而基底pH为7或5似乎没有产生影响(图11)。

[0480] 在不受任何理论约束的情况下，假设在测试的顶端pH为5时的ntChx转运结果中观察到的更大的变异性可能是由于在研究过程中上皮会努力中和该顶端隔室，这可能发生在靠近ntChx受体胞吞部位的顶端质膜处。总之，这些数据表明，本文公开的ntChx能够通过受体介导的过程来高效、一致和连续地转运穿过人小肠上皮，所述受体介导的过程不会造成所转运蛋白质的大小发生显著改变。

实施例8

全长非毒性Cholix构建体的胞吞转运途径的分析

[0481] 本实施例说明了ntChx(SEQ ID NO:3)体内穿过极化小肠上皮细胞的顶端到基底外侧的胞吞转运，通过直接管腔内注射(ILI)至大鼠空肠中来检查ntChx体内穿过小肠上皮的能力。

[0482] 免疫荧光显微图像示出了使用抗Cholix多克隆抗血清鉴定的ntChx迅速进入上皮细胞，并通过涉及网格蛋白共定位的囊泡状结构中的这些上皮细胞进行运输，其中胞吞转运过程在几分钟内完成(图12A-图12C)。对ntChx呈阳性的囊泡状结构的位置的时间依赖性变化显示出其在位于肠上皮细胞核上方和下方的隔室内以及在固有层的选定细胞群内的分布。ntChx的胞吞转运作用似乎也可通过杯状细胞发生。在本实验中，未观察到ntChx在相邻上皮细胞间(所谓的细胞旁途径)的转运。

[0483] ntChx通过ILI进入大鼠空肠似乎限制了在小肠绒毛的上段和尖端的暴露。

实施例9

非毒性Cholix构建体的胞吞转运涉及特定的囊泡隔室

[0484] 本实施例说明了ntChx(SEQ ID NO:3)的顶端到基底外侧的胞吞转运，所述胞吞转运涉及特定的囊泡隔室(例如，图13A-图13F)。

[0485] ntChx的胞吞转运可涉及受体介导的胞吞过程和随后的囊泡运输，该囊泡运输避免了通过这种途径而内化的配体被溶酶体降解的典型命运。许多专性和兼性细胞内病原体能够颠覆宿主细胞中限制其向溶酶体暴露的胞吞和分泌途径，即通过能够操纵宿主细胞过程的效应蛋白。本实施例检查了经历胞吞转运的含ntChx的囊泡，以确定可限定在本文公开的Chx和Chx变体的胞吞转运中所涉及的运输元件和细胞隔室的相关蛋白质的身份。

[0486] 在顶端质膜处摄取时，经观察，ntChx阳性囊泡与Ras相关蛋白Rab 5和早期内体抗原1(EEA1)共定位(图13A)，显示出早期内体/分选内体(EE/SE)的标志，这表明这种外毒素

可以通过受体介导的胞吞进入小肠上皮细胞。在肠上皮细胞的基底隔室中也观察到EEA1阳性囊泡群，但这些囊泡与ntChx的存在没有太大的相关性(图13A)。在肠上皮细胞的顶端和基底隔室中都能观察到已知与循环内体相关的Ras相关蛋白Rab 11a，但Rab 11a与含ntChx的囊泡的共定位主要是在基底隔室中观察到(图13B)。此外，反式高尔基体网络(TGN)可被认为是一个分泌途径分类站，将新合成的蛋白质导向不同的细胞隔室，其中TGN-38被鉴定为指示性的。值得注意的是，在本实验中，未观察到ntChx与TGN-38共定位于肠上皮细胞中，但在具有固有层的非极化细胞中在胞吞转运后发生共定位(图13C)。钙联接蛋白是一种位于内质网(ER)中的凝集素蛋白伴侣，可参与调节游离细胞溶质的Ca^{2+}浓度。在胞吞转运过程中，发现ntChx可以与钙联接蛋白主要共定位于肠上皮细胞的顶端隔室内，但该分布包含基底室(图13D)。此外，Ras相关蛋白Rab 7，一种被运输到溶酶体的晚期内体和囊泡的标志物，被观察到与ntChx共定位于肠上皮细胞的顶端和基底部分中(图13E)。分布在晚期内体和溶酶体二者中的LAMP1(溶酶体相关膜蛋白1)被观察到与ntChx相似地共定位在肠上皮细胞的顶端和基底部分中，但似乎没有与较大的囊泡结构共定位，较大的囊泡结构的大小和数量与溶酶体结构一致(图13F)。

[0487] ntChx-NP的顶端施加导致的胞吞转运过程与针对单独ntChx观察到的一致，并且没有与LAMP1阳性结构的共定位(图13F)。一旦穿过小肠上皮细胞层，ntChx-NP可在存在于固有层内的细胞内的LAMP1阳性结构中观察得到(图13C)。

实施例10

非毒性全长Cholix外毒素与单独Cholix结构域I的胞吞转运功能之比较

[0488] 本实施例说明了实施例6中所述的Cholix结构域I(例如，SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:4)截短携带体蛋白相比于实施例7中所述的无毒全长Cholix的体内转运。

[0489] 采用针对全长蛋白产生的多克隆抗体通过蛋白质印迹和免疫荧光显微术监控ntChx(SEQ ID NO:3)的体外胞吞转运。为了测试这种多克隆抗体是否能提供对ntChx的所有区域的等效覆盖以用于检测截短形式的外毒素的目的，研究了截短形式的Cholix运送可用于评估胞吞转运等效性的蛋白质货物的能力。

[0490] 制备了全长蛋白质(ntChx)和仅由结构域I组成的蛋白质的遗传嵌合体，其包含SEQ NO:5中所列的氨基酸序列，并且其C-末端用于与红色荧光蛋白(RFP，SEQ ID NO:220)的N-末端缀合，从而产生具有SEQ ID NO:157中所列的氨基酸序列的构建体。分子量为25.9kDa(225个氨基酸残基)的单独RFP作为胞吞转运对照。

[0491] 数据显示，在ILI至大鼠空肠后30分钟进行体内检查时，与ntChx-RFP和Cholix结构域I(M+$Cholix^{1-265}$或SEQ ID NO:5的1-266位残基)-RFP(SEQ ID NO:156)相比，单独RFP的胞吞转运程度最小(图14A)。对于ntChx-RFP(图14B)和Cholix结构域I-RFP(图14C)(这些图中的箭头显示了上皮的顶端侧)，上皮胞吞转运模式相似，并且在固有层中可检测到的RFP的程度也相当。这些结果表明，参与胞吞转运的Cholix元件位于结构域I内，并且该结构域能够足以取代Cholix结构域II和III将蛋白质货物运输穿过小肠上皮。

实施例11

截短的Cholix结构域I携带体蛋白的体外胞吞转运及细胞内递送功能

[0492] 本实施例说明了经由如上述实施例6所述的间隔区与人生长激素缀合的各种截短的Cholix结构域I携带体蛋白的体外顶端-基底外侧胞吞转运作用和细胞内递送功能。

[0493] 为了进一步探索参与胞吞转运的Cholix结构域I内的元件的功能，制备了一系列含有药学相关蛋白——人生长激素(HGH，SEQ ID NO:214)的嵌合体作为遗传构建体。Cholix结构域I的每个截短序列(SEQ ID NO:5，细菌表达)都通过$G_4SG_4SG_4S$间隔区序列(SEQ ID NO:210)经由C-末端与HGH的N-末端缀合，从而产生具有SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:161、SEQ ID NO:162、SEQ ID NO:163和SEQ ID NO:164中所列的氨基酸序列的嵌合体。在具有SEQ ID NO:5的Cholix结构域I的K187截短的情况下，还删除了前39个氨基酸，产生Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)的E40-K187片段，以获得具有SEQ ID NO:165中所列的氨基酸序列的构建体(表14)。

表14-用于HGH的截短的Cholix结构域I递送构建体

SEQ ID NO	注释(相对于SEQ ID NO:4)	Mol.Ma	Ca
SEQ ID NO:158	M+Cholix$^{1-133}$-HGH	38.0	4.70
SEQ ID NO:159	M+Cholix$^{1-150}$-HGH	40.0	4.69
SEQ ID NO:160	M+Cholix$^{1-186}$-HGH	44.2	4.76
SEQ ID NO:161	M+Cholix$^{1-205}$-HGH	46.4	5.04
SEQ ID NO:162	M+Cholix$^{1-244}$-HGH	50.7	4.96
SEQ ID NO:163	M+Cholix$^{1-250}$-HGH	51.4	5.01
SEQ ID NO:164	M+Cholix$^{1-265}$-HGH	53.1	5.12
SEQ ID NO:165	Chx$^{39-186}$-HGH	40.0	4.91

[0494] 研究这些嵌合体体外穿过人小肠上皮单层的转运能力的实验表明，与SEQ ID NO:161不同，具有SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160和SEQ ID NO:165中所列的氨基酸序列的递送构建体不进行转运，如图15A所示。尽管HGH的分子量低得多，但与SEQ ID NO:164相比(图15A，右侧部分显示存在于基底隔室中)，HGH单独转运的程度较小。在人小肠的体外模型中，在评估的2小时时间点处，SEQ ID NO:161和SEQ ID NO:162的胞吞转运与SEQ ID NO:164相当(图15B)。令人惊讶的是，具有SEQ ID NO:161中所列的氨基酸的递送构建体在其转运能力方面优于SEQ ID NO:164，如SEQ ID NO:161的相对信号高于SEQ ID NO:164所示。

[0495] 这些结果表明，Cholix的结构域I足以实现从顶端到基底的转运，并且它可以作为胞吞转运元件发挥功效以将各种异源物质递送穿过上皮细胞，其中异源性货物可以取代Cholix外毒素的结构域II、Ib和III。此外，已证明细菌性表达的Cholix蛋白质的前206个氨基酸残基(例如，SEQ ID NO:5，或者SEQ ID NO:4的前205个氨基酸残基)中的元件能够足以实现胞吞转运功能，因此可被用作各种异源性货物的有效携带体。值得注意的是，结果表明，SEQ ID NO:5的这前206个氨基酸的胞吞转运效率甚至可能高于整个结构域I(例如，SEQ ID NO:5)或全长成熟的Cholix外毒素(例如，SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)的胞吞转运效率。因此，本文公开的截短的Cholix结构域I构建体可用于高效地将诸如治疗剂和/或诊断剂等异源性货物分子运输穿过上皮细胞层(例如，肠上皮)，从而使得能够口服施用通过肠胃外施用途径(例如，静脉注射或皮下注射)施用的治疗剂和/或诊断剂(例如，较大的多肽或蛋白质，如抗体)。此外，这些结果表明，Cholix结构域I的截短形式可用于使用本文所述的递送构建体将各种异源性货物递送到上皮细胞中。

实施例12

截短的Cholix结构域I携带体蛋白质的体内胞吞转运及细胞内递送功能

[0496] 本实施例说明了Cholix结构域I(例如,SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5)截短蛋白质嵌合体穿过肠上皮细胞上的体内转运,以递送异源性货物(在本实施例中:人生长激素)。

[0497] 检查如上述实施例11中的表14所示的选定截短嵌合体在ILI进入大鼠空肠后其在体内进行胞吞转运能力。指示截短的Cholix结构域I携带体的长度和发生截短的残基的注释是相对于SEQ ID NO:5而言的。

[0498] 这些研究中获得的数据表明,虽然M+Cholix$^{1-133}$-(SEQ ID NO:10)-HGH(SEQ ID NO:158)在15分钟内没有进入到大鼠上皮(图16A)中,但M+Cholix$^{1-150}$-(SEQ ID NO:10)-HGH(SEQ ID NO:159)发生了胞吞,但是没有完全胞吞转运,如固有层中缺乏这种嵌合体所证明(图16B)。具有SEQ ID NO:159的构建体保留在限制于肠上皮细胞顶端和基底质膜附近的隔室内的囊泡池中(图16B)。截短突变体M+Cholix$^{1-186}$-(SEQ ID NO:10)-HGH(SEQ ID NO:160)产生了与观察具有SEQ ID NO:159的构建体得到的相似结果,一处不同的是,具有SEQ ID NO:160的构建体似乎进入了核上囊泡隔室,而具有SEQ ID NO:159的构建体无法进入(图16C)。此外,去除具有SEQ ID NO:5的Cholix结构域I的前39个氨基酸(产生构建体M+Cholix$^{39-186}$-(SEQ ID NO:210)-HGH,SEQ-ID NO:165)会产生这样的蛋白质,该蛋白质可发生胞吞,但在ILI后15分钟,并没有从肠上皮细胞的顶端囊泡隔室迁移到基底囊泡隔室(图16D)。

[0499] 这些结果表明,E134和D151之间的Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)的元件对于顶端胞吞来说是必不可少的,Cholix结构域I的前39个氨基酸中的元件对于从顶端囊泡池向基底囊泡池运输来说可能是至关重要的,并且K187和K206之间的元件对于从肠上皮细胞的基底外侧表面的Cholix分泌来说可能是至关重要的。因此,这些结果表明,Cholix结构域I及其截短形式,例如,包含Cholix结构域I的前206个氨基酸残基的那些,能够高效地将各种货物递送穿过上皮细胞(例如,穿过受试者的极化肠上皮细胞)。此外,这些结果表明,Cholix结构域I的截短形式可使用本文所述的递送构建体将各种异源性货物递送到上皮细胞中。

实施例13

Cholix结构域I的功能肽片段的评估

[0500] 本实施例说明了使用Cholix结构域I的功能元件(例如,功能性肽片段)重演Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)的胞吞转运,以生成能够体内(图17A)和体外(图17B)递送至上皮细胞中和/或穿过上皮细胞层(例如,受试者的上皮细胞单层和/或肠上皮)的合成多肽。此外,例如,图18以彩色序列片段描绘了在Cholix结构域I内的一些功能性氨基酸序列。此外,图20示出了具有突显的功能片段SEQ ID NO:148(图20A)、SEQ ID NO:151(图20B)和SEQ ID NO:152(图20C)的Cholix结构域I的一般3D结构。示出了相对于SEQ ID NO:5中所列的细菌性表达的Cholix结构域I序列的所有氨基酸残基及其位置。

[0501] 为此,使用衍生自被鉴定为对顶端胞吞至关重要的部分Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)的特定肽进行胞吞转运实验来对各个步骤和方面进行建模,诸如细胞内运输和全长ntChx的胞吞转运的基底膜分泌,Cholix结构域的示例性肽片段如下表15所示(包含分子质量和等电位点(pI))。

表15-Cholix结构域I的氨基酸序列内被鉴定的示例性功能性肽结构域(SEQ ID NO:5)

SEQ ID NO	肽序列	名称	摩尔质量(Da)	pI
SEQ ID NO: 148	$_{134}$ELDQQRNIIEVPKLYSID$_{151}$	胞吞(E)	2173.5	4.32
SEQ ID NO: 149	$_{1}$MVEEALNIFDECRSPCSLTP EPGKPIQSKLSIPSDVVLD$_{39}$	顶端-基底(T)	4258.9	4.20
SEQ ID NO: 151	$_{151}$DLDNQTLEQWKTQGNVS	核上(N)	4276.7	5.48
	FSVTRPEHNIAISWPSVSYK$_{1}$ 87			
SEQ ID NO: 152	$_{187}$KAAQKEGSRHKRWAHW HTGLAL$_{206}$	基底释放(R)	2568.9	11.1

[0502] 例如,肽$_{134}$ELDQQRNIIEVPKLYSID$_{151}$(SEQ ID NO:148)是在M+Cholix$^{1-150}$-HGH(SEQ ID NO:159中所列的氨基酸序列)和M+Cholix$^{1-133}$-HGH(SEQ ID NO:158中所列的氨基酸序列)之间有差异的元件,一个嵌合体可以发生胞吞,而另一个不能。另一个感兴趣的肽位于前39个氨基酸($_{1}$MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD$_{39}$,SEQ ID NO:149)内,其不存在于M+Cholix$^{39-186}$构建体(SEQ ID NO:165)中,而所述M+Cholix$^{39-186}$构建体缺乏在胞吞后从上皮细胞顶端部分运输到基底结构域的能力。在M+Cholix$^{1-150}$-(SEQ ID NO:210)-HGH和M+Cholix$^{1-186}$-(SEQ ID NO:210)-HGH之间有差异的肽为$_{151}$DLDNQTLEQWKTQGNVSVTRPEHNIAISWPSVSVTSVTPEHNIAIS WPSVPSVYSK$_{187}$(SEQ ID NO:151);M+Cholix$^{1-186}$-(SEQ ID NO:210)-HGH显示出了能进入细胞的核上区域的能力,而M+Cholix$^{1-150}$-(SEQ ID NO:210)-HGH无法进入。最后,由小肠上皮细胞的基底表面分泌M+Cholix$^{1-265}$-(SEQ ID NO:210)-HGH,与不分泌M+Cholix$^{1-186}$-(SEQ ID NO:210)-HGH;$_{187}$KAAQKEGSRHKRWAHHTGLAL$_{206}$(SEQ ID NO:152)是描述这两个嵌合体序列的差异性的肽(例如,参见图17A)。

[0503] 以不同的量子点形式标记含有来自具有SEQ ID NO:5的Cholix结构域I的1-39、134-151、151-178和178-206位置的氨基酸肽序列的聚合物骨架。

[0504] 体外数据显示,Cholix结构域I肽元件的一些选定肽序列足以在体外和体内实现顶端到基底部的胞吞转运(图17)。例如,如图17A所示,2小时后体外测得穿过极化肠上皮的胞吞转运。所转运物质的量报告为相对于缺少任何Chx肽的聚合物-量子点制剂的荧光增加倍数。(N=2;平均值±S.E)(图17A)。随后,对标记有量子点的聚合物-量子点制剂进行15分钟体内胞吞转运(图17B和图17C)。

[0505] 数据显示,本文所公开的多种Cholix序列变体在从管腔摄取后保留了高效的胞吞,但缺乏完成胞吞转运的能力,这有助于靶向顶端结构或顶端和基底囊泡结构。从所呈现的数据来看,Cholix利用了一种受体介导的胞吞过程,该过程涉及134-151位氨基酸,其能进入肠上皮细胞(例如肠道上皮细胞)顶部的早期内体囊泡隔室。如本文所述的Cholix外毒素结构域I(例如,SEQ ID NO:5)的151-187位氨基酸似乎允许其移动到与细胞中用于分泌事件的分选位点一致的核上隔室,因此也允许将各种货物递送到这些位置上。1-40位氨基酸的存在使向细胞基底隔室的运动更加高效。最后,187-206位氨基酸为基底膜分泌提供了一种机制,该机制能将全部完整的蛋白质释放到固有层中,其中,该蛋白质可以提供治疗有效浓度的治疗货物分子(例如,白细胞介素),向免疫细胞呈递抗原,和/或允许货物被吸收至全身循环以用于递送到受试者的其他靶器官/组织。

实施例14

Cholix结构域I递送构建体与各种标志物蛋白的共定位显示使用不同隔室的运输

[0506] 本实施例说明了Cholix结构域I衍生的递送构建体使用各种标志物蛋白(例如,参见实施例3)利用不同的隔室运输至和穿过(例如,经由胞吞转运)上皮细胞,所述各种标志物蛋白表示Cholix衍生的携带体构建体利用了特异性和内源性的运输途径。采用具有SEQ ID NO:154(包含经由具有SEQ ID NO:210中所列的序列的间隔区与IL-10偶联的M+Cholix^{386}携带体,M=N-末端甲硫氨酸)中所列的氨基酸序列的Cholix衍生的携带体构建体进行本实施例中所述的研究。

[0507] EEA1抗原。图21A示出了Cholix-IL-10递送构建体(SEQ ID NO:154)与EEA1抗原在与肠上皮细胞顶端和基底结构域处进行运输的位置一致的细胞位置中强烈共定位,这表明Cholix衍生的递送构建体存在于早期内体隔室中。

[0508] Rab7。此外,研究表明,Cholix-IL-10递送构建体(SEQ ID NO:154,右上)与主要位于肠上皮细胞的顶端隔室内的Rab7(左上)强烈共定位,但在固有层内的细胞中仅有限共定位,这表明Cholix衍生的递送构建体存在于晚期内体隔室(图21B,左下显示白色光图像,右下显示与DAPI合并染色)。

[0509] LAMP1。在与大且特异性的囊泡一致的成熟溶酶体中鉴定出LAMP1,这些溶酶体中缺少Cholix-IL-10递送构建体(SEQ ID NO:154,白色箭头)。然而,Cholix-IL-10嵌合体还与LAMP1抗原共定位于除溶酶体样结构之外的细胞位置处,这与在肠上皮细胞顶端和基底结构域处的囊泡运输一致,表明Cholix衍生的递送构建体存在于溶酶体隔室中(图21C)。

[0510] 网格蛋白。其次,Cholix-IL-10嵌合体(SEQ ID NO:154)也与尤其是位于与细胞核相邻的区域内的网格蛋白包被的囊泡强烈共定位,并且与Rab1强烈共定位,Rab1主要位于肠上皮细胞的基底隔室以及固有层内的选定细胞中(图21D)。

[0511] 钙联接蛋白。Cholix-IL-10嵌合体(SEQ ID NO:154)与内质网共定位,如由呈现与肠上皮细胞和固有层内大部分细胞中的细胞核相邻的模式的钙联接蛋白所显示(图21E)。

[0512] 内质网高尔基体中间隔室。Cholix-IL-10嵌合体(SEQ ID NO:154)与内质网高尔基体中间隔室(ERGIC)强烈共定位,并且LAMN1抗原响应于携带体胞吞和胞吞转运而出现重新分布,如注射后1分钟(图21F)、5分钟(图21G)、10分钟(图21H)和15分钟(图21I)所示。递送构建体的胞吞转运被证明穿过肠上皮细胞持续大量的运输。与这种胞吞转运强烈共定位的特异性隔室包含早期内体和晚期内体。Cholix衍生的携带体出现与网格蛋白包被的囊泡缔合,该囊泡在靠近肠上皮细胞核布置的ER-高尔基体网络附近。观察到Cholix衍生的携带体与ER和ERGIC共定位,也被描述为LMAN1(凝集素,甘露糖结合1),但其缔合限制于与顺式高尔基体、高尔基体和反式高尔基体网络的元件。Cholix衍生的携带体以能够与ERGIC再分布相配合的方式与肠上皮细胞基底表面附近的循环内分体共定位。ERGIC-53还可以作为参与早期胞外途径中有限数量糖蛋白配体的顺行转运的细胞内货物受体,并且被许多RNA病毒用作其胞吐策略的一部分。基于ELISA的结合研究表明,在pH7.4时,Cholix和Cholix衍生的递送构建体可与ERGIC-53缔合,但这种相互作用在pH 5.5时显著增强。SPR研究进一步支持了这种pH依赖性的相互作用(图31)。

[0513] Giantin。Cholix-IL-10嵌合体(SEQ ID NO:154)不与肠上皮细胞中存在的低水平Giantin共定位(图21J)。一些Giantin与存在于固有层中的细胞亚群中的嵌合体共定位,这

表明Cholix衍生的携带体不与高尔基体隔室定位。

[0514] 58K抗原。58K抗原在核顶端的位点处定位于肠上皮细胞内，而Cholix-IL10嵌合体显示出了与该抗原有一定的共定位，共定位的方式表明短暂移动通过该隔室。在固有层内的细胞中未观察到58K抗原(图21K)。

[0515] TGN38抗原。Cholix-IL-10嵌合体(SEQ ID NO:154)与TGN38抗原(右上)有一定程度的共定位，这显示出了被限制于肠上皮细胞内的核的顶端侧并且与在固有层内的少数细胞中的核相邻的细胞分布(图21L，白色光和合并图像分别显示左下和右下)。

[0516] Rab1。Cholix-IL-10嵌合体(SEQ ID NO:154，右上)与Rab 1(左上)强烈共定位，Rab 1主要位于肠上皮细胞的基底隔室和固有层内的选定细胞中(图21M，白色光和合并图像分别显示左下和右下)。

[0517] 该数据表明，本公开的Cholix衍生的递送构建体与各种内源性蛋白质和受体相互作用，以利用内源性转运系统将货物高效地递送穿过上皮细胞和/或进入上皮细胞(例如，极化肠上皮细胞)内。

实施例15

评估Cholix外毒素相互作用受体的一般方案

[0518] 基于上述实施例14中所示的结果，本实施例说明了评估Cholix相互作用受体的方案以及关于这些相互作用的各种附加信息。在本研究中采用的各种Cholix衍生的递送构建体包括：具有SEQ ID NO:154(M+Cholix^{386}-GGGGSGGSGGGGS(SEQ ID NO:210)-IL-10)中所列的氨基酸序列的构建体和包含经由GGGGSGGGSGGGS间隔区(SEQ ID NO:210)与IL-10(SEQ ID NO:217)或HGH(SEQ ID NO:153)偶联的SEQ ID NO:5中所列的Cholix结构域I的构建体，例如，SEQ ID NO:164。首先，已经通过微珠捕获和质谱分析研究鉴定了一组有限的候选蛋白质作为携带体蛋白受体。然后，在体外(例如，使用Caco-2细胞单层)和体内(例如，在大鼠空肠中)评估了Cholix携带体与这些候选蛋白质的相互作用。

[0519] 一般而言，采用基于生物素或基于聚组氨酸的相互作用方法(例如，采用图22中所示的1D SDS-PAGE)，用Cholix蛋白质的非毒性携带体元件修饰纳米磁珠(直径25nm或100nm)。这些被修饰的磁珠被允许体外转运穿过人结肠癌细胞系Caco2的极化单层一段时间，然后温和地破坏细胞并捕获含有这些磁珠的囊泡。

[0520] 经过多次洗涤后，将这些富含磁珠的囊泡溶解在裂解缓冲液中，存在的蛋白质组分通过2-D SDS-PAGE被分离(图23)。将这些蛋白质的模式与这些细胞的总蛋白质含量进行比较，并使用质谱法来鉴定与被Cholix衍生的递送构建体进入的囊泡结构缔合的特异性元件(图24)。

[0521] 通过比较本方案的多次重复的结果来鉴定一组有限的最有希望的候选物，然后对其在Caco-2细胞和大鼠小肠中的含量进行检查(图25)。随后，用Cholix携带体包被的磁珠和纯化的候选蛋白质确认Cholix与鉴定的候选蛋白质的相互作用。Cholix携带体包被珠与纯蛋白质的温育和随后的蛋白质印迹或ELISA能够检测Cholix-蛋白质相互作用，如图26所示。此图显示出Cholix携带体与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)、Dickkopf相关蛋白1(DKK1)、伴侣葡萄糖调节蛋白75(GRP75)和细胞角蛋白-8(K8或CK8)的相互作用。

[0522] 在大鼠空肠中体内评估候选蛋白质与Cholix衍生的递送构建体的显微共定位。这里，在用具有SEQ ID NO:154中所列的氨基酸序列的构建体的管腔施加处理大鼠空肠1分钟

(图27A)、5分钟(图27B)和10分钟(图27C)后,在体内展示了包含与IL-10偶联的Cholix携带体蛋白(SEQ ID NO:154,M+Cholix^{386} GGGGSGGGGSGGS(SEQ ID NO:210)-IL-10)的递送构建体与CK8的共定位。在核上区内的共定位随着时间的推移而增加。虽然在大多数上皮细胞中都能观察到递送构建体的胞吞转运,但在固有层内它只与离散的细胞群相互作用。

[0523] 为了确保受体分布在大鼠体内研究和人肠道之间是一致的,将信息与人图谱中描述的IHC研究进行了比较。在这里,检查了经质谱鉴定和在大鼠空肠中确认的其中两个受体。图28A和图28B示出了GRP75和HSPC在大鼠肠道和人肠道中的肠道定位是一致的。

[0524] 利用sh-RNA技术在Caco-2细胞进行敲减以建立稳定的细胞系,该细胞系用于验证这些靶蛋白对Cholix携带体蛋白的顶端到基底胞吞转运的参与。然后用大鼠空肠在体内重复这些研究,以与Caco-2细胞的体外发现相比较。

[0525] 在本文,评估了Cholix结构域I衍生的递送构建体在CRISPR敲除HSPG的稳定Caco-2细胞中的转运。图29示出了由CRISPR敲除HSPG对递送构建体(SEQ ID NO:164)和单独HGH的转运功能的影响,所述递送构建体包含与HGH偶联的Cholix结构域I,而单独HGH用作非选择性转运的内部对照。细胞以1.5x10^{5}个细胞/mL接种于transwelI中。在第18天,测定经上皮/经内皮电阻(TEER),并将含有20μg/mL具有SEQ ID NO:164的携带体的PBS添加到顶端室。3h后,收集基底外侧样品并进行浓缩。采用抗HGH抗体,通过蛋白质印迹分析蛋白质转运的程度。图29所示的结果表明,Cholix衍生的携带体蛋白的胞吞转运和主动的选择性转运是HSPG依赖性的,因为与正常的HSPG阳性Caco-2细胞相比,Cholix携带体在HSPC敲减的细胞中的胞吞转运功能显著降低。

[0526] 对额外的候选蛋白质K8(图30A)、HSPC(图30B)和GRP75(图30C,图30D所示对照运行)进行类似的研究。使用缺乏特定候选蛋白表达的Caco-2细胞的稳定细胞系作为体外单层,以验证采用主动的选择性内源性转运机制进行携带体胞吞转运的要求。在HSPG和GRP75基因敲除组中,递送构建体(SEQ ID NO:164)的特异性转运与单独HGH的非选择性转运相比有所降低,而在K8基因敲除中则没有。这表明Cholix衍生的携带体蛋白的主动转运和胞吞需要HSPG和GRP75,而主动转运穿过上皮细胞则可以不需要K8。

[0527] 大鼠空肠ILI研究表明,GRP75分布于肠上皮细胞的不同的顶端和基底囊泡群中;SEQ ID NO:164与GRP75共定位于与不直接紧邻顶端质膜的肠上皮细胞顶端三分之一的囊泡中(图3D)。在管腔施加后5分钟内,在顶端GPR75阳性隔室中观察到具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体,并且其与早期的内体隔室一致。随后,观察到在基底膜附近观察到的一部分GPR75阳性囊泡中包含具有SEQ ID NO:164的构建体。TMEM132A与大鼠GRP78结合蛋白高度相似。在不受任何理论约束的情况下,假设GRP78和GRP75之间的相似性可以为TMEM132A与GRP75的相互作用以及它们在Cholix胞吞时共定位的可能性提供合理的解释。

[0528] 该数据表明,事实上,Cholix衍生的携带体和货物转运和递送是一个涉及不同受体的主动且选择性的过程。这可有助于靶向递送以及使治疗和/或诊断分子穿过和/或进入上皮细胞(例如,肠上皮细胞)内部以治疗和诊断本文所述的疾病。

实施例16

Cholix携带体-GRP75相互作用的pH依赖性的评估

[0529] 本实施例说明了对Cholix衍生的携带体蛋白(例如,SEQ ID NO:4)与其在主动胞吞转运期间的相互作用受体之一GRP75的pH依赖性的评估。

[0530] 对于这项研究,采用Biacore结合相互作用来检查Cholix携带体-GRP75相互作用的pH依赖性。采用生物素-链霉亲和素生物缀合使Cholix携带体蛋白附接到磁珠,并在pH值分别为5.5、6.5和7.5的缓冲溶液中与纯化的GRP75蛋白一起温育(图31)。

[0531] 在这三个pH水平下的结合亲和力通常在较低的纳摩尔范围内,但是,在pH 6.5时,测得的Cholix携带体与GRP75的结合亲和力显著提高(大约提高20倍),这表明了这种相互作用的pH依赖性。

实施例17

Cholix结构域I相互作用伴侣的种类和位置的评估

[0532] 在本实施例中,使用Cholix结构域I衍生的递送构建体(SEQ ID NO:5)检查上皮细胞中的蛋白质种类及其隔室位置,所述递送构建体被证明与全长Cholix外毒素(SEQ ID NO:1)具有相同甚至更高的胞吞转运功能。相对于SEQ ID NO:5中所列的细菌性表达的Cholix结构域I序列,示出了所有氨基酸残基及其位置。

[0533] 使用磁珠和分离程序捕获终止于SEQ ID NO:5的K266处的Cholix结构域I(细菌性表达的Cholix携带体包含N-末端甲硫氨酸)的相互作用伴侣,随后通过2-D凝胶电泳进行分离并使用质谱法进行鉴定,如上述实施例15所述。重要的是,在本实施例中,还制备了全长Cholix外毒素的多个截短形式以检查这些相互作用的各个方面:通过具有该甘氨酸-丝氨酸间隔区的$G_4SG_4SG_4S$序列与人生长激素(HGH)的N末端联合的在氨基酸E134、D151、K187、L206、K245或Q251或L206处的截短形式,所述甘氨酸-丝氨酸间隔区先前被鉴定用于构建遗传嵌合体。在K187截短的情况下,我们还删除了前39个氨基酸,以产生了具有SEQ ID NO:5的Chx结构域I的E40-K187片段。如上所述,例如,在实施例10中,具有SEQ ID NO:158的构建体未能实现顶端进入小肠上皮细胞,具有SEQ ID NO:159和SEQ ID NO:160的构建体发生胞吞,以达到肠上皮细胞内的顶端和基底囊泡池,但未进入固有层,而具有SEQ ID NO:165的构建体发生胞吞,但未能从肠上皮细胞的顶端迁移到基底囊泡隔室,最后,具有SEQ ID NO:164的构建体高效且快速地完成了胞吞转运。因此,对Cholix结构域I的前206个氨基酸中可参与引起顶端到基底胞吞转运的事件的元件进行了评估。

实施例18

Cholix结构域I衍生的递送构建体的顶端胞吞的评估

[0534] 首先,评估跨膜蛋白123A(TMEM132A)。TMEM132A是一种含有黏结蛋白和三个串联免疫球蛋白结构域的单程跨膜蛋白,将细胞外介质与细胞内细胞骨架连接起来。已说明了TMEM132A与丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶1(PP1)的相互作用,从而提供了一种通过RVxF相互作用模体调节细胞内细胞骨架事件的机制。

[0535] 据发现,Cholix结构域I(SEQ ID NO:5,细菌性表达的)丰富了TMEM132A的分离以及PP1复合物的催化和调节亚基。基于ELISA的研究表明,具有SEQ ID NO:5的Cholix结构域I与TMEM132A的胞外结构域相互作用;SPR研究表明,这种相互作用发生在pH7.5,而在pH5.5时则较少。在Caco-2细胞中进行敲减以产生Caco-$2^{TMEM132A-}$细胞的研究表明,TMEM132A的减少显著降低了具有SEQ ID NO:5的Cholix结构域I的胞吞转运的运输。

[0536] 在大鼠空肠内进行的管腔内注射(ILI)研究导致Cholix结构域I-HGH递送构建体(SEQ ID NO:164)与TMEM132A的共定位,其限于肠上皮细胞的顶端质膜。检查SEQ ID NO:164的胞吞转运作用的时间进程表明,TMEM132A仍然位于顶端质膜处或附近,并且没有显著

地重新分布到这些极化上皮细胞的其他区域。具有SEQ ID NO:158的构建体在顶端施加后没有显著地进入肠上皮细胞,而具有SEQ ID NO:159的构建体确实进入了肠上皮细胞,这表明对于顶端细胞进入而言至关重要的Chx结构域中存在于两个携带体结构有所区别的17个氨基酸内。一旦发生内化,早期或循环内体的内部pH值可从中性降至约6.0。具有SEQ ID NO:164的构建体与TMEM132A之间的相互作用的检查表明,与pH 5.5相比,pH值为7.4时的构建体与TMEM132A之间的相互作用发生的程度要大得多,这与从内化受体(在这种情况下,TMEM132A)释放可以通过囊泡pH值降低(可能发生在顶端Chx摄取之后)来促进的理论相一致。

[0537] 检查网格蛋白在大鼠肠上皮细胞中的分布的研究没有显示出与具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体在顶端表面的共定位,这表明Chx进入可不涉及网格蛋白介导的摄取。值得注意的是,TMEM132A的细胞分布在具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体施加后仍然存在于顶端表面,但在具有SEQ ID NO:159的构建体分配后,在顶端囊泡中发现的频率更高,这表明Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)内缺乏其他元件是向其运输中的下一步所要求的一个或多个受体传送所必需的。这些结果表明,Chx可以在管腔表面与TMEM132A结合,这些相互作用参与了肠腔的初始胞吞过程,并且胞吞转运过程继续进行需要在早期内体内的后续相互作用。

[0538] 细胞角蛋白8(CK-8)是该家族中的几种蛋白质之一,在最初的筛选中,CK-8被鉴定为潜在的Chx相互作用伴侣;CK-8先前被鉴定为从肠聚集性大肠杆菌分泌的Pet毒素的细胞表面受体。基于ELISA的结合研究表明CK-8与TMEM132A和Chx相互作用。CK-8在大鼠肠上皮细胞中的分布局限于顶端表面,以及顶端隔室和基底隔室中的离散区域。检查具有SEQ ID NO:164中所列序列的构建体的胞吞转运的时间进程表明,CK-8细胞分布在顶端M+Cholix$^{1-265}$-HGH(SEQ ID NO:164)施加后没有显著改变,并且在肠上皮细胞的顶端隔室中观察到一些共定位。在Caco-2细胞中进行CK-8的敲减(Caco-2^{CK8-}),并利用其对具有SEQ ID NO:164中所列序列的构建体的胞吞转运的影响来评估。如上文实施例15中进一步所示,CK-8敲减不影响具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体的转运,这表明了该体外模型确定Chx的胞吞转运过程中的相互作用伴侣的选择性功能的能力。这些研究指出,在Chx拉下中鉴定的与具有SEQ ID NO:164中所列序列的构建体所访问的细胞隔室共定位的蛋白质对胞吞转运来说并不是必须的。

实施例19

Cholix结构域I衍生的递送构建体的早期内体分选

[0539] 本实施例说明了不同的蛋白质如GRP75参与了Cholix和Cholix衍生的递送构建体(例如,具有SEQ ID NO:158-SEQ ID NO:165中所列的氨基酸序列的那些)的早期内体分选。

[0540] 递送构建体的胞吞转运被证明一致地大量穿过肠上皮细胞运输。与这种胞吞转运强烈共定位的特异性隔室包括早期内体和晚期内体。Cholix衍生的携带体出现与网格蛋白包被的囊泡缔合,该囊泡在靠近肠上皮细胞核布置的ER-高尔基体网络附近。观察到Cholix衍生的携带体与用ER和ERGIC的共定位,也被描述为LMAN1(凝集素,甘露糖结合1),但其缔合限制于与顺式高尔基体、高尔基体和反式高尔基体网络的元件。具有SEQ ID NO:164的Cholix衍生的携带体以能够与ERGIC再分布相配合的方式与肠上皮细胞基底表面附近的循环内体共定位。ERGIC-53还可以作为参与早期胞外途径中有限数量糖蛋白配体的顺行转运

的细胞内货物受体，并被许多RNA病毒用作其胞吐策略的一部分。基于ELISA的结合研究表明，具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体在pH7.4时可以与ERGIC-53缔合，但这种相互作用在pH5.5时显著更强。SPR研究进一步支持了这种pH依赖性的相互作用。

[0541] 观察到的GPR75在肠上皮细胞顶端和基底囊泡隔室中的分布并不意味着具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体在从顶端到基底囊泡隔室的有效运载路径机制中起到作用；相反，GPR75可在每个位置处的局部囊泡池中发挥作用。进一步，我们没有观察到GPR75的任何被颠覆的分布，就像观察到的其他细菌效应蛋白的作用一样。因此，我们推测Chx与GPR75的相互作用可提供一些其他功能，而不是将囊泡从顶端内体隔室导向基底内体隔室，并且假设GPR75相互作用可发挥功效以使细菌效应蛋白在各位置从囊泡到溶酶体的路径最小化。

[0542] TMEM132A的其他研究说明，与具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体在中性pH时的相互作用亲和力比在酸性pH时更大，这表明一旦内化，具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体就可以找到另一种用于运输的受体，同时内化受体循环回到细胞的顶端表面。在这个假设中，运输受体在酸性pH条件下比在中性条件下对Chx有更大的相互作用亲和力。事实上，对GPR75与具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体的相互作用的检查表明了在pH 5.5时这两个分子之间的亲和力比在pH 7.4时更高。

[0543] 该数据表明，本文所述的Cholix衍生的递送构建体高效地进入肠上皮细胞(例如，极化的肠上皮细胞)，并与参与早期内体分选的蛋白质相互作用，使这些构建体避免细胞内降解途径，从而导致完整的携带体和货物的递送和转运，例如通过胞吞作用穿过上皮细胞和/或通过胞吞到达内部。

实施例20

Cholix结构域I衍生的递送构建体的细胞内分选

[0544] 本实施例说明了在细胞内分选过程中，Cholix结构域I衍生的递送构建体在细胞内分选期间与不同的蛋白质如ERGIC-53相互作用。

[0545] 在大鼠ILI模型中，具有SEQ ID NO:164的递送构建体的管腔引入提供了数据，该数据支持ERGEC-53作为被本公开的Cholix构建体颠覆的元件以实现高效的胞吞转运。在顶端施加具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建物之前或之后短时间内，观察到ERGEC-53在肠上皮细胞的离散群中，这些离散群集中在细胞核的顶端表面附近，ERGIC始终位于该位置。在管腔内施加具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体的几分钟内，观察到ERGEC-53移动到肠上皮细胞内的紧邻顶端质膜和基底结构域的区域中。因此，Cholix携带体的胞吞转运与ERGIC-53在肠上皮细胞基底区的再分布是一致的。

[0546] 由于ERGIC-53参与了糖蛋白从内质网的输出，因此检查了介导N-糖基化事件的内质网驻留蛋白——ribophorin1(长醇-二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶亚基1)的细胞分布。重要的是，在使用GRP75的拉下中观察到ribophorin1。在其ILI进入大鼠空肠后观察到具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体的胞吞转运，其不影响ribophilin 1的细胞内分布，这表明它在顶端囊泡隔室中有限地共定位，其中ribophilin 1在ERGIC-53被颠覆到基底隔腔的整个时间进程中一直都存在。此外，ERGIC-53与一系列蛋白质相互作用，包括作为可溶性货物受体的SEC24。值得注意的是，以GRP75为诱饵的拉下鉴定出SEC24。类似地，顶端施加具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体并没有引起细胞内间隔组织的总体改变。

[0547] ERGIC参与对细胞分泌的可溶分子进行分选,并且ERGIC-53经历一个涉及外壳蛋白COPII的浓缩分选过程。由于COPI和COPII都参与在ER-高尔基体界面处的囊泡运输,因此研究了这些外壳蛋白在胞吞转运过程中与具有SEQ ID NO:164中所列的序列的构建体共定位的可能性。大鼠肠上皮细胞在顶端质膜下和与高尔基体一致的核上部位显示出COPI分布,在具有SEQ ID NO:158的构建体顶端施加后观察到的分布没有进入这些细胞,而具有SEQ ID NO:165的构建体发生了胞吞但仍保留在顶部囊泡隔室中。与未处理组织或暴露于具有SEQ ID NO:158的构建体的组织所观察到的相似,ERGIC-53(LMAN1)在暴露于顶端施加的具有SEQ ID NO:159的构建体或具有SEQ ID NO:165的构建体的肠上皮细胞中的分布主要保持在顶端囊泡隔室中,几乎没有在肠上皮细胞中的基底囊泡隔室中分布(图5)。在顶端施加具有SEQ ID NO:159的构建体后,偶尔在肠上皮细胞中观察到ERGIC-53(LMAN1)向基底囊泡隔室的移动,并且在用具有SEQ ID NO:160的构建体或具有SEQ ID NO:164的构建体顶端处理的肠上皮细胞中,这种移动更加一致。COPI在用具有SEQ ID NO:160的构建体顶端处理的肠上皮细胞中的分布在细胞的核上区域不再明显,但现在集中在顶端表面和顶端囊泡隔室,在其中,它与ERGIC-53(LMAN1)在一定程度上共定位。

[0548] 在顶端施加具有SEQ ID NO:159的构建体或具有SEQ ID NO:165的构建体会导致HGH与COPI在顶端膜下和核上部位共定位,而在肠上皮细胞的顶端囊泡池区域中观察到有限的共定位。用具有SEQ ID NO:160的构建体进行顶端处理导致HGH与COPI在顶端膜下广泛共定位,而在顶端囊泡隔室中有一些共定位,在核上区的共定位较少。

[0549] 该数据表明,Cholix衍生的递送构建体,如具有SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159和SEQ ID NO:165中所列的氨基酸序列的构建体,可用于将各种货物分子递送到上皮细胞的细胞内隔室。这对于能够在这些位置引起治疗和/或生物效应的治疗性和/或生物活性分子的靶向递送特别有用。

实施例21

Cholix结构域I衍生的递送构建体的基底分泌

[0550] 本实施例说明了一种机制,可以利用这种机制来实现Cholix衍生的递送构建体的高效基底释放,从而能允许货物高效转运穿过上皮层(例如,肠上皮)。

[0551] 在最初的捕获研究中鉴定了基底膜特异性硫酸乙酰肝素蛋白聚糖蛋白(HSPG、HSPG2或串珠蛋白聚糖),一种支持肠道单层柱状上皮的基底膜的构成部分(参见,例如,图29、图30)。串珠蛋白聚糖受酪氨酸磷酸酶(PTPN6)调节,并与含von Willebrand因子A结构域的蛋白1(VWA1)相互作用,这两种蛋白质都在使用具有SEQ ID NO:164的构建体的拉下捕获时被富集。

[0552] 在极化形式生长的Caco-2细胞中的稳定敲减串珠蛋白聚糖(Caco-2^{HSPG2-})显著降低了具有SEQ ID NO:164的构建体完成体外胞吞转运的能力。基于ELISA的结合研究表明,Chx可以与串珠蛋白聚糖缔合。SPR研究显示出Chx与串珠蛋白聚糖在pH 5.5时发生相互作用,而在pH7.4时则不相互作用。

[0553] 在未经处理的动物的肠上皮细胞中,用具有SEQ ID NO:158的构建体进行顶端暴露后,在分布在顶端、核上和基底隔室的囊泡中观察到串珠蛋白聚糖阳性免疫标记;ERGIC-53(LAMN1)的分布局限于顶端和核上隔室之间的位置(图9D)。顶端施加具有SEQ ID NO:164的构建体导致在核上隔室观察到的相对串珠蛋白聚糖标记的减少和与ERGIC-53(LAMN1)在

顶端和基底隔室中的共定位,其中管腔质膜下有一个区域对ERGIC-53(LAMN1)呈阳性,但对串珠蛋白聚糖不呈阳性。存在于管腔质膜下的区域的ERGIC-53(LAMN1)对具有SEQ ID NO:164的构建体呈阳性,但缺少串珠蛋白聚糖。对HGH阳性的囊泡对ERGIC-53(LAMN1)或串珠蛋白聚糖或对二者也呈阳性,阳性的程度在顶端和基底隔室有所不同。具有SEQ ID NO:164的构建体、ERGIC-53(LAMN1)和串珠蛋白聚糖在这些隔室中的令人惊讶的共定位表明,Cholix可能通过ERGIC-53(LAMN1)和/或串珠蛋白聚糖(和/或可能的其他相互作用元件)运输到细胞的基底侧,在那里它可以通过胞吞转运过程释放。

[0554] 值得注意的是,本文所述的Chx胞吞转运途径表明,与异源(非Cholix衍生)货物偶联的Chx衍生的携带体蛋白除了颠覆ERGIC-53(LAMN1)之外,不会导致细胞的组织紊乱,这表明本文所述的(例如,治疗性)货物的递送机制不损害上皮层或细胞本身。因此,在递送构建体本身不损害上皮的情况下高效地进行货物递送可以是本文所述的递送构建体和方法的一个重要特征。它可以允许以非侵入性的方式递送各种治疗性和/或诊断性或其他的货物分子,潜在地考虑到安全性和治疗效果的标准。

[0555] 该数据表明,特定蛋白质(例如,ERGEC-53、ribophilin1、SEC24、CK-8、TMEM132A、GPR75和串珠蛋白聚糖)参与了穿过上皮细胞运输Cholix结构域I衍生的递送构建体,并允许其从基底膜释放。不同的相互作用伴侣的身份和这些相互作用的pH依赖性对于治疗应用可能尤其有用,因为本文所述的运输路径允许利用内源性运输途径将与各种货物分子偶联的Cholix结构域I衍生的携带体递送到达基底外侧隔室(例如,固有层)。然而,并且在上述实施例11中证明,Cholix(和PE)结构域I的特定功能元件允许将异源性货物递送到上皮内和/或穿过上皮的不同位置。

[0556] 因此,本文所述的由Cholix衍生的递送构建体使用的用于高效实现胞吞转运的多受体、多隔室通路可以为口服递送能够与Cholix结构域I携带体或从其衍生的携带体偶联的治疗性分子(例如,蛋白质治疗剂,如治疗性抗体)提供一个潜在的路线图。

实施例22

Cholix结构域I的功能性肽片段位于蛋白质表面

[0557] 本实施例说明了本文描述的促进胞吞转运和顶端到基底运输的Cholix结构域I的功能序列元件的部分位于Cholix外毒素结构域I的蛋白质表面。

[0558] 蛋白质结构分析表明,顶端胞吞、顶端到基底运输和基底释放所需要的功能元件在Cholix结构域I蛋白的表面彼此接近。

[0559] 使用细菌性表达的Cholix结构域I(SEQ ID NO:5)的表面模型来突出显示在这个胞吞转运过程中潜在感兴趣的选定区域,因为它们是从蛋白质表面突出的(图32)。值得注意的是,M^{1}和G^{40}之间的两个氨基酸区域与表面暴露的氨基酸D^{151}-A^{187}和A^{187}-L^{206}相邻。具体地说,L^{18}-I^{26}(结构域X1)和T^{171}-I^{176}(结构域X2)配合形成一个由若干负电荷包围的口袋。类似地,K^{187}-H^{203}(结构域X3)与I^{32}-E^{40}(结构域X4)配合形成一个连续的脊状结构(图32A-图32D)。

[0560] 该数据表明,在Cholix结构域I的氨基酸序列中,在序列内的氨基酸位置上彼此相距较远的部分实际上可以在Cholix结构域I蛋白的三维结构中彼此接近。该数据表明,Cholix结构域I的三维结构和表面形态允许与高效胞吞和/或转运穿过上皮细胞所需要的受体和受体元件的相互作用。这可用于设计包含这种Cholix结构域I衍生的携带体分子的

口服施用疗法，以提供基底外侧室、固有层等的治疗有效剂量，从而获得治疗效果。

[0561] 根据本公开，可以在不进行过度实验的情况下制造和实施本文所公开和要求保护的所有制品和方法。虽然已经根据具体实施方案描述了本公开的制品和方法，但是对于本领域的技术人员来说，可以在不脱离本公开的精神和范围的情况下对制品和方法做出变化是显而易见的。对于本领域技术人员来说显而易见的所有此类变化和等同物，无论是现在存在的还是后来开发的，都被认为在所附权利要求所定义的本公开的精神和范围内。说明书中提及的所有专利、专利申请和出版物都表示本公开所属领域的普通技术人员的水平。所有专利、专利申请和出版物在本文中以引用的方式完整地并入本文中用于所有目的，如同每一个单独的出版物均被明确地和单独地表示为通过引用整体并入而用于任何目的。在没有本文未具体公开的任何元件的情况下，都可以适当地实施本文说明性描述的公开内容。已使用的术语和表达被用作描述术语而非限制性术语，并且在使用此类术语和表达时无意排除所示出和描述的特征或其部分的任何等价物，但应认识到，在本公开所要求的范围内可以进行各种修改。因此，应当理解，虽然已经通过具体实施方案和任选的特征具体公开了本公开内容，但是本领域技术人员可以采取对本文所公开的概念的修改和变化，并且这些修改和变化被认为是在所附权利要求所定义的本公开的范围内。

序列表

[0562] SEQ ID NO:1是成熟的霍乱弧菌Cholix毒素的634氨基酸序列。

[0563] SEQ ID NO:2是成熟的霍乱弧菌Cholix毒素的634氨基酸序列。

[0564] SEQ ID NO:3是成熟的霍乱弧菌Cholix毒素的非毒性(nt)变体。

[0565] SEQ ID NO:4是Cholix毒素的结构域I。

[0566] SEQ ID NO:5是包含N末端甲硫氨酸残基(例如，由于细菌表达)的Cholix毒素的结构域I。

[0567] SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:125是Cholix结构域I的截短形式。

[0568] SEQ ID NO:126是霍乱弧菌Cholix携带体易位结构域(结构域II)的氨基酸序列。

[0569] SEQ ID NO:127是霍乱弧菌携带体结构域Ib的氨基酸序列。

[0570] SEQ ID NO:128是霍乱弧菌携带体催化结构域(结构域III)的氨基酸序列。

[0571] SEQ ID NO:129是$Cholix^{1-425}$的氨基酸序列。

[0572] SEQ ID NO:130是$Cholix^{1-415}$的氨基酸序列。

[0573] SEQ ID NO:131是$Cholix^{1-397}$的氨基酸序列。

[0574] SEQ ID NO:132是$Cholix^{1-386}$的氨基酸序列。

[0575] SEQ ID NO:133是$Cholix^{1-291}$的氨基酸序列。

[0576] SEQ ID NO:134是编码SEQ ID NO:2中所列的成熟霍乱弧菌Cholix毒素的核酸序列。

[0577] SEQ ID NO:135是编码成熟假单胞菌外毒素A(PE)的613氨基酸序列的核酸序列。

[0578] SEQ ID NO:136是编码SEQ ID NO:135中所列的成熟假单胞菌外毒素A(PE)的核酸序列。

[0579] SEQ ID NO:137是假单胞菌外毒素A(PE)受体结合域(结构域I)的氨基酸序列。

[0580] SEQ ID NO:138是假单胞菌外毒素A(PE)易位结构域(结构域II)的氨基酸序列。

[0581] SEQ ID NO:139是假单胞菌外毒素A(PE)结构域Ib的氨基酸序列。

[0582] SEQ ID NO:140是假单胞菌外毒素A(PE)催化结构域(结构域III)的氨基酸序列。

[0583] SEQ ID NO:141是PE^{1-404}的氨基酸序列。

[0584] SEQ ID NO:142是PE^{1-395}的氨基酸序列。

[0585] SEQ ID NO:143是PE^{1-375}的氨基酸序列。

[0586] SEQ ID NO:144是PE^{1-364}的氨基酸序列。

[0587] SEQ ID NO:145是PE^{1-277}的氨基酸序列。

[0588] SEQ ID NO:146是杂种递送构建体的氨基酸序列。

[0589] SEQ ID NO:147是杂种递送构建体的氨基酸序列。

[0590] SEQ ID NO:148是衍生自Cholix结构域I的功能肽序列的氨基酸序列(例如,用于胞吞)。

[0591] SEQ ID NO:149是衍生自Cholix结构域I的功能肽序列的氨基酸序列(例如,用于顶端到基底的转运)。

[0592] SEQ ID NO:150是衍生自Cholix结构域I的功能肽序列的氨基酸序列(例如,用于顶端到基底的转运)。

[0593] SEQ ID NO:151是衍生自Cholix结构域I的功能肽序列的氨基酸序列(例如,用于核上定位)。

[0594] SEQ ID NO:152是衍生自Cholix结构域I的功能肽序列的氨基酸序列(例如,用于基底释放)。

[0595] SEQ ID NO:153是包含人生长激素(HGH)的Cholix衍生的递送构建体的氨基酸序列。

[0596] SEQ ID NO:154是包含白细胞介素-10(IL-10)的Cholix衍生的递送构建体的氨基酸序列。

[0597] SEQ ID NO:155是包含白细胞介素-10(IL-22)的Cholix衍生的递送构建体的氨基酸序列。

[0598] SEQ ID NO:156是包含红色荧光蛋白(RFP)的Cholix衍生的递送构建体的氨基酸序列。

[0599] SEQ ID NO:157是包含红色荧光蛋白(RFP)的Cholix衍生(包含非毒性成熟Cholix)的递送构建体的氨基酸序列。

[0600] SEQ ID NO:158是包含HGH的截短Cholix结构域I递送构建体的氨基酸序列。

[0601] SEQ ID NO:159是包含HGH的截短Cholix结构域I递送构建体的氨基酸序列。

[0602] SEQ ID NO:160是包含HGH的截短Cholix结构域I递送构建体的氨基酸序列。

[0603] SEQ ID NO:161是包含HGH的截短Cholix结构域I递送构建体的氨基酸序列。

[0604] SEQ ID NO:162是包含HGH的截短Cholix结构域I递送构建体的氨基酸序列。

[0605] SEQ ID NO:163是包含HGH的截短Cholix结构域I递送构建体的氨基酸序列。

[0606] SEQ ID NO:164是包含HGH的Cholix结构域I递送构建体的氨基酸序列。

[0607] SEQ ID NO:165是包含HGH的截短Cholix结构域I递送构建体的氨基酸序列。

[0608] SEQ ID NO:166-SEQ ID NO:186是各种肽酶裂解位点的氨基酸序列。

[0609] SEQ ID NO:187-SEQ ID NO:193是各种GM-1受体结合肽的氨基酸序列。

[0610] SEQ ID NO:194-SEQ ID NO:206是各种可裂解间隔区的氨基酸序列。

[0611] SEQ ID NO:207-SEQ ID NO:213是各种不可裂解间隔区的氨基酸序列。

[0612] SEQ ID NO:214是人生长激素(HGH)的氨基酸序列。

[0613] SEQ ID NO:215是GLP-1激动肽的氨基酸序列。

[0614] SEQ ID NO:216是胰岛素肽的氨基酸序列。

[0615] SEQ ID NO:217是人白细胞介素-10(IL-10)的氨基酸序列。

[0616] SEQ ID NO:218是人白细胞介素-22(IL-22)的氨基酸序列。

[0617] SEQ ID NO:219是ExtB多肽的氨基酸序列。

[0618] SEQ ID NO:220是红色荧光蛋白(RFP)的氨基酸序列。

[0619] SEQ ID NO:221是与间隔区偶联的Cholix结构域I衍生的携带体的氨基酸序列。

序列表

<110> 应用分子运输公司

<120> 用于经口递送的毒素衍生的新颖递送构建体

<130> 40566-711.601

<140>

<141>

<150> 62/640,168

<151> 2018-03-08

<150> 62/640,194

<151> 2018-03-08

<150> 62/640,188

<151> 2018-03-08

<160> 221

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 634

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 1

```
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1               5                  10                  15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
            20                  25                  30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
        35                  40                  45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
    50                  55                  60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65                  70                  75                  80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
                85                  90                  95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
            100                 105                 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
        115                 120                 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
    130                 135                 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
```

145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205
Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
210 215 220
Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240
Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
245 250 255
Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270
Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285
Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300
Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320
Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335
Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350
Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365
Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380
Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
385 390 395 400
Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg
405 410 415
Ser Gly Arg Ser Tyr Leu Pro Glu Asn Arg Ala Val Ile Thr Pro Gln
420 425 430
Gly Val Thr Asn Trp Thr Tyr Gln Glu Leu Glu Ala Thr His Gln Ala
435 440 445
Leu Thr Arg Glu Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Asn His
450 455 460

Val Ala Ala Gln Thr Ile Val Asn Arg Ile Ala Pro Val Pro Arg Gly
465 470 475 480
Asn Asn Thr Glu Asn Glu Glu Lys Trp Gly Gly Leu Tyr Val Ala Thr
485 490 495
His Ala Glu Val Ala His Gly Tyr Ala Arg Ile Lys Glu Gly Thr Gly
500 505 510
Glu Tyr Gly Leu Pro Thr Arg Ala Glu Arg Asp Ala Arg Gly Val Met
515 520 525
Leu Arg Val Tyr Ile Pro Arg Ala Ser Leu Glu Arg Phe Tyr Arg Thr
530 535 540
Asn Thr Pro Leu Glu Asn Ala Glu Glu His Ile Thr Gln Val Ile Gly
545 550 555 560
His Ser Leu Pro Leu Arg Asn Glu Ala Phe Thr Gly Pro Glu Ser Ala
565 570 575
Gly Gly Glu Asp Glu Thr Val Ile Gly Trp Asp Met Ala Ile His Ala
580 585 590
Val Ala Ile Pro Ser Thr Ile Pro Gly Asn Ala Tyr Glu Glu Leu Ala
595 600 605
Ile Asp Glu Glu Ala Val Ala Lys Glu Gln Ser Ile Ser Thr Lys Pro
610 615 620
Pro Tyr Lys Glu Arg Lys Asp Glu Leu Lys
625 630

<210> 2
<211> 634
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 2

Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205
Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
210 215 220
Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240
Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
245 250 255
Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270
Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285
Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300
Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320
Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335
Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350
Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365
Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380
Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
385 390 395 400
Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg

405 410 415
Ser Gly Arg Ser Tyr Leu Pro Glu Asn Arg Ala Val Ile Thr Pro Gln
420 425 430
Gly Val Thr Asn Trp Thr Tyr Gln Glu Leu Glu Ala Thr His Gln Ala
435 440 445
Leu Thr Arg Glu Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Asn His
450 455 460
Val Ala Ala Gln Thr Ile Val Asn Arg Ile Ala Pro Val Pro Arg Gly
465 470 475 480
Asn Asn Thr Glu Asn Glu Glu Lys Trp Gly Gly Leu Tyr Val Ala Thr
485 490 495
His Ala Glu Val Ala His Gly Tyr Ala Arg Ile Lys Glu Gly Thr Gly
500 505 510
Glu Tyr Gly Leu Pro Thr Arg Ala Glu Arg Asp Ala Arg Gly Val Met
515 520 525
Leu Arg Val Tyr Ile Pro Arg Ala Ser Leu Glu Arg Phe Tyr Arg Thr
530 535 540
Asn Thr Pro Leu Glu Asn Ala Glu Glu His Ile Thr Gln Val Ile Gly
545 550 555 560
His Ser Leu Pro Leu Arg Asn Glu Ala Phe Thr Gly Pro Glu Ser Ala
565 570 575
Gly Gly Glu Asp Glu Thr Val Ile Gly Trp Asp Met Ala Ile His Ala
580 585 590
Val Ala Ile Pro Ser Thr Ile Pro Gly Asn Ala Tyr Glu Glu Leu Ala
595 600 605
Ile Asp Glu Glu Ala Val Ala Lys Glu Gln Ser Ile Ser Thr Lys Pro
610 615 620
Pro Tyr Lys Glu Arg Lys Asp Glu Leu Lys
625 630

<210> 3
<211> 634
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 3
Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile

35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160

Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175

Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190

Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205

Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
210 215 220

Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240

Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
245 250 255

Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350

Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365
Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380
Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
385 390 395 400
Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg
405 410 415
Ser Gly Arg Ser Tyr Leu Pro Glu Asn Arg Ala Val Ile Thr Pro Gln
420 425 430
Gly Val Thr Asn Trp Thr Tyr Gln Glu Leu Glu Ala Thr His Gln Ala
435 440 445
Leu Thr Arg Glu Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Asn His
450 455 460
Val Ala Ala Gln Thr Ile Val Asn Arg Ile Ala Pro Val Pro Arg Gly
465 470 475 480
Asn Asn Thr Glu Asn Glu Glu Lys Trp Gly Gly Leu Tyr Val Ala Thr
485 490 495
His Ala Glu Val Ala His Gly Tyr Ala Arg Ile Lys Glu Gly Thr Gly
500 505 510
Glu Tyr Gly Leu Pro Thr Arg Ala Glu Arg Asp Ala Arg Gly Val Met
515 520 525
Leu Arg Val Tyr Ile Pro Arg Ala Ser Leu Glu Arg Phe Tyr Arg Thr
530 535 540
Asn Thr Pro Leu Glu Asn Ala Glu Glu His Ile Thr Gln Val Ile Gly
545 550 555 560
His Ser Leu Pro Leu Arg Asn Glu Ala Phe Thr Gly Pro Glu Ser Ala
565 570 575
Gly Gly Glu Asp Ala Thr Val Ile Gly Trp Asp Met Ala Ile His Ala
580 585 590
Val Ala Ile Pro Ser Thr Ile Pro Gly Asn Ala Tyr Glu Glu Leu Ala
595 600 605
Ile Asp Glu Glu Ala Val Ala Lys Glu Gln Ser Ile Ser Thr Lys Pro
610 615 620
Pro Tyr Lys Glu Arg Lys Asp Glu Leu Lys
625 630

<210> 4
<211> 265
<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 4

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205
Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
210 215 220
Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240
Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
245 250 255
Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys
260 265

<210> 5

<211> 266

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 5

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205
Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
210 215 220
Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240
Ala Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys
245 250 255
Pro Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys

260 265

<210> 6

<211> 250

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 6

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205
Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
210 215 220
Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240
Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln
245 250

<210> 7

<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 7

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205
Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
210 215 220
Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240
Ala Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln

245 250

<210> 8

<211> 244

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 8

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15

Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160

Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175

Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190

Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205

Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
210 215 220

Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240

Gly Thr Pro Lys

<210> 9

<211> 245

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 9

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205
Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
210 215 220
Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240
Ala Gly Thr Pro Lys
245

<210> 10
<211> 205
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 10

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu
195 200 205

<210> 11
<211> 206
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"

<400> 11

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu
195 200 205

<210> 12

<211> 204

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 12

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile

50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly
195 200

<210> 13
<211> 203
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 13

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys

115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr
195 200

<210> 14
<211> 202
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 14
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly

180 185 190

Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His

195 200

<210> 15

<211> 201

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 15

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp
195 200

<210> 16

<211> 200

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 16

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His
195 200

<210> 17
<211> 199
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 17

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala
195

<210> 18
<211> 198
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 18

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp
195

<210> 19
<211> 197
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 19

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190

Ser Arg His Lys Arg
195

<210> 20
<211> 196
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 20

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys
195

<210> 21
<211> 195
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 21

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser

1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His
195

<210> 22
<211> 194
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 22

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val

65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg

<210> 23
<211> 193
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 23

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser

<210> 24
<211> 192
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 24

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190

<210> 25
<211> 191
<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 25

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190

<210> 26

<211> 190

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 26

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys
180 185 190

<210> 27
<211> 189
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 27

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln
180 185

<210> 28
<211> 188
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 28

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala
180 185

<210> 29
<211> 187
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌

<400> 29

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala
180 185

<210> 30

<211> 186

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 30

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val

65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
180 185

<210> 31
<211> 187
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 31
Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile

115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
180 185

<210> 32
<211> 185
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 32
Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser Leu
1 5 10 15
Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser
20 25 30
Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn
35 40 45
Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile
50 55 60
Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn
65 70 75 80
Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn
85 90 95
Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile
100 105 110
Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile
115 120 125
Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys
130 135 140
Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr
145 150 155 160
Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala
165 170 175
Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
180 185

<210> 33

<211> 184
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 33

Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser Leu Thr
1 5 10 15
Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp
20 25 30
Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp
35 40 45
Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr
50 55 60
Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln
65 70 75 80
Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly
85 90 95
Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn
100 105 110
Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser
115 120 125
Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu
130 135 140
Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln
145 150 155 160
Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile
165 170 175
Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
180

<210> 34
<211> 183
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 34

Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser Leu Thr Pro
1 5 10 15
Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val
20 25 30
Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu
35 40 45

Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile
50 55 60
Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp
65 70 75 80
Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr
85 90 95
Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp
100 105 110
Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val
115 120 125
Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr
130 135 140
Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly
145 150 155 160
Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser
165 170 175
Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
180

<210> 35
<211> 182
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 35

Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser Leu Thr Pro Glu
1 5 10 15
Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val
20 25 30
Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln
35 40 45
Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly
50 55 60
Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala
65 70 75 80
Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys
85 90 95
Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu
100 105 110
Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp
115 120 125

Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser
130 135 140
Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn
145 150 155 160
Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp
165 170 175
Pro Ser Val Ser Tyr Lys
180

<210> 36
<211> 181
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 36
Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser Leu Thr Pro Glu Pro
1 5 10 15
Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu
20 25 30
Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn
35 40 45
Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu
50 55 60
Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro
65 70 75 80
Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr
85 90 95
Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val
100 105 110
Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu
115 120 125
Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile
130 135 140
Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val
145 150 155 160
Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro
165 170 175
Ser Val Ser Tyr Lys
180

<210> 37
<211> 180

<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 37

Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly
1 5 10 15
Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp
20 25 30
Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp
35 40 45
Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe
50 55 60
Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe
65 70 75 80
Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr
85 90 95
Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro
100 105 110
Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu
115 120 125
Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp
130 135 140
Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser
145 150 155 160
Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser
165 170 175
Val Ser Tyr Lys
180

<210> 38
<211> 179
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 38

Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys
1 5 10 15
Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu
20 25 30
Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile
35 40 45
Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala

50 55 60

Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly
65 70 75 80

Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser
85 90 95

Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile
100 105 110

Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp
115 120 125

Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu
130 135 140

Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe
145 150 155 160

Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val
165 170 175

Ser Tyr Lys

<210> 39

<211> 178

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 39

Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro
1 5 10 15

Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly
20 25 30

Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys
35 40 45

Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr
50 55 60

Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val
65 70 75 80

Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr
85 90 95

Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly
100 105 110

Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp
130 135 140

Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser
145 150 155 160
Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser
165 170 175
Tyr Lys

<210> 40
<211> 177
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 40

Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile
1 5 10 15
Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val
20 25 30
Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp
35 40 45
Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val
50 55 60
Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile
65 70 75 80
His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn
85 90 95
Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu
100 105 110
Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln
115 120 125
Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn
130 135 140
Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val
145 150 155 160
Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr
165 170 175
Lys

<210> 41
<211> 176
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 41

Cys Arg Ser Pro Cys Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln

1 5 10 15
Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu
20 25 30
Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu
35 40 45
Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg
50 55 60
Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His
65 70 75 80
Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg
85 90 95
Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp
100 105 110
Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg
115 120 125
Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln
130 135 140
Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr
145 150 155 160
Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
165 170 175

<210> 42
<211> 175
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 42

Arg Ser Pro Cys Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser
1 5 10 15
Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr
20 25 30
Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp
35 40 45
Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala
50 55 60
Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu
65 70 75 80
Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys
85 90 95
Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser

100 105 110
Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn
115 120 125
Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr
130 135 140
Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg
145 150 155 160
Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
165 170 175

<210> 43
<211> 174
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 43
Ser Pro Cys Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr
20 25 30
Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys
35 40 45
Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr
50 55 60
Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp
65 70 75 80
Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu
85 90 95
Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro
100 105 110
Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile
115 120 125
Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu
130 135 140
Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro
145 150 155 160
Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
165 170

<210> 44
<211> 173
<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 44

Pro Cys Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu
1 5 10 15
Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser
20 25 30
Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly
35 40 45
Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg
50 55 60
His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile
65 70 75 80
Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly
85 90 95
Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala
100 105 110
Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile
115 120 125
Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu
130 135 140
Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu
145 150 155 160
His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
165 170

<210> 45

<211> 172

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 45

Cys Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser
1 5 10 15
Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met
20 25 30
Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu
35 40 45
Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His
50 55 60
Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr
65 70 75 80

Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu
85 90 95
Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser
100 105 110
Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu
115 120 125
Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln
130 135 140
Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His
145 150 155 160
Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
165 170

<210> 46
<211> 171
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 46

Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
1 5 10 15
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
20 25 30
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
35 40 45
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
50 55 60
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
65 70 75 80
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
85 90 95
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
100 105 110
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
115 120 125
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
130 135 140
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
145 150 155 160
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
165 170

<210> 47
<211> 170
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 47

Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
1 5 10 15
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
20 25 30
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
35 40 45
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
50 55 60
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
65 70 75 80
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
85 90 95
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
100 105 110
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
115 120 125
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
130 135 140
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
145 150 155 160
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
165 170

<210> 48
<211> 169
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 48

Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser
1 5 10 15
Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn
20 25 30
Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile
35 40 45
Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn

50 55 60

Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn
65 70 75 80

Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile
85 90 95

Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile
100 105 110

Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys
115 120 125

Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr
130 135 140

Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala
145 150 155 160

Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
165

<210> 49

<211> 168

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 49

Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp
1 5 10 15

Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp
20 25 30

Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr
35 40 45

Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln
50 55 60

Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly
65 70 75 80

Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn
85 90 95

Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser
100 105 110

Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu
115 120 125

Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln
130 135 140

Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile

145 150 155 160
Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
165

<210> 50
<211> 167
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 50

Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val
1 5 10 15
Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu
20 25 30
Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile
35 40 45
Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp
50 55 60
Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr
65 70 75 80
Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp
85 90 95
Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val
100 105 110
Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr
115 120 125
Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly
130 135 140
Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser
145 150 155 160
Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
165

<210> 51
<211> 166
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 51

Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val
1 5 10 15
Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln
20 25 30

Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly
35 40 45
Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala
50 55 60
Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys
65 70 75 80
Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu
85 90 95
Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp
100 105 110
Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser
115 120 125
Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn
130 135 140
Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp
145 150 155 160
Pro Ser Val Ser Tyr Lys
165

<210> 52
<211> 165
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 52

Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu
1 5 10 15
Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn
20 25 30
Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu
35 40 45
Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro
50 55 60
Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val
85 90 95
Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu
100 105 110
Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile
115 120 125

Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val
130 135 140
Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro
145 150 155 160
Ser Val Ser Tyr Lys
165

<210> 53
<211> 164
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 53

Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp
1 5 10 15
Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp
20 25 30
Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe
35 40 45
Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe
50 55 60
Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr
65 70 75 80
Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro
85 90 95
Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu
100 105 110
Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp
115 120 125
Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser
130 135 140
Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser
145 150 155 160
Val Ser Tyr Lys

<210> 54
<211> 163
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 54

Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu
1 5 10 15

Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile
20 25 30
Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala
35 40 45
Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly
50 55 60
Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser
65 70 75 80
Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile
85 90 95
Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp
100 105 110
Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu
115 120 125
Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe
130 135 140
Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val
145 150 155 160
Ser Tyr Lys

<210> 55
<211> 162
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 55

Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly
1 5 10 15
Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys
20 25 30
Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr
35 40 45
Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val
50 55 60
Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr
65 70 75 80
Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly
85 90 95
Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln
100 105 110
Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp

115 120 125
Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser
130 135 140
Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser
145 150 155 160
Tyr Lys

<210> 56
<211> 161
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 56
Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val
1 5 10 15
Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp
20 25 30
Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val
35 40 45
Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile
50 55 60
His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn
65 70 75 80
Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu
85 90 95
Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln
100 105 110
Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn
115 120 125
Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val
130 135 140
Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr
145 150 155 160
Lys

<210> 57
<211> 160
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 57
Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu
1 5 10 15

Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu
20 25 30
Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg
35 40 45
Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His
50 55 60
Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg
65 70 75 80
Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp
85 90 95
Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg
100 105 110
Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln
115 120 125
Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr
130 135 140
Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
145 150 155 160

<210> 58
<211> 159
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌

<400> 58
Lys Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr
1 5 10 15
Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp
20 25 30
Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala
35 40 45
Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu
50 55 60
Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys
65 70 75 80
Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser
85 90 95
Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn
100 105 110
Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr
115 120 125

Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg
130 135 140
Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
145 150 155

<210> 59
<211> 158
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 59

Leu Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr
1 5 10 15
Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys
20 25 30
Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr
35 40 45
Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp
50 55 60
Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu
65 70 75 80
Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro
85 90 95
Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile
100 105 110
Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu
115 120 125
Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro
130 135 140
Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
145 150 155

<210> 60
<211> 157
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 60

Ser Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser
1 5 10 15
Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly
20 25 30
Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg

35 40 45

His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile
50 55 60

Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly
65 70 75 80

Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala
85 90 95

Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile
100 105 110

Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu
115 120 125

Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu
130 135 140

His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
145 150 155

<210> 61

<211> 156

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 61

Ile Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met
1 5 10 15

Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu
20 25 30

Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His
35 40 45

Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr
50 55 60

Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu
65 70 75 80

Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser
85 90 95

Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu
100 105 110

Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln
115 120 125

Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His
130 135 140

Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys

145 150 155

<210> 62
<211> 155
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 62

Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
1 5 10 15
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
20 25 30
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
35 40 45
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
50 55 60
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
65 70 75 80
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
85 90 95
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
100 105 110
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
115 120 125
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
130 135 140
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
145 150 155

<210> 63
<211> 154
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 63

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
1 5 10 15
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
20 25 30
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
35 40 45
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
50 55 60

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
65 70 75 80
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
85 90 95
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
100 105 110
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
115 120 125
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
130 135 140
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
145 150

<210> 64
<211> 153
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 64

Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn
1 5 10 15
Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile
20 25 30
Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn
35 40 45
Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn
50 55 60
Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile
65 70 75 80
Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile
85 90 95
Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys
100 105 110
Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr
115 120 125
Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala
130 135 140
Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
145 150

<210> 65
<211> 152

<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 65

Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp
1 5 10 15
Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr
20 25 30
Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln
35 40 45
Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly
50 55 60
Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn
65 70 75 80
Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser
85 90 95
Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu
100 105 110
Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln
115 120 125
Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile
130 135 140
Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
145 150

<210> 66
<211> 151
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 66

Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu
1 5 10 15
Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile
20 25 30
Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp
35 40 45
Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr
50 55 60
Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp
65 70 75 80
Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val

85 90 95
Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr
100 105 110
Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly
115 120 125
Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser
130 135 140
Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys
145 150

<210> 67
<211> 150
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 67
Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln
1 5 10 15
Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly
20 25 30
Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala
35 40 45
Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys
50 55 60
Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu
65 70 75 80
Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp
85 90 95
Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser
100 105 110
Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn
115 120 125
Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp
130 135 140
Pro Ser Val Ser Tyr Lys
145 150

<210> 68
<211> 149
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 68

Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn
1 5 10 15
Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu
20 25 30
Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro
35 40 45
Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr
50 55 60
Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val
65 70 75 80
Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu
85 90 95
Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile
100 105 110
Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val
115 120 125
Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro
130 135 140
Ser Val Ser Tyr Lys
145

<210> 69
<211> 148
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌

<400> 69
Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp
1 5 10 15
Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe
20 25 30
Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe
35 40 45
Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr
50 55 60
Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro
65 70 75 80
Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu
85 90 95
Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp
100 105 110

Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser
115 120 125
Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser
130 135 140
Val Ser Tyr Lys
145

<210> 70
<211> 147
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 70

Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile
1 5 10 15
Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala
20 25 30
Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly
35 40 45
Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser
50 55 60
Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile
65 70 75 80
Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp
85 90 95
Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu
100 105 110
Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe
115 120 125
Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val
130 135 140
Ser Tyr Lys
145

<210> 71
<211> 185
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 71

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro

20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160

Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175

Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr
180 185

<210> 72

<211> 184

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 72

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15

Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala

100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160

Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175

Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser
180

<210> 73

<211> 183

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 73

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15

Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160

Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175

Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val

180

<210> 74
<211> 182
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 74

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser
180

<210> 75
<211> 181
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 75

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro
180

<210> 76
<211> 180
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 76

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp
180

<210> 77
<211> 179
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 77
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser
<210> 78

<211> 178
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 78

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile

<210> 79
<211> 177
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 79

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile

50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala

<210> 80
<211> 176
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 80

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175

<210> 81
<211> 175
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 81

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175

<210> 82
<211> 174
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 82

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro

20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160

Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His
165 170

<210> 83

<211> 173

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 83

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15

Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys

115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu
165 170

<210> 84
<211> 172
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 84
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro
165 170

<210> 85
<211> 171
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 85

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg
165 170

<210> 86
<211> 170
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 86

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr
165 170

<210> 87
<211> 169
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 87
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val
165

<210> 88
<211> 168

<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 88

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser
165

<210> 89
<211> 167
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 89

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val

65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe
165

<210> 90
<211> 166
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 90
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser

165

<210> 91
<211> 165
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 91

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val
165

<210> 92
<211> 164
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 92

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn

<210> 93
<211> 163
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 93

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys

145 150 155 160
Thr Gln Gly
<210> 94
<211> 162
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 94
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln
<210> 95
<211> 161
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 95
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr

<210> 96
<211> 160
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 96

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys

145 150 155 160

<210> 97

<211> 159

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 97

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155

<210> 98

<211> 158

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 98

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln
145 150 155

<210> 99
<211> 157
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 99

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu
145 150 155

<210> 100
<211> 156

<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 100

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu
145 150 155

<210> 101
<211> 155
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 101

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu

85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr
145 150 155

<210> 102
<211> 154
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 102

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln
145 150

<210> 103
<211> 153
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 103

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn
145 150

<210> 104
<211> 152
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 104

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp
145 150

<210> 105
<211> 151
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 105

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu
145 150

<210> 106
<211> 150
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 106

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro

20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp
145 150

<210> 107
<211> 151
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 107
Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe

100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp
145 150

<210> 108
<211> 149
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 108
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile
145

<210> 109
<211> 148
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 109
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15

Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser
145

<210> 110
<211> 147
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 110

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr
145
<210> 111
<211> 146
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 111
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu
145
<210> 112
<211> 145
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 112
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile

35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys
145

<210> 113
<211> 144
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 113

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15

Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

<210> 114

<211> 143
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 114

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140

<210> 115
<211> 142
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 115

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu
130 135 140

<210> 116
<211> 141
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 116

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile
130 135 140

<210> 117
<211> 140
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 117

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile

35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile
130 135 140

<210> 118

<211> 139

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 118

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15

Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn
130 135

<210> 119

<211> 138

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 119

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg
130 135

<210> 120

<211> 137

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 120

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln
130 135
<210> 121
<211> 136
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 121
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln
130 135
<210> 122
<211> 135
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 122
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile

50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp
130 135

<210> 123
<211> 134
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 123

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu
130

<210> 124
<211> 133
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 124

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu
130

<210> 125
<211> 134
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 125
Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95

Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu
130

<210> 126
<211> 121
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 126

Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro
1 5 10 15
Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp
20 25 30
Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala
35 40 45
Thr Arg Ile Leu Phe Ser His Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu
50 55 60
Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg
65 70 75 80
Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala
85 90 95
Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro
100 105 110
Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala Gln Ala
115 120

<210> 127
<211> 39
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 127

Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser Cys Val
1 5 10 15
Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg Ser Gly
20 25 30
Arg Ser Tyr Leu Pro Glu Asn
35

<210> 128

<211> 209
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 128

Arg Ala Val Ile Thr Pro Gln Gly Val Thr Asn Trp Thr Tyr Gln Glu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Thr His Gln Ala Leu Thr Arg Glu Gly Tyr Val Phe Val
20 25 30
Gly Tyr His Gly Thr Asn His Val Ala Ala Gln Thr Ile Val Asn Arg
35 40 45
Ile Ala Pro Val Pro Arg Gly Asn Asn Thr Glu Asn Glu Glu Lys Trp
50 55 60
Gly Gly Leu Tyr Val Ala Thr His Ala Glu Val Ala His Gly Tyr Ala
65 70 75 80
Arg Ile Lys Glu Gly Thr Gly Glu Tyr Gly Leu Pro Thr Arg Ala Glu
85 90 95
Arg Asp Ala Arg Gly Val Met Leu Arg Val Tyr Ile Pro Arg Ala Ser
100 105 110
Leu Glu Arg Phe Tyr Arg Thr Asn Thr Pro Leu Glu Asn Ala Glu Glu
115 120 125
His Ile Thr Gln Val Ile Gly His Ser Leu Pro Leu Arg Asn Glu Ala
130 135 140
Phe Thr Gly Pro Glu Ser Ala Gly Gly Glu Asp Glu Thr Val Ile Gly
145 150 155 160
Trp Asp Met Ala Ile His Ala Val Ala Ile Pro Ser Thr Ile Pro Gly
165 170 175
Asn Ala Tyr Glu Glu Leu Ala Ile Asp Glu Glu Ala Val Ala Lys Glu
180 185 190
Gln Ser Ile Ser Thr Lys Pro Pro Tyr Lys Glu Arg Lys Asp Glu Leu
195 200 205
Lys

<210> 129
<211> 425
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 129

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro

20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160

Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175

Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190

Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205

Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
210 215 220

Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240

Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
245 250 255

Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350
Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365
Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380
Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
385 390 395 400
Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg
405 410 415
Ser Gly Arg Ser Tyr Leu Pro Glu Asn
420 425

<210> 130
<211> 415
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 130

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175

Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205
Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
210 215 220
Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240
Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
245 250 255
Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270
Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285
Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300
Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320
Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335
Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350
Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365
Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380
Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
385 390 395 400
Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser
405 410 415

<210> 131
<211> 397
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 131

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205
Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
210 215 220
Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240
Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
245 250 255
Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270
Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285
Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300
Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320
Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335
Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly

340 345 350

Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365

Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380

Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala
385 390 395

<210> 132

<211> 386

<212> PRT

<213> 霍乱弧菌

<400> 132

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15

Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160

Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175

Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190

Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205

Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn

210 215 220
Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240
Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
245 250 255
Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270
Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285
Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300
Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320
Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335
Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350
Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365
Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380
Gln Ala
385

<210> 133
<211> 291
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 133

Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80
Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu

85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205
Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
210 215 220
Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240
Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
245 250 255
Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270
Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285
Arg Lys Pro
290

<210> 134
<211> 1902
<212> DNA
<213> 霍乱弧菌
<400> 134
gtcgaagaag ctttaaacat ctttgatgaa tgccgttcgc catgttcgtt gaccccggaa 60
ccgggtaagc cgattcaatc aaaactgtct atccctagtg atgttgttct ggatgaaggt 120
gttctgtatt actcgatgac gattaatgat gagcagaatg atattaagga tgaggacaaa 180
ggcgagtcca ttatcactat tggtgaattt gccacagtac gcgcgactag acattatgtt 240
aatcaagatg cgccttttgg tgtcatccat ttagatatta cgacagaaaa tggtacaaaa 300
acgtactctt ataaccgcaa agagggtgaa tttgcaatca attggttagt gcctattggt 360
gaagattctc ctgcaagcat caaaatctcc gttgatgagc tcgatcagca acgcaatatc 420

atcgaggtgc ctaaactgta tagtattgat ctcgataacc aaacgttaga gcagtggaaa 480
acccaaggta atgtttcttt ttcggtaacg cgtcctgaac ataatatcgc tatctcttgg 540
ccaagcgtga gttacaaagc agcgcagaaa gagggttcac gccataagcg ttgggctcat 600
tggcatacag gcttagcact gtgttggctt gtgccaatgg atgctatcta taactatatc 660
acccagcaaa attgtacttt aggggataat tggtttggtg gctcttatga gactgttgca 720
ggcactccga aggtgattac ggttaagcaa gggattgaac aaaagccagt tgagcagcgc 780
atccatttct ccaaggggaa tgcgatgagc gcacttgctg ctcatcgcgt ctgtggtgtg 840
ccattagaaa ctttggcgcg cagtcgcaaa cctcgtgatc tgacggatga tttatcatgt 900
gcctatcaag cgcagaatat cgtgagttta tttgtcgcga cgcgtatcct gttctctcat 960
ctggatagcg tatttactct gaatcttgac gaacaagaac cagaggtggc tgaacgtcta 1020
agtgatcttc gccgtatcaa tgaaaataac ccgggcatgg ttacacaggt tttaaccgtt 1080
gctcgtcaga tctataacga ttatgtcact caccatccgg gcttaactcc tgagcaaacc 1140
agtgcgggtg cacaagctgc cgatatcctc tctttatttt gcccagatgc tgataagtct 1200
tgtgtggctt caaacaacga tcaagccaat atcaacatcg agtctcgttc tggccgttca 1260
tatttgcctg aaaaccgtgc ggtaatcacc cctcaaggcg tcacaaattg gacttaccag 1320
gaactcgaag caacacatca agctctgact cgtgagggtt atgtgttcgt gggttaccat 1380
ggtacgaatc atgtcgctgc gcaaaccatc gtgaatcgca ttgcccctgt tccgcgcggc 1440
aacaacactg aaaacgagga aaagtggggc gggttatatg ttgcaactca cgctgaagtt 1500
gcccatggtt atgctcgcat caaagaaggg acaggggagt atggccttcc gacccgtgct 1560
gagcgcgacg ctcgtggggt aatgctgcgc gtgtatatcc ctcgtgcttc attagaacgt 1620
ttttatcgca cgaatacacc tttggaaaat gctgaggagc atatcacgca agtgattggt 1680
cattctttgc cattacgcaa tgaagcattt actggtccag aaagtgcggg cggggaagac 1740
gaaactgtca ttggctggga tatggcgatt catgcagttg cgatcccttc gactatccca 1800
gggaacgctt acgaagaatt ggcgattgat gaggaggctg ttgcaaaaga gcaatcgatt 1860
agcacaaaac caccttataa agagcgcaaa gatgaactta ag 1902

<210> 135
<211> 613
<212> PRT
<213> 铜绿假单胞菌
<400> 135

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
1 5 10 15
Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
20 25 30
Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
35 40 45
Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
50 55 60
Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu

65 70 75 80
Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
85 90 95
Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
100 105 110
Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
115 120 125
Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
130 135 140
Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
145 150 155 160
Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
165 170 175
Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
180 185 190
Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
195 200 205
Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
210 215 220
Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
225 230 235 240
Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
245 250 255
Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
260 265 270
Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
275 280 285
Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
290 295 300
Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
305 310 315 320
Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
325 330 335
Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
340 345 350
Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser Ala Asp Val Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp
370 375 380

Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe
385 390 395 400
Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn
405 410 415
Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg
420 425 430
Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln
435 440 445
Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala
450 455 460
Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
465 470 475 480
Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly
485 490 495
Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
500 505 510
Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu
515 520 525
Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly
530 535 540
Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu
545 550 555 560
Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
565 570 575
Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln
580 585 590
Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro
595 600 605
Arg Glu Asp Leu Lys
610

<210> 136
<211> 1839
<212> DNA
<213> 铜绿假单胞菌
<400> 136
gccgaggaag ccttcgacct ctggaacgaa tgcgccaagg cctgcgtgct cgacctcaag 60
gacggcgtgc gttccagccg catgagcgtc gacccggcca tcgccgacac caacggccag 120
ggcgtgctgc actactccat ggtcctggag ggcggcaacg acgcgctcaa gctggccatc 180
gacaacgccc tcagcatcac cagcgacggc ctgaccatcc gcctcgaagg tggcgtcgag 240

ccgaacaagc cggtgcgcta cagctacacg cgccaggcgc gcggcagttg gtcgctgaac 300
tggctggtgc cgatcggcca cgagaagcct tcgaacatca aggtgttcat ccacgaactg 360
aacgccggta accagctcag ccacatgtcg ccgatctaca ccatcgagat gggcgacgag 420
ttgctggcga agctggcgcg cgatgccacc ttcttcgtca gggcgcacga gagcaacgag 480
atgcagccga cgctcgccat cagccatgcc ggggtcagcg tggtcatggc ccaggcccag 540
ccgcgccggg aaaagcgctg gagcgaatgg gccagcggca aggtgttgtg cctgctcgac 600
ccgctggacg gggtctacaa ctacctcgcc cagcagcgct gcaacctcga cgatacctgg 660
gaaggcaaga tctaccgggt gctcgccggc aacccggcga agcatgacct ggacatcaag 720
cccacggtca tcagtcatcg cctgcatttc cccgagggcg gcagcctggc cgcgctgacc 780
gcgcaccagg cctgccacct gccgctggag accttcaccc gtcatcgcca gccgcgcggc 840
tgggaacaac tggagcagtg cggctatccg gtgcagcggc tggtcgccct ctacctggcg 900
gcgcggctgt cgtggaacca ggtcgaccag gtgatccgca acgccctggc cagccccggc 960
agcggcggcg acctgggcga agcgatccgc gagcagccgg agcaggcccg tctggccctg 1020
accctggccg ccgccgagag cgagcgcttc gtccggcagg gcacaggcaa cgacgaggcc 1080
ggcgcggcca gcgccgacgt ggtgagcctg acctgcccgg tcgccgccgg tgaatgcgcg 1140
ggcccggcgg acagcggcga cgccctgctg gagcgcaact atcccactgg cgcggagttc 1200
ctcggcgacg gcggcgacat cagcttcagc acccgcggca cgcagaactg gacggtggag 1260
cggctgctcc aggcgcaccg ccaactggag gagcgcggct atgtgttcgt cggctaccac 1320
ggcaccttcc tcgaagcggc gcaaagcatc gtcttcggcg gggtgcgcgc gcgcagccag 1380
gacctcgacg cgatctggcg cggtttctat atcgccggcg atccggcgct ggcctacggc 1440
tacgcccagg accaggaacc cgacgcgcgc ggccggatcc gcaacggtgc cctgctgcgg 1500
gtctatgtgc cgcgctcgag tctgccgggc ttctaccgca ccggcctgac cctggccgcg 1560
ccggaggcgg cgggcgaggt cgaacggctg atcggccatc cgctgccgct gcgcctggac 1620
gccatcaccg gccccgagga ggaaggcggg cgcctggaaa ccattctcgg ctggccgctg 1680
gccgagcgca ccgtggtgat tccctcggcg atccccaccg acccgcgcaa cgtcggcggc 1740
gacctcgacc cgtccagcat ccccgacaag gaacaggcga tcagcgccct gccggactac 1800
gccagccagc ccggcaaacc gccgcgcgag gacctgaag 1839

<210> 137
<211> 252
<212> PRT
<213> 铜绿假单胞菌
<400> 137

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
1 5 10 15
Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
20 25 30
Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
35 40 45
Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu

50 55 60

Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
65 70 75 80

Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
85 90 95

Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
100 105 110

Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
115 120 125

Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
130 135 140

Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
145 150 155 160

Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
165 170 175

Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
180 185 190

Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
195 200 205

Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
210 215 220

Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
225 230 235 240

Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu
245 250

<210> 138
<211> 112
<212> PRT
<213> 铜绿假单胞菌
<400> 138

Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro
1 5 10 15

Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
20 25 30

Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala
35 40 45

Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu
50 55 60

Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln

65 70 75 80
Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu
85 90 95
Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser
100 105 110

<210> 139
<211> 40
<212> PRT
<213> 铜绿假单胞菌
<400> 139
Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala
1 5 10 15
Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr
20 25 30
Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly
35 40

<210> 140
<211> 209
<212> PRT
<213> 铜绿假单胞菌
<400> 140
Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu
1 5 10 15
Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe
20 25 30
Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe
35 40 45
Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly
50 55 60
Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp
65 70 75 80
Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg
85 90 95
Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu
100 105 110
Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly
115 120 125
His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu
130 135 140

Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr
145 150 155 160
Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly
165 170 175
Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala
180 185 190
Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu
195 200 205
Lys

<210> 141
<211> 404
<212> PRT
<213> 铜绿假单胞菌
<400> 141

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
1 5 10 15
Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
20 25 30
Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
35 40 45
Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
50 55 60
Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
65 70 75 80
Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
85 90 95
Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
100 105 110
Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
115 120 125
Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
130 135 140
Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
145 150 155 160
Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
165 170 175
Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
180 185 190
Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr

195 200 205

Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
210 215 220

Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
225 230 235 240

Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
245 250 255

Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
260 265 270

Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
275 280 285

Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
290 295 300

Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
305 310 315 320

Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
325 330 335

Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
340 345 350

Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser Ala Asp Val Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp
370 375 380

Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe
385 390 395 400

Leu Gly Asp Gly

<210> 142

<211> 395

<212> PRT

<213> 铜绿假单胞菌

<400> 142

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
1 5 10 15

Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
20 25 30

Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
35 40 45

Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
50 55 60

Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
65 70 75 80
Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
85 90 95
Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
100 105 110
Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
115 120 125
Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
130 135 140
Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
145 150 155 160
Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
165 170 175
Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
180 185 190
Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
195 200 205
Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
210 215 220
Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
225 230 235 240
Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
245 250 255
Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
260 265 270
Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
275 280 285
Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
290 295 300
Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
305 310 315 320
Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
325 330 335
Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
340 345 350
Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser Ala Asp Val Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp

370 375 380

Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro
385 390 395

<210> 143

<211> 375

<212> PRT

<213> 铜绿假单胞菌

<400> 143

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
1 5 10 15

Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
20 25 30

Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
35 40 45

Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
50 55 60

Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
65 70 75 80

Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
85 90 95

Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
100 105 110

Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
115 120 125

Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
130 135 140

Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
145 150 155 160

Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
165 170 175

Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
180 185 190

Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
195 200 205

Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
210 215 220

Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
225 230 235 240

Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu

245 250 255
Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
260 265 270
Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
275 280 285
Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
290 295 300
Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
305 310 315 320
Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
325 330 335
Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
340 345 350
Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser Ala Asp Val Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala
370 375

<210> 144
<211> 364
<212> PRT
<213> 铜绿假单胞菌
<400> 144
Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
1 5 10 15
Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
20 25 30
Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
35 40 45
Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
50 55 60
Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
65 70 75 80
Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
85 90 95
Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
100 105 110
Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
115 120 125
Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys

130 135 140

Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
145 150 155 160
Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
165 170 175
Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
180 185 190
Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
195 200 205
Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
210 215 220
Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
225 230 235 240
Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
245 250 255
Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
260 265 270
Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
275 280 285
Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
290 295 300
Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
305 310 315 320
Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
325 330 335
Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
340 345 350
Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser
355 360

<210> 145
<211> 277
<212> PRT
<213> 铜绿假单胞菌
<400> 145

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
1 5 10 15
Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
20 25 30
Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val

35 40 45

Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
50 55 60
Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
65 70 75 80
Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
85 90 95
Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
100 105 110
Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
115 120 125
Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
130 135 140
Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
145 150 155 160
Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
165 170 175
Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
180 185 190
Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
195 200 205
Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
210 215 220
Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
225 230 235 240
Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
245 250 255
Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
260 265 270
Thr Arg His Arg Gln
275

<210> 146
<211> 627
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"

<400> 146

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205
Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
210 215 220
Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240
Ala Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys
245 250 255
Pro Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Gly Gly Ser Leu Ala
260 265 270
Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr
275 280 285
Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr
290 295 300

Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp
305 310 315 320
Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser
325 330 335
Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg
340 345 350
Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln
355 360 365
Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Ser Ala Asp Val Val Ser
370 375 380
Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser
385 390 395 400
Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu
405 410 415
Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp
420 425 430
Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly
435 440 445
Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser
450 455 460
Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile
465 470 475 480
Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr
485 490 495
Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala
500 505 510
Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg
515 520 525
Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg
530 535 540
Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro
545 550 555 560
Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu
565 570 575
Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val
580 585 590
Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile
595 600 605
Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu

610 615 620

Asp Leu Lys
625

<210> 147
<211> 620
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 147

Met Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys
1 5 10 15
Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp
20 25 30
Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met
35 40 45
Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala
50 55 60
Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val
65 70 75 80
Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
85 90 95
Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
100 105 110
Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
115 120 125
His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala
130 135 140
Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
145 150 155 160
Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
165 170 175
Met Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
180 185 190
Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
195 200 205
Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys

210 215 220

Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
225 230 235 240

Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Asn
245 250 255

Ala Met Ser Ala Leu Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu
260 265 270

Thr Leu Ala Arg Ser Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser
275 280 285

Cys Ala Tyr Gln Ala Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg
290 295 300

Ile Leu Phe Ser His Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu
305 310 315 320

Gln Glu Pro Glu Val Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn
325 330 335

Glu Asn Asn Pro Gly Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln
340 345 350

Ile Tyr Asn Asp Tyr Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln
355 360 365

Thr Ser Ala Gly Ala Gln Ala Ala Glu Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro
370 375 380

Asp Ala Asp Lys Ser Cys Val Ala Thr Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile
385 390 395 400

Asn Ile Glu Ser Arg Ser Gly Arg Ser Tyr Leu Pro Glu Asn Arg Ala
405 410 415

Val Ile Thr Pro Gln Gly Val Thr Asn Trp Thr Tyr Gln Glu Leu Glu
420 425 430

Ala Thr His Gln Ala Leu Thr Arg Glu Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
435 440 445

Thr Asn His Val Ala Ala Gln Thr Ile Val Asn Arg Ile Ala Pro Val
450 455 460

Pro Arg Gly Asn Asn Thr Glu Asn Glu Glu Lys Trp Gly Gly Leu Tyr
465 470 475 480

Val Ala Thr His Ala Glu Val Ala His Gly Tyr Ala Arg Ile Lys Glu
485 490 495

Gly Thr Gly Glu Tyr Gly Leu Pro Thr Arg Ala Glu Arg Asp Ala Arg
500 505 510

Gly Val Met Leu Arg Val Tyr Ile Pro Arg Ala Ser Leu Glu Arg Phe
515 520 525

Tyr Arg Thr Asn Thr Pro Leu Glu Asn Ala Glu Glu His Ile Thr Gln
530 535 540
Val Ile Gly His Ser Leu Pro Leu Arg Asn Glu Ala Phe Thr Gly Pro
545 550 555 560
Glu Ser Ala Gly Gly Glu Asp Thr Val Ile Gly Trp Asp Met Ala Ile
565 570 575
His Ala Val Ala Ile Pro Ser Thr Ile Pro Gly Asn Ala Tyr Glu Glu
580 585 590
Leu Ala Ile Asp Glu Glu Ala Val Ala Lys Glu Gln Ser Ile Ser Thr
595 600 605
Lys Pro Pro Tyr Lys Glu Arg Lys Asp Glu Leu Lys
610 615 620

<210> 148
<211> 18
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 148
Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser
1 5 10 15
Ile Asp

<210> 149
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 149
Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp
35

<210> 150
<211> 38
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌

<400> 150
Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp
35
<210> 151
<211> 37
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 151
Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val
1 5 10 15
Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro
20 25 30
Ser Val Ser Tyr Lys
35
<210> 152
<211> 22
<212> PRT
<213> 霍乱弧菌
<400> 152
Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp
1 5 10 15
His Thr Gly Leu Ala Leu
20
<210> 153
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 153
Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile

20 25 30

Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45

Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60

Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80

Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95

Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110

Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125

Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140

Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160

Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175

Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190

Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205

Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
210 215 220

Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240

Ala Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys
245 250 255

Pro Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala
260 265 270

Leu Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg
275 280 285

Ser Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln
290 295 300

Ala Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser
305 310 315 320

His Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu
325 330 335

Val Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro
340 345 350
Gly Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp
355 360 365
Tyr Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly
370 375 380
Ala Gln Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385 390 395 400
Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met
405 410 415
Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu
420 425 430
Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln
435 440 445
Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser
450 455 460
Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile
465 470 475 480
Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg
485 490 495
Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val
500 505 510
Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly
515 520 525
Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr
530 535 540
Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys
545 550 555 560
Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu
565 570 575
Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly
580 585 590
Phe

<210> 154
<211> 580
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"

<400> 154

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205
Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
210 215 220
Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240
Ala Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys
245 250 255
Pro Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala
260 265 270
Leu Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg
275 280 285

Ser Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln
290 295 300
Ala Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser
305 310 315 320
His Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu
325 330 335
Val Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro
340 345 350
Gly Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp
355 360 365
Tyr Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly
370 375 380
Ala Gln Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385 390 395 400
Gly Ser Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr
405 410 415
Gly Val Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys
420 425 430
Thr His Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp
435 440 445
Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp
450 455 460
Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu
465 470 475 480
Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val
485 490 495
Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn
500 505 510
Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys
515 520 525
His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val
530 535 540
Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met
545 550 555 560
Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met
565 570 575
Lys Ile Arg Asn
580

<210> 155

<211> 460
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 155

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205
Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
210 215 220
Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240
Ala Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys

245 250 255
Pro Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
260 265 270
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser
275 280 285
Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu
290 295 300
Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala Ala Ala Pro Ile Ser Ser His
305 310 315 320
Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg
325 330 335
Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp
340 345 350
Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe His Gly Val Ser Met Ser Glu
355 360 365
Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val
370 375 380
Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro Tyr Met Gln Glu Val Val
385 390 395 400
Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg Leu Ser Thr Cys His Ile Glu
405 410 415
Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr
420 425 430
Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu
435 440 445
Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala Cys Ile
450 455 460

<210> 156
<211> 491
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 156
Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile

20 25 30

Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45

Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60

Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80

Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95

Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110

Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125

Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140

Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160

Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175

Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190

Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205

Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
210 215 220

Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240

Ala Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys
245 250 255

Pro Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Met Arg Ser Ser Lys Asn
260 265 270

Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Thr Val
275 280 285

Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr
290 295 300

Glu Gly His Asn Thr Val Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu
305 310 315 320

Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys
325 330 335

Val Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser
340 345 350
Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly
355 360 365
Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Cys Phe
370 375 380
Ile Tyr Lys Val Lys Phe Ile Gly Val Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro
385 390 395 400
Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu
405 410 415
Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu Ile His Lys Ala Leu Lys
420 425 430
Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val Glu Phe Lys Ser Ile Tyr Met
435 440 445
Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Ser Lys
450 455 460
Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr
465 470 475 480
Glu Arg Thr Glu Gly Arg His His Leu Phe Leu
485 490

<210> 157
<211> 859
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 157
Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15
Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
35 40 45
Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
50 55 60
Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
100 105 110
Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
115 120 125
Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
130 135 140
Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
145 150 155 160
Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
165 170 175
Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
180 185 190
Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
195 200 205
Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
210 215 220
Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
225 230 235 240
Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
245 250 255
Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270
Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285
Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300
Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320
Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335
Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350
Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365
Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380
Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser

385 390 395 400
Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg
405 410 415
Ser Gly Arg Ser Tyr Leu Pro Glu Asn Arg Ala Val Ile Thr Pro Gln
420 425 430
Gly Val Thr Asn Trp Thr Tyr Gln Glu Leu Glu Ala Thr His Gln Ala
435 440 445
Leu Thr Arg Glu Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Asn His
450 455 460
Val Ala Ala Gln Thr Ile Val Asn Arg Ile Ala Pro Val Pro Arg Gly
465 470 475 480
Asn Asn Thr Glu Asn Glu Glu Lys Trp Gly Gly Leu Tyr Val Ala Thr
485 490 495
His Ala Glu Val Ala His Gly Tyr Ala Arg Ile Lys Glu Gly Thr Gly
500 505 510
Glu Tyr Gly Leu Pro Thr Arg Ala Glu Arg Asp Ala Arg Gly Val Met
515 520 525
Leu Arg Val Tyr Ile Pro Arg Ala Ser Leu Glu Arg Phe Tyr Arg Thr
530 535 540
Asn Thr Pro Leu Glu Asn Ala Glu Glu His Ile Thr Gln Val Ile Gly
545 550 555 560
His Ser Leu Pro Leu Arg Asn Glu Ala Phe Thr Gly Pro Glu Ser Ala
565 570 575
Gly Gly Glu Asp Ala Thr Val Ile Gly Trp Asp Met Ala Ile His Ala
580 585 590
Val Ala Ile Pro Ser Thr Ile Pro Gly Asn Ala Tyr Glu Glu Leu Ala
595 600 605
Ile Asp Glu Glu Ala Val Ala Lys Glu Gln Ser Ile Ser Thr Lys Pro
610 615 620
Pro Tyr Lys Glu Arg Lys Asp Glu Leu Lys Met Arg Ser Ser Lys Asn
625 630 635 640
Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Thr Val
645 650 655
Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr
660 665 670
Glu Gly His Asn Thr Val Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu
675 680 685
Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys
690 695 700

Val Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser
705 710 715 720
Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly
725 730 735
Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Cys Phe
740 745 750
Ile Tyr Lys Val Lys Phe Ile Gly Val Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro
755 760 765
Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu
770 775 780
Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu Ile His Lys Ala Leu Lys
785 790 795 800
Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val Glu Phe Lys Ser Ile Tyr Met
805 810 815
Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Ser Lys
820 825 830
Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr
835 840 845
Glu Arg Thr Glu Gly Arg His His Leu Phe Leu
850 855

<210> 158
<211> 340
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 158
Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80

Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp
145 150 155 160
Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr
165 170 175
Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser
180 185 190
Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro
195 200 205
Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu
210 215 220
Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln
225 230 235 240
Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp
245 250 255
Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr
260 265 270
Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe
275 280 285
Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala
290 295 300
Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp
305 310 315 320
Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly
325 330 335
Ser Cys Gly Phe
340

<210> 159
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"

<400> 159

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
165 170 175
Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
180 185 190
Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
195 200 205
Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
210 215 220
Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
225 230 235 240
Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
245 250 255
Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
260 265 270
Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln

275 280 285

Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
290 295 300

Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
305 310 315 320

Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
325 330 335

Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
340 345 350

Gly Ser Cys Gly Phe
355

<210> 160

<211> 393

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"

<400> 160

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15

Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30

Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45

Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60

Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80

Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95

Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110

Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125

Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140

Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp

145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Gly Gly Gly Gly Ser
180 185 190
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu
195 200 205
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
210 215 220
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
225 230 235 240
Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
245 250 255
Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
260 265 270
Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
275 280 285
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
290 295 300
Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
305 310 315 320
Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
325 330 335
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
340 345 350
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
355 360 365
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
370 375 380
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
385 390

<210> 161
<211> 412
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"

<400> 161

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Gly Gly
195 200 205
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Pro Thr
210 215 220
Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg
225 230 235 240
Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr
245 250 255
Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser
260 265 270
Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr
275 280 285
Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile
290 295 300

Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn
305 310 315 320
Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys
325 330 335
Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly
340 345 350
Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp
355 360 365
Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu
370 375 380
Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile
385 390 395 400
Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
405 410

<210> 162
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 162
Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125

Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205
Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
210 215 220
Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240
Ala Gly Thr Pro Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255
Gly Gly Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn
260 265 270
Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr
275 280 285
Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe
290 295 300
Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr
305 310 315 320
Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu
325 330 335
Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe
340 345 350
Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser
355 360 365
Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu
370 375 380
Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys
385 390 395 400
Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu
405 410 415
Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys
420 425 430
Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser

435 440 445

Cys Gly Phe
450

<210> 163
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 163

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205
Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln

210 215 220

Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240
Ala Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Gly Gly Gly Ser
245 250 255
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu
260 265 270
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
275 280 285
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
290 295 300
Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
305 310 315 320
Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
325 330 335
Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
340 345 350
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
355 360 365
Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
370 375 380
Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
385 390 395 400
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
405 410 415
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
420 425 430
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
435 440 445
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
450 455

<210> 164
<211> 472
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"

<400> 164

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175
Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205
Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
210 215 220
Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240
Ala Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys
245 250 255
Pro Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
260 265 270
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser
275 280 285
Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu
290 295 300

Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu
305 310 315 320
Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser
325 330 335
Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser
340 345 350
Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu
355 360 365
Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr
370 375 380
Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu
385 390 395 400
Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr
405 410 415
Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His
420 425 430
Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg
435 440 445
Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg
450 455 460
Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
465 470

<210> 165
<211> 354
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 165
Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile
1 5 10 15
Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala
20 25 30
Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly
35 40 45
Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser
50 55 60

Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile
65 70 75 80
Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp
85 90 95
Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu
100 105 110
Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe
115 120 125
Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val
130 135 140
Ser Tyr Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160
Gly Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala
165 170 175
Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln
180 185 190
Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu
195 200 205
Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro
210 215 220
Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg
225 230 235 240
Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu
245 250 255
Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn
260 265 270
Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met
275 280 285
Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln
290 295 300
Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu
305 310 315 320
Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val
325 330 335
Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys
340 345 350
Gly Phe

<210> 166

<211> 4

<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<400> 166
Ala Ala Pro Phe
1
<210> 167
<211> 3
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<400> 167
Gly Gly Phe
1
<210> 168
<211> 4
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<400> 168
Ala Ala Pro Val
1
<210> 169
<211> 3
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"

<400> 169
Gly Gly Leu
1
<210> 170
<211> 3
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<400> 170
Ala Ala Leu
1
<210> 171
<211> 3
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<400> 171
Phe Val Arg
1
<210> 172
<211> 3
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<400> 172
Val Gly Arg
1
<210> 173
<211> 4
<212> PRT

<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<400> 173
Arg Gln Pro Arg
1
<210> 174
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 任何氨基酸
<400> 174
Tyr Val Ala Asp Xaa
1 5
<210> 175
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(3)
<223> 任何氨基酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 任何氨基酸

<400> 175
Asp Xaa Xaa Asp Xaa
1 5
<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(7)
<223> 任何氨基酸
<220>
<221> SITE
<222> (2)..(7)
<223> /注解="该区域可包含0、2、4或6个残基"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> 任何氨基酸
<400> 176
Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5
<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(7)
<223> 任何氨基酸
<220>

<221> SITE
<222> (2)..(7)
<223> /注解="该区域可包含0、2、4或6个残基"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> 任何氨基酸
<400> 177
Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa
1 5
<210> 178
<211> 6
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> 任何氨基酸
<400> 178
Glu Arg Thr Lys Arg Xaa
1 5
<210> 179
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 任何氨基酸
<400> 179
Arg Val Arg Arg Xaa

1 5

<210> 180

<211> 5

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> 来源

<223> /注解="对未知的描述：肽酶裂解序列"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> 任何氨基酸

<400> 180

Arg Val Arg Arg Xaa

1 5

<210> 181

<211> 6

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> 来源

<223> /注解="对未知的描述：肽酶裂解序列"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> 任何氨基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> 任何氨基酸

<400> 181

Pro Xaa Trp Val Pro Xaa

1 5

<210> 182

<211> 4

<212> PRT

<213> 未知

<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 任何氨基酸
<400> 182
Trp Val Ala Xaa
1
<210> 183
<211> 4
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 任何氨基酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(4)
<223> 任何氨基酸
<400> 183
Xaa Phe Xaa Xaa
1
<210> 184
<211> 4
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<220>

<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 任何氨基酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(4)
<223> 任何氨基酸
<400> 184
Xaa Tyr Xaa Xaa
1
<210> 185
<211> 4
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 任何氨基酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(4)
<223> 任何氨基酸
<400> 185
Xaa Trp Xaa Xaa
1
<210> 186
<211> 12
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
肽酶裂解序列"
<220>
<221> 变体

<222> (10)..(10)
<223> /取代="Ala"或"Pro"
<220>
<221> 变体
<222> (12)..(12)
<223> /取代="Pro"或"Ala"
<220>
<221> 位点
<222> (1)..(12)
<223> /注解="序列中所给出的变体残基相对于注释中的那些对变体位置没有偏好"
<400> 186
Asp Arg Tyr Ile Pro Phe His Leu Leu Val Tyr Ser
1 5 10
<210> 187
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 187
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr
1 5 10 15
<210> 188
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 188
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Leu Arg Gln Pro Arg
1 5 10 15
<210> 189
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 189
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Lys Lys Val Glu Arg Phe Arg Tyr
1 5 10 15
<210> 190
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 190
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Leu Met Thr Pro Arg
1 5 10 15
<210> 191
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 191
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Lys Ala Gly Ser Phe Ser Glu Gly
1 5 10 15
<210> 192
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 192
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Lys Ala Gly Ser Ala Ala Pro Phe

1 5 10 15

<210> 193

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 193

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser

1 5 10 15

<210> 194

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 194

Val Ser Trp Lys Thr Trp Phe Pro Asn Leu Ala Val

1 5 10

<210> 195

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 195

Tyr Ser Pro Phe His Lys Trp Phe Pro Ser Met His

1 5 10

<210> 196

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 196
Ile Pro Gln Val Trp Arg Asp Trp Phe Lys Leu Pro
1 5 10
<210> 197
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 197
Phe Pro Ala Trp Phe Thr Lys Leu Tyr Pro Arg Thr
1 5 10
<210> 198
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 198
Gln Ile Asn Thr Ala Lys Trp Trp Lys Thr His Phe
1 5 10
<210> 199
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 199
Asp Ala Ser Lys Ala Leu Arg Ser Ser Gly Met Pro
1 5 10

<210> 200
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 200
Trp Lys Thr Trp Phe Pro
1 5
<210> 201
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 201
Ser Gly Gly Gly Gly Trp Lys Thr Trp Phe Pro Arg Gly Leu Thr
1 5 10 15
<210> 202
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 202
Ser Gly Gly Gly Gly Trp Lys Thr Trp Phe Pro Arg Gln Pro Arg
1 5 10 15
<210> 203
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 203
Ser Gly Gly Gly Gly Trp Lys Thr Trp Phe Pro Arg Phe Arg Tyr
1 5 10 15
<210> 204
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 204
Ser Gly Gly Gly Gly Trp Lys Thr Trp Phe Pro Met Thr Pro Arg
1 5 10 15
<210> 205
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 205
Ser Gly Gly Gly Gly Trp Lys Thr Trp Phe Pro Phe Ser Glu Gly
1 5 10 15
<210> 206
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 206
Ser Gly Gly Gly Gly Trp Lys Thr Trp Phe Pro Ala Ala Pro Phe
1 5 10 15
<210> 207

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 207
Gly Thr Gly Gly Ser
1 5
<210> 208
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 208
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 209
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<400> 209
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 210
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的

肽″
<400> 210
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 211
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解=″人工序列的描述:合成的
肽″
<400> 211
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5
<210> 212
<211> 50
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解=″人工序列的描述:合成的
多肽″
<220>
<221> SITE
<222> (1)..(50)
<223> /注解=″该序列可包含1-10个'Gly Gly Gly Gly Ser'
重复单元″
<400> 212
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser
50
<210> 213
<211> 20

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
肽"
<220>
<221> SITE
<222> (1)..(20)
<223> /注解="该序列可包含1-10个'Gly Ser'
重复单元"
<400> 213
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15
Gly Ser Gly Ser
20
<210> 214
<211> 191
<212> PRT
<213> 智人
<400> 214
Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
1 5 10 15
Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
20 25 30
Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
35 40 45
Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
50 55 60
Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
65 70 75 80
Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val
85 90 95
Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
100 105 110
Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
115 120 125
Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
130 135 140

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
145 150 155 160
Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
165 170 175
Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
180 185 190

<210> 215
<211> 87
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
GPL-1拮抗肽"
<400> 215
Met Lys Ile Ile Leu Trp Leu Cys Val Phe Gly Leu Phe Leu Ala Thr
1 5 10 15
Leu Phe Pro Ile Ser Trp Gln Met Pro Val Glu Ser Gly Leu Ser Ser
20 25 30
Glu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Lys Ile Lys Arg His
35 40 45
Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
50 55 60
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser
65 70 75 80
Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly
85

<210> 216
<211> 110
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
胰岛素肽"
<400> 216
Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15
Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly

20 25 30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
50 55 60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
65 70 75 80

Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
85 90 95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
100 105 110

<210> 217

<211> 178

<212> PRT

<213> 智人

<400> 217

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val
1 5 10 15

Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His
20 25 30

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe
35 40 45

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu
50 55 60

Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
65 70 75 80

Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
85 90 95

Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu
100 105 110

Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg
115 120 125

Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
130 135 140

Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
145 150 155 160

Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile
165 170 175

Arg Asn

<210> 218
<211> 179
<212> PRT
<213> 智人
<400> 218

Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu
1 5 10 15
Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala
20 25 30
Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln
35 40 45
Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser
50 55 60
Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe
65 70 75 80
His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu
85 90 95
Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln
100 105 110
Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg
115 120 125
Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn
130 135 140
Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu
145 150 155 160
Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn
165 170 175
Ala Cys Ile

<210> 219
<211> 71
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
ExtB多肽"
<400> 219

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Ser Thr Gln Ser Asn Lys Lys Asp Leu
20 25 30
Cys Glu His Tyr Arg Gln Ile Ala Lys Glu Ser Cys Lys Lys Gly Phe
35 40 45
Leu Gly Val Arg Asp Gly Thr Ala Gly Ala Cys Phe Gly Ala Gln Ile
50 55 60
Met Val Ala Ala Lys Gly Cys
65 70

<210> 220
<211> 225
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /注解="对未知的描述：
红色荧光蛋白(RFP)序列"
<400> 220

Met Arg Ser Ser Lys Asn Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val
1 5 10 15
Arg Met Glu Gly Thr Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu
20 25 30
Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Asn Thr Val Lys Leu Lys Val
35 40 45
Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln
50 55 60
Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Val Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro
65 70 75 80
Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val
85 90 95
Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser
100 105 110
Leu Gln Asp Gly Cys Phe Ile Tyr Lys Val Lys Phe Ile Gly Val Asn
115 120 125
Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu
130 135 140
Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu
145 150 155 160
Ile His Lys Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val Glu
165 170 175

Phe Lys Ser Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Tyr
180 185 190
Tyr Tyr Val Asp Ser Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr
195 200 205
Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Thr Glu Gly Arg His His Leu Phe
210 215 220
Leu
225

<210> 221
<211> 281
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述:合成的
多肽"
<400> 221

Met Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys
1 5 10 15
Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile
20 25 30
Pro Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr
35 40 45
Ile Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser
50 55 60
Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr
65 70 75 80
Val Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr
85 90 95
Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe
100 105 110
Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
115 120 125
Lys Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
130 135 140
Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
145 150 155 160
Lys Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn
165 170 175

Ile Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu
180 185 190
Gly Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu
195 200 205
Cys Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
210 215 220
Asn Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val
225 230 235 240
Ala Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys
245 250 255
Pro Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
260 265 270
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
275 280

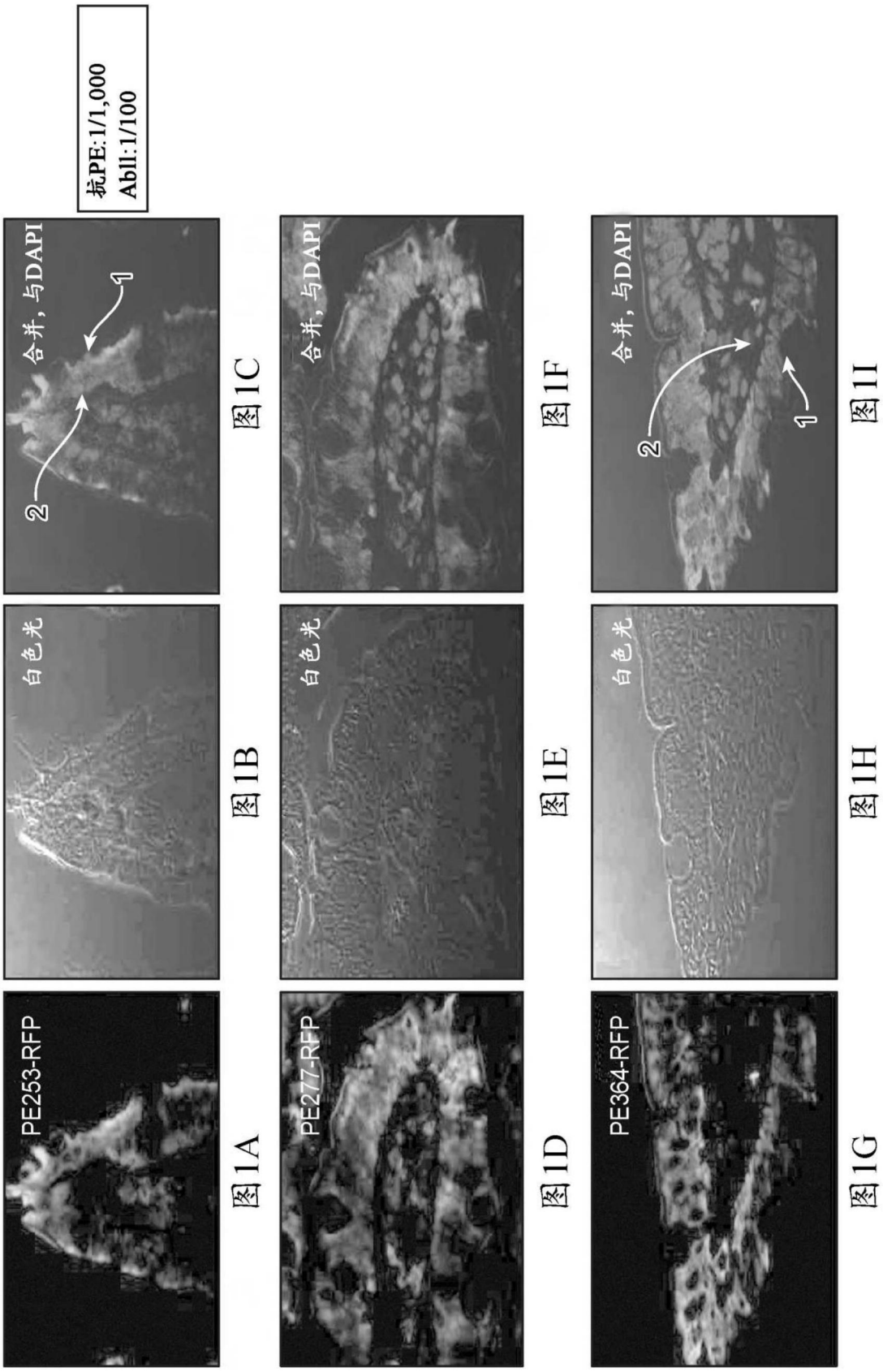

抗PE:1/1,000
Abll:1/100
PE253-RFP
白色光
合并，与DAPI
1
2
图1A
图1B
图1C
PE277-RFP
白色光
合并，与DAPI
图1D
图1E
图1F
PE364-RFP
白色光
合并，与DAPI
1
2
图1G
图1H
图1I

图1

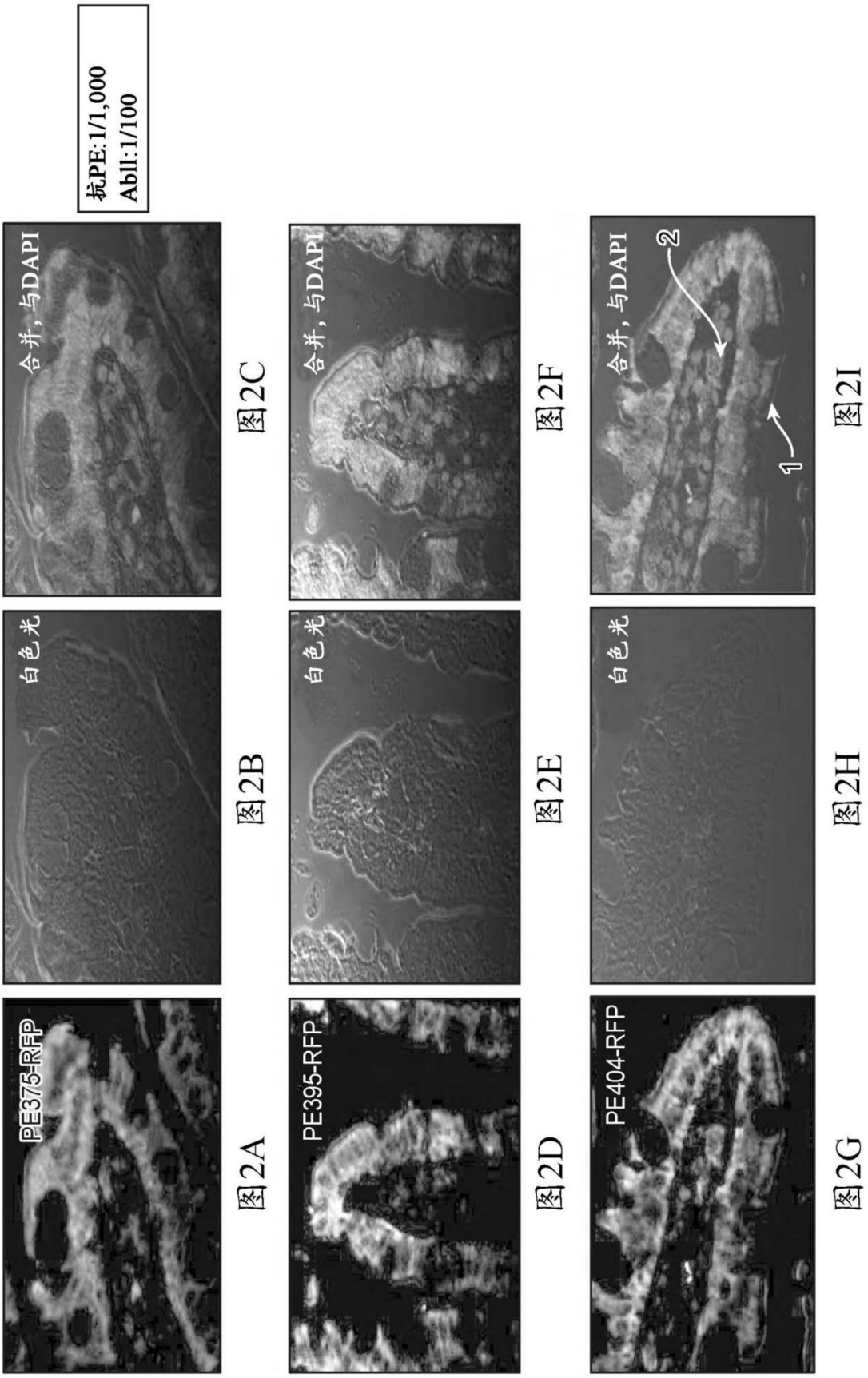


图2A 图2B 图2C 图2D 图2E 图2F 图2G 图2H 图2I

图2

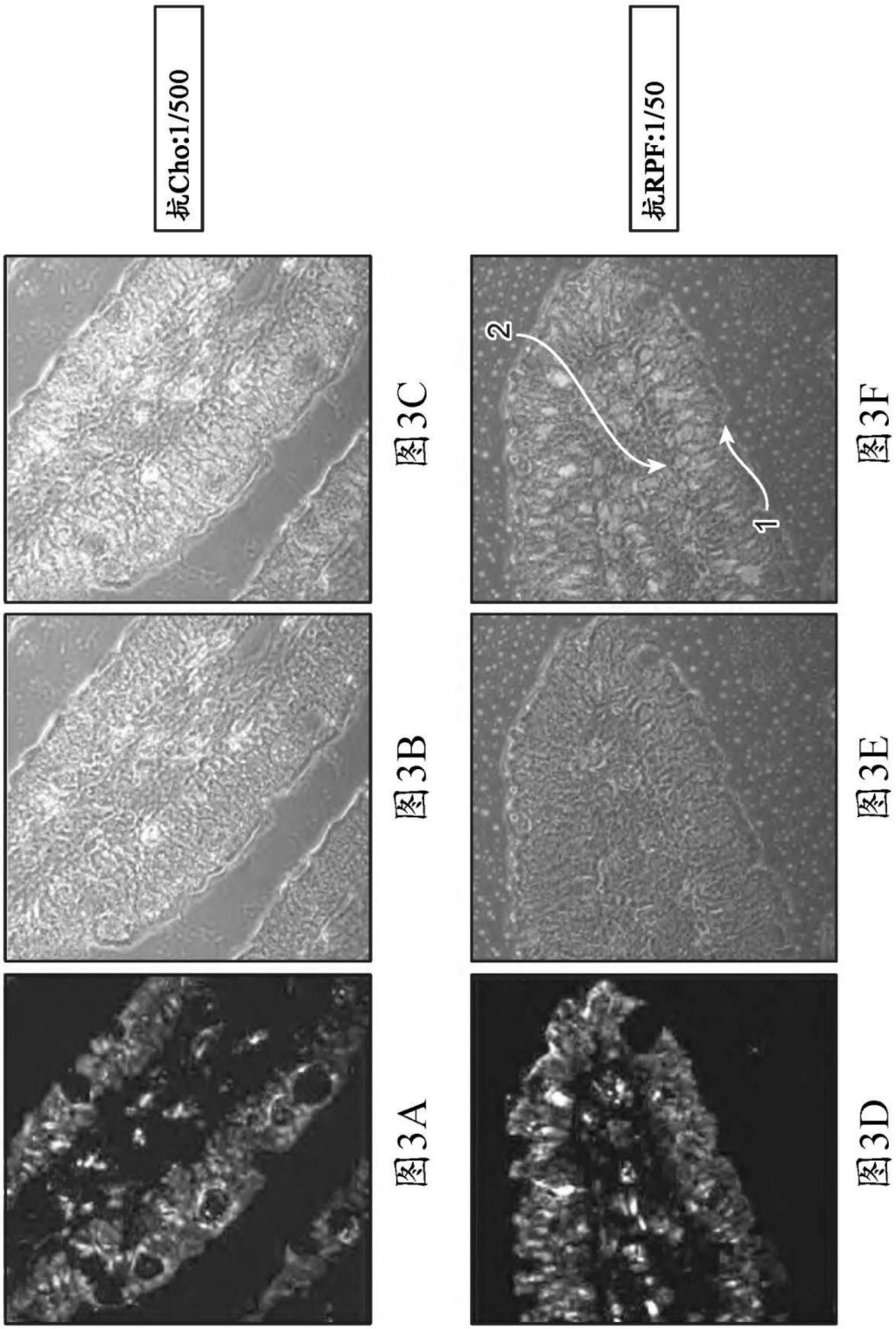


图3

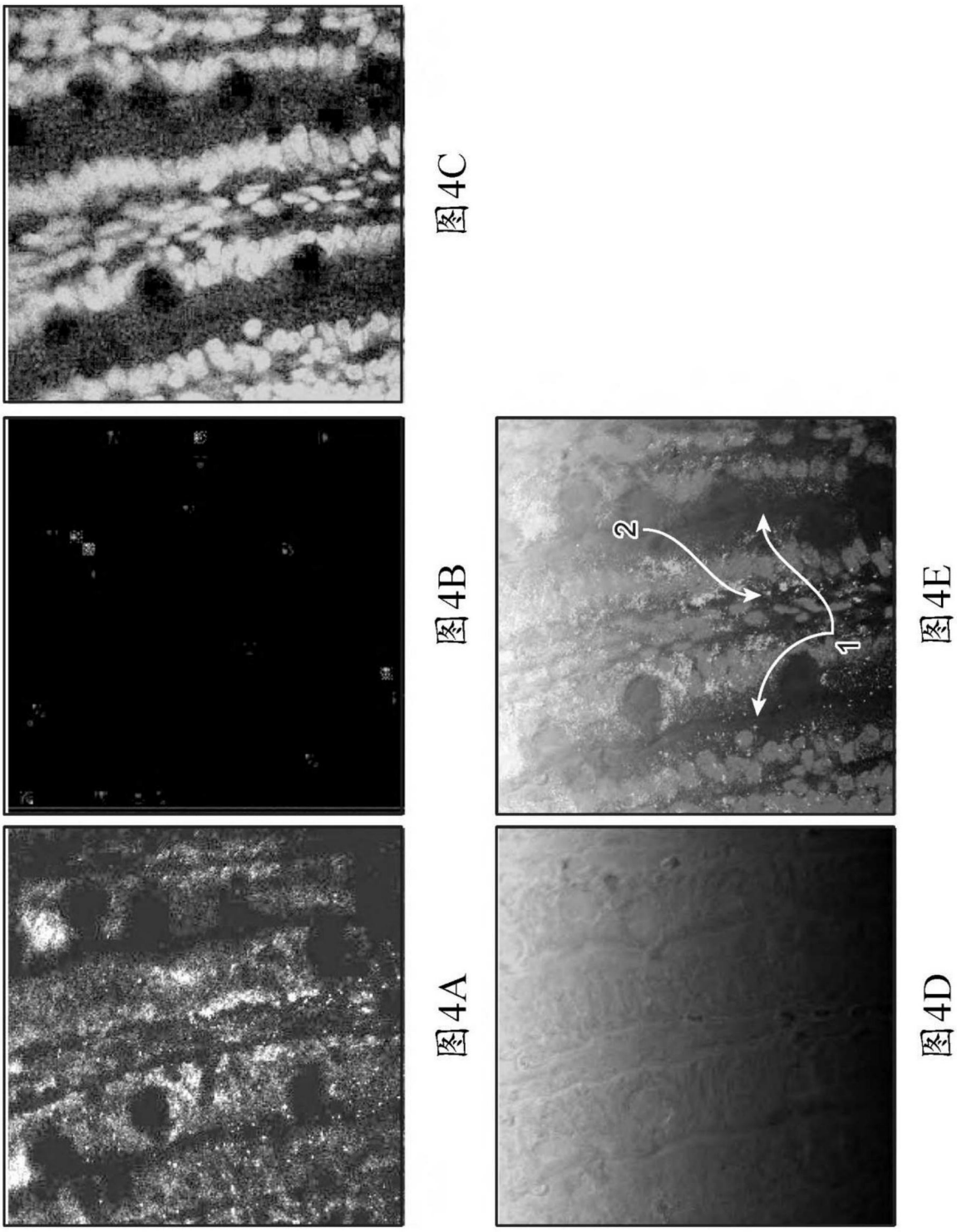


图4

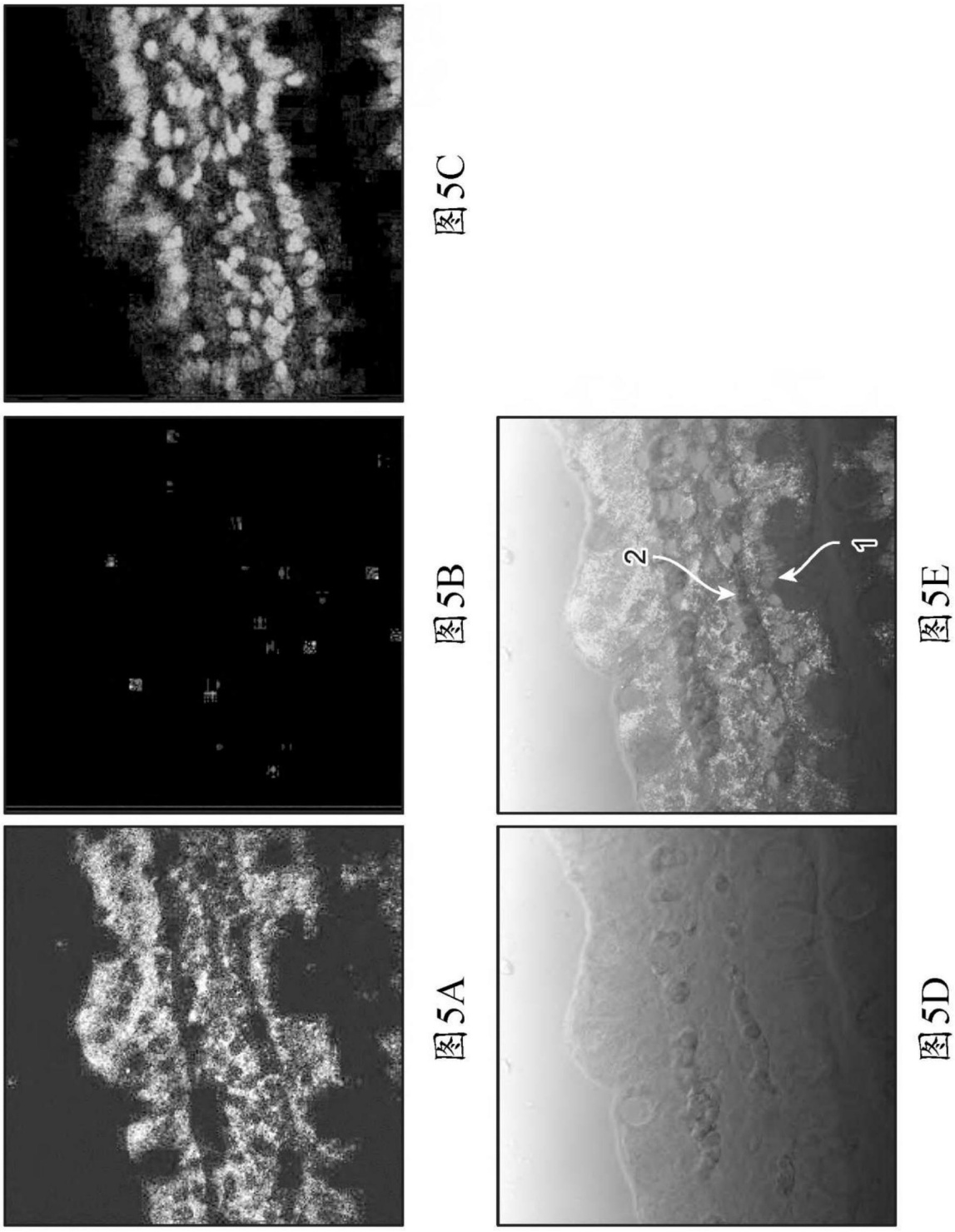


图5

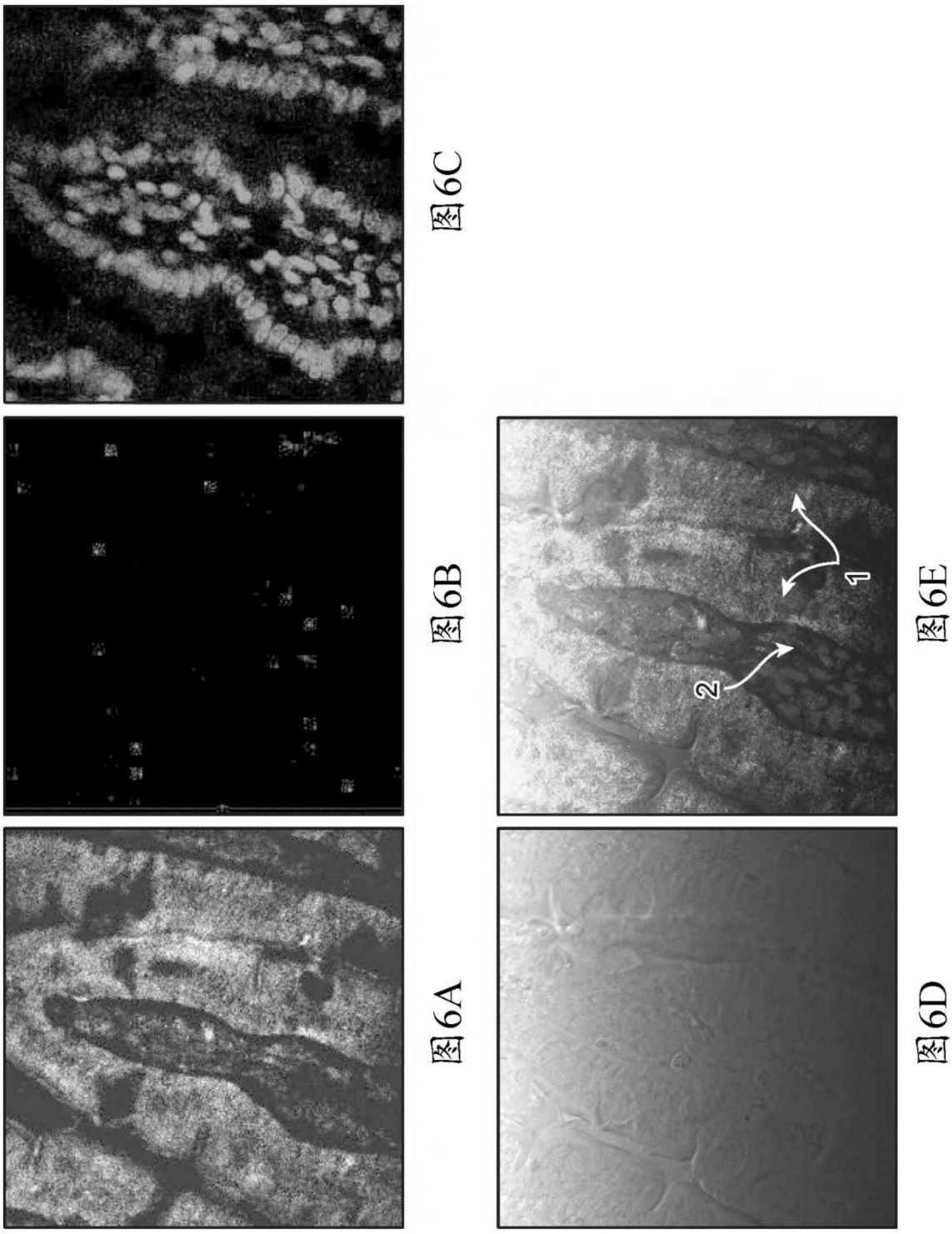


图6

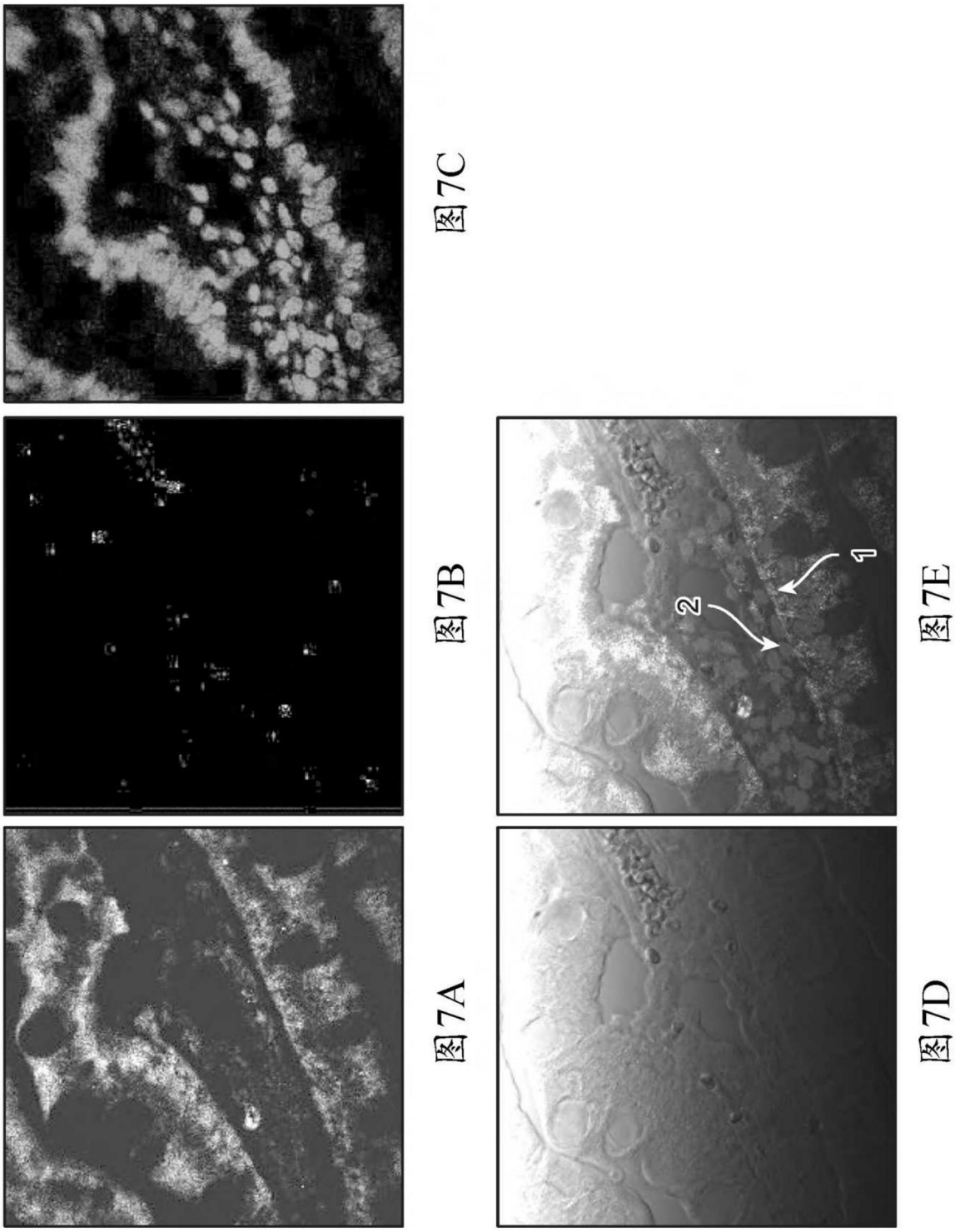


图7

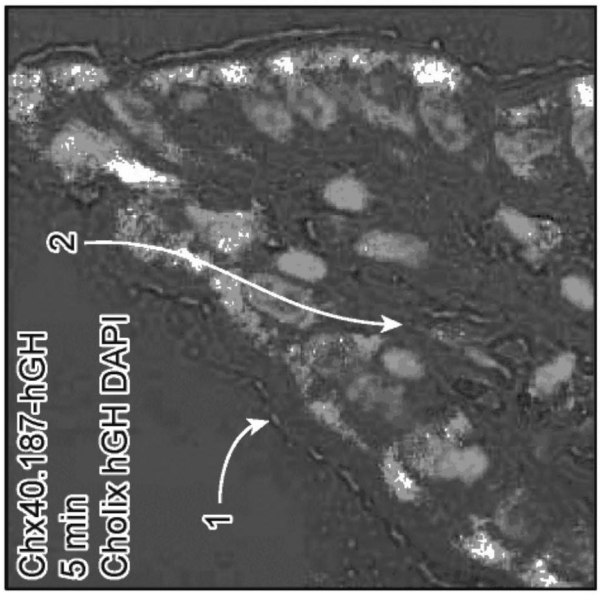

Chx40.187-hGH
5 min
Cholix hGH DAPI
2
1

图8A

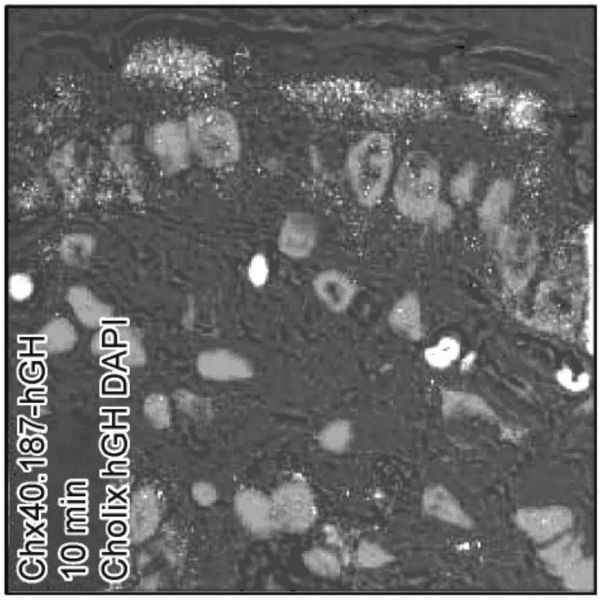

Chx40.187-hGH
10 min
Cholix hGH DAPI

图8B

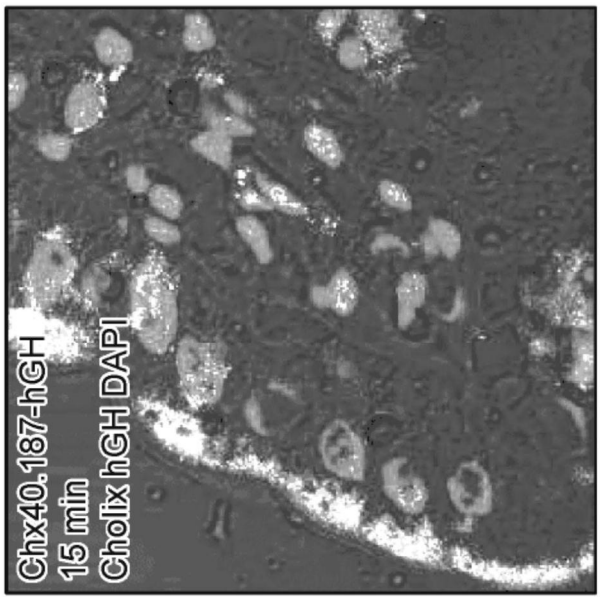

Chx40.187-hGH
15 min
Cholix hGH DAPI

图8C

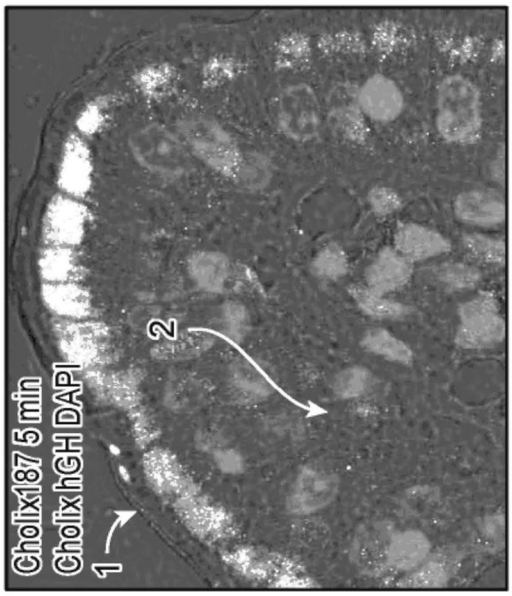

Cholix187 5 min
Cholix hGH DAPI
1
2

图9A

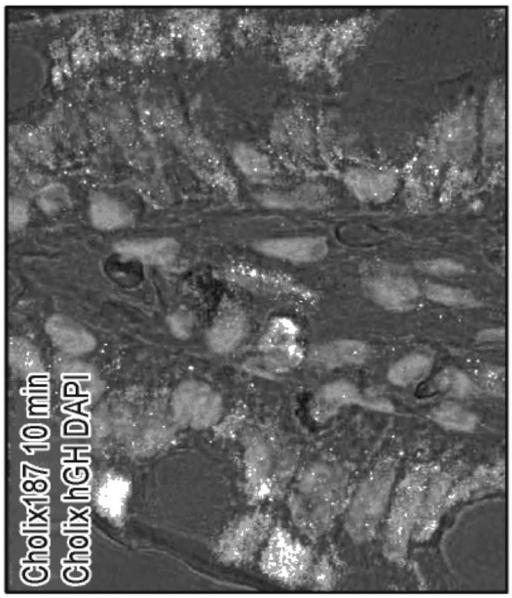

Cholix187 10 min
Cholix hGH DAPI

图9B

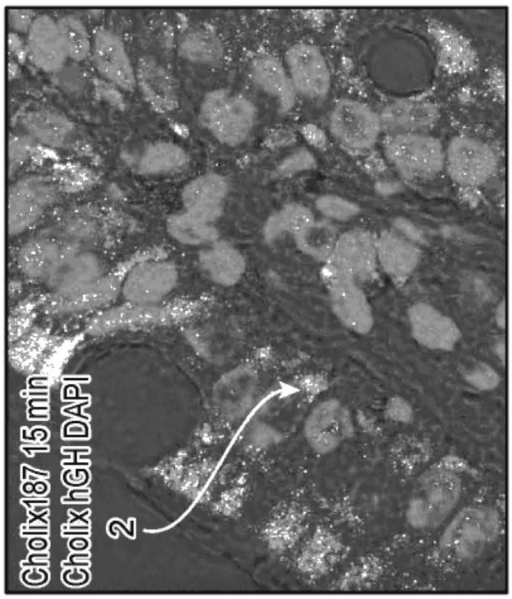

Cholix187 15 min
Cholix hGH DAPI
2

图9C

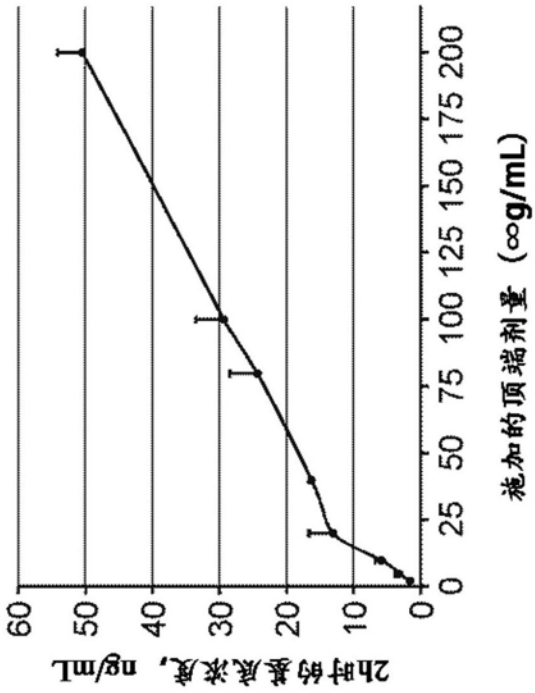

施加的顶端剂量（∞g/mL）
0
25
50
75
100
125
150
175
200
2h时的基质浓度，ng/mL
0
10
20
30
40
50
60

图10A

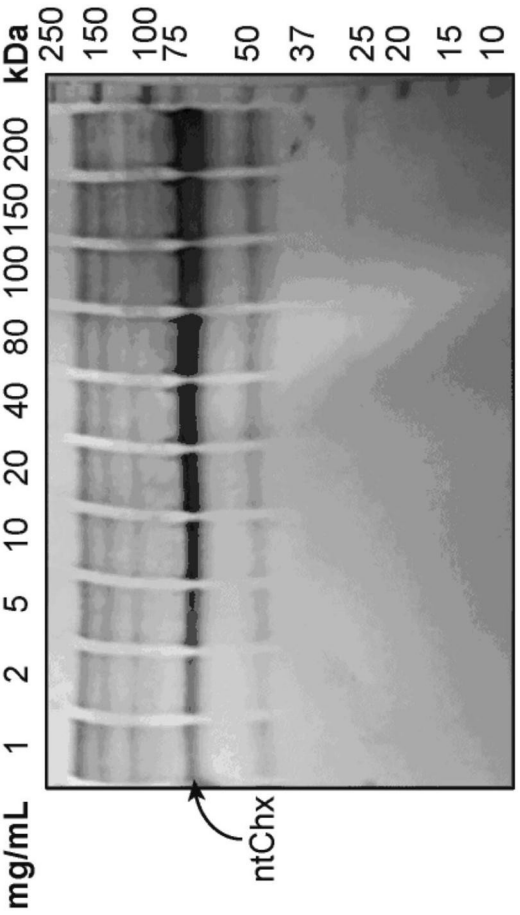

kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
mg/mL
1
2
5
10
20
40
80
100
150
200
ntChx

图10B

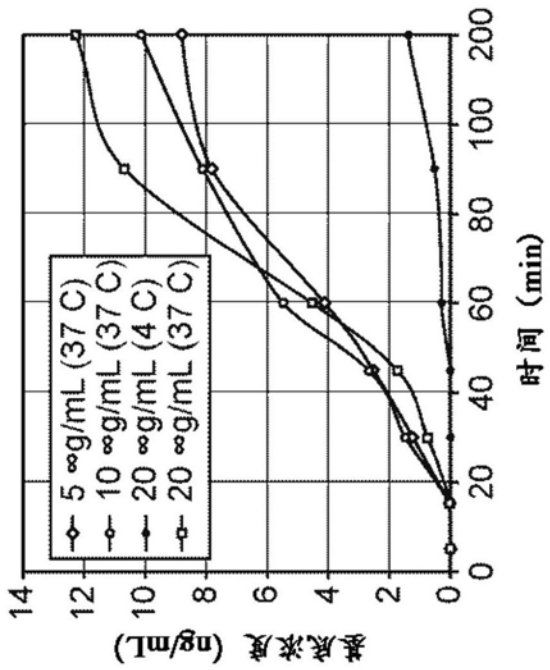

5 ∞g/mL (37 C)
10 ∞g/mL (37 C)
20 ∞g/mL (4 C)
20 ∞g/mL (37 C)
0
20
40
60
80
100
200
时间（min）
0
2
4
6
8
10
12
14
(ng/mL)

图10C

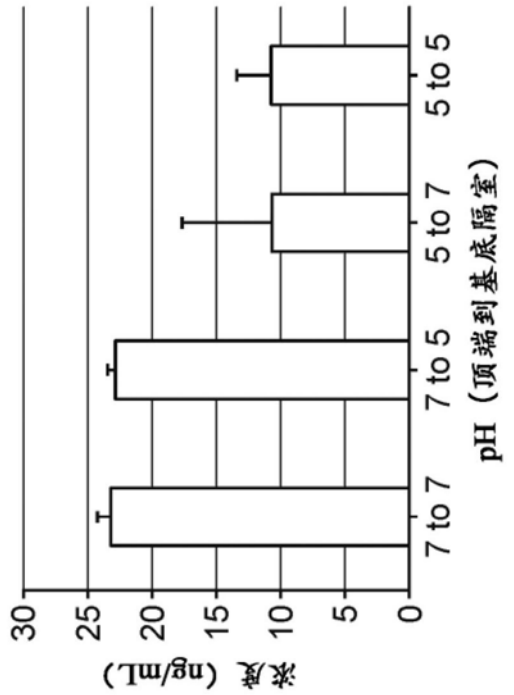

30
25
20
15
10
5
0
(ng/mL)
7 to 7
7 to 5
5 to 7
5 to 5
pH（顶端到基底隔室）

图11

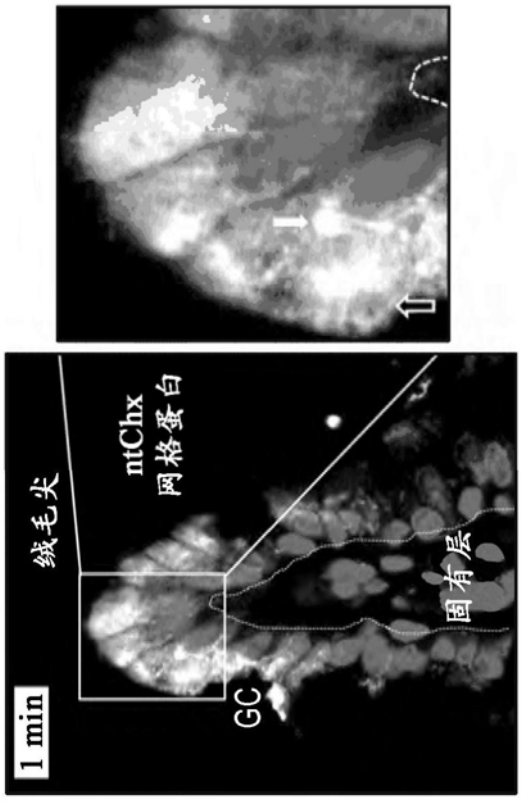

1 min
绒毛尖
ntChx
网格蛋白
GC
固有层

图12A

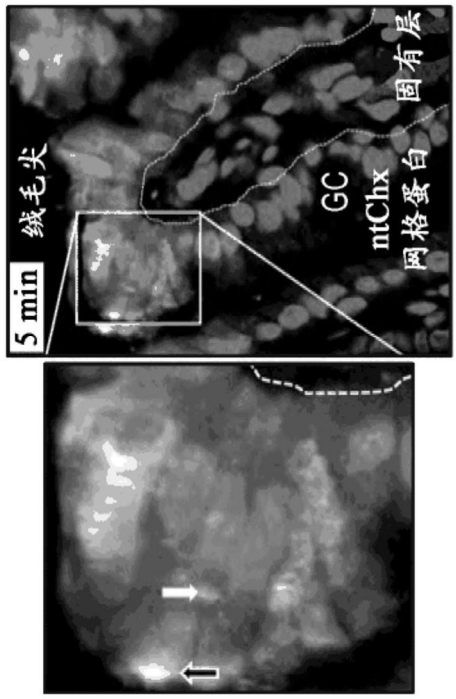


图12B

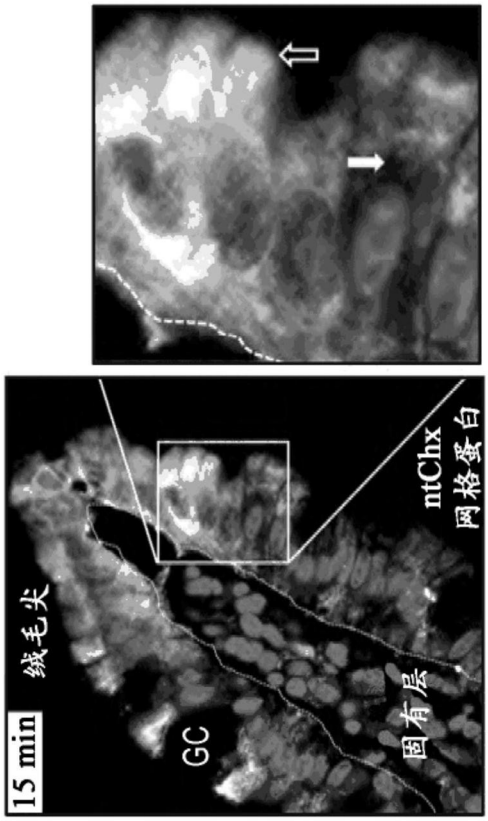


图12C

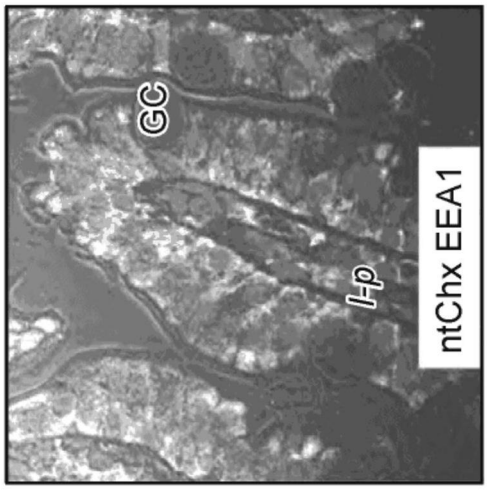


图13A

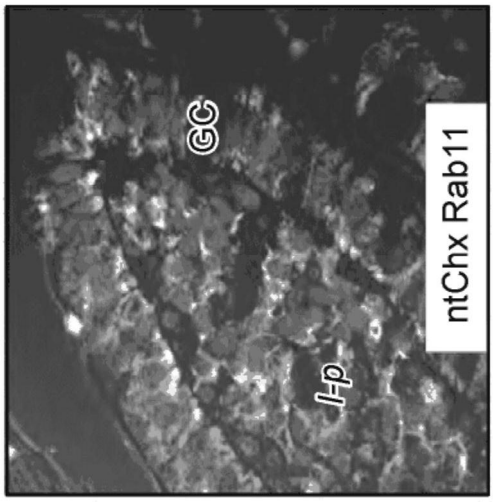


图13B

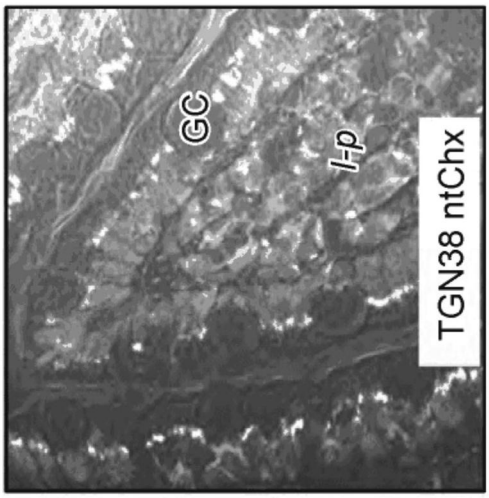


图13C

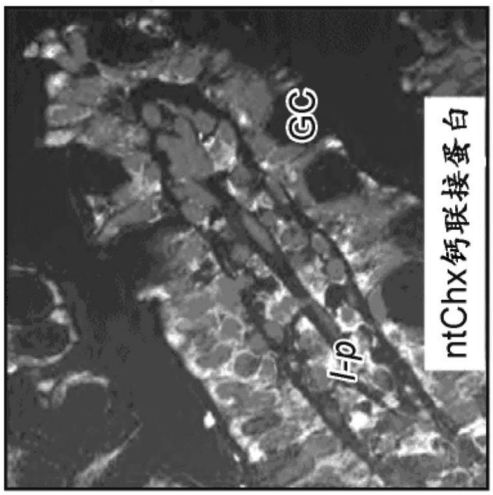


图13D

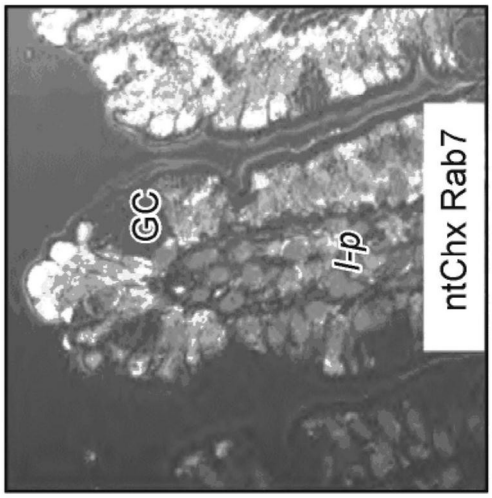


图13E

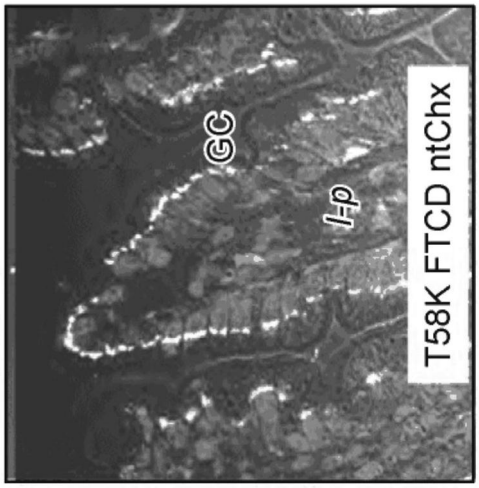


图13F

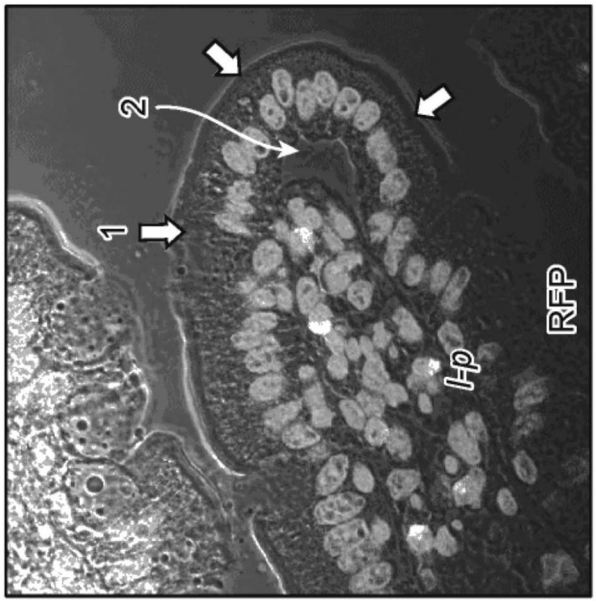


图14A

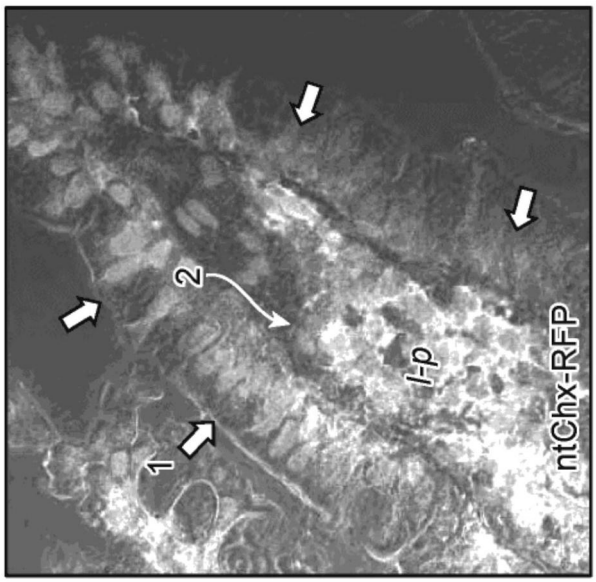


图14B

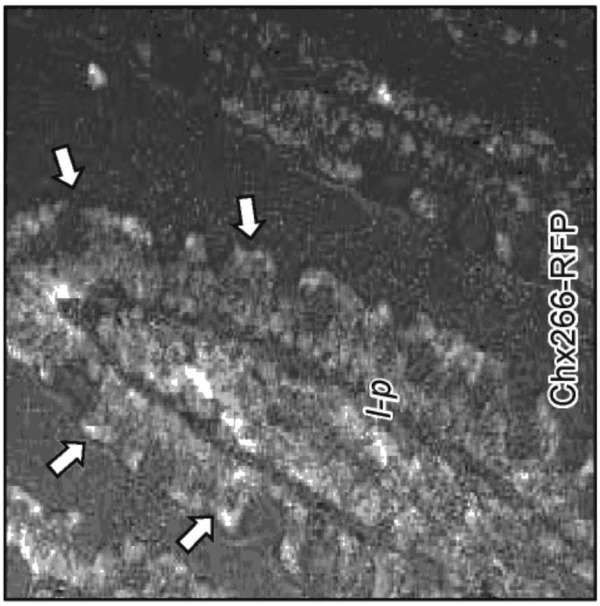


图14C

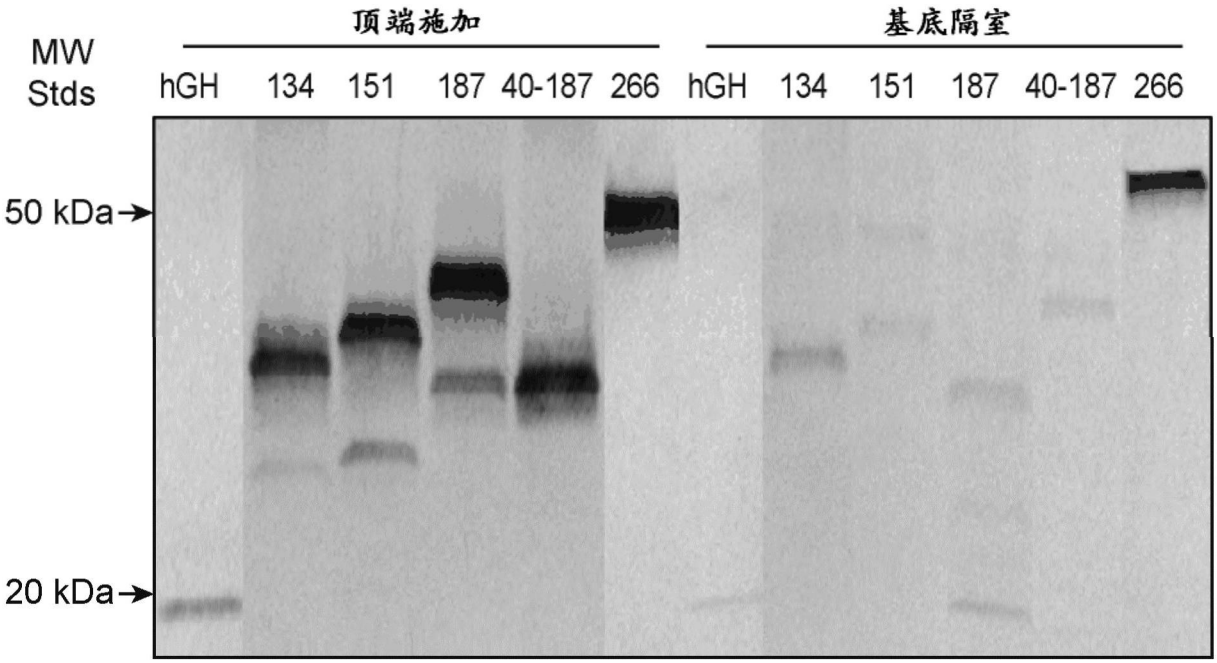


图 15A

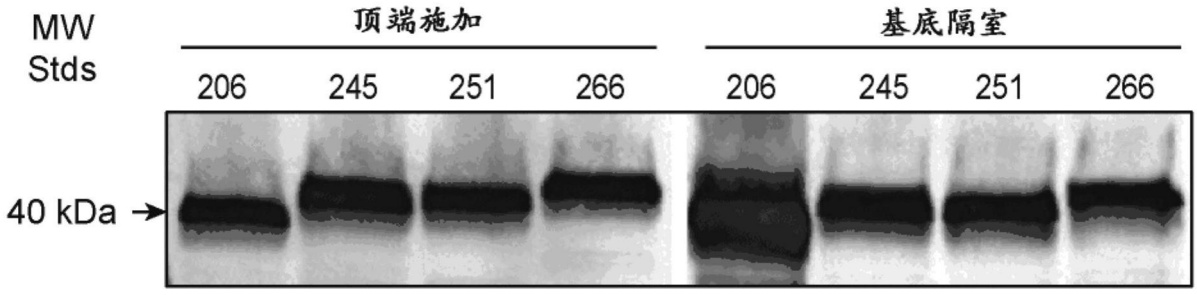


图 15B

图15

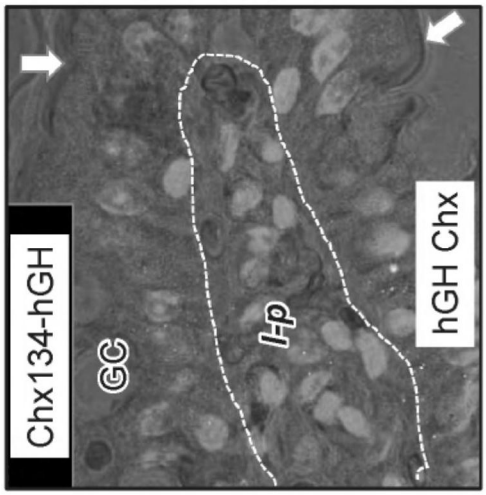


图16A

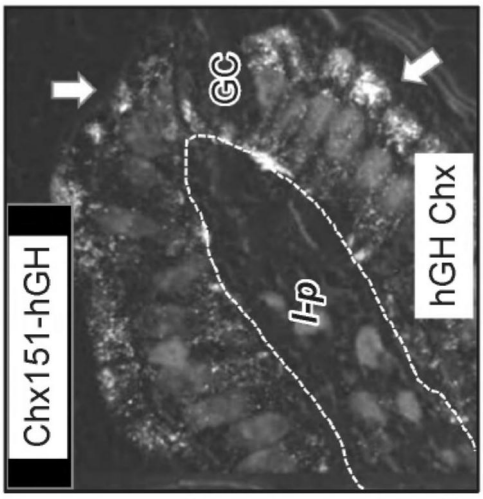


图16B

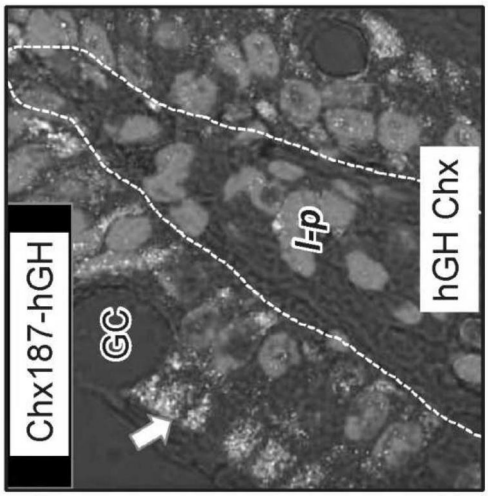


图16C

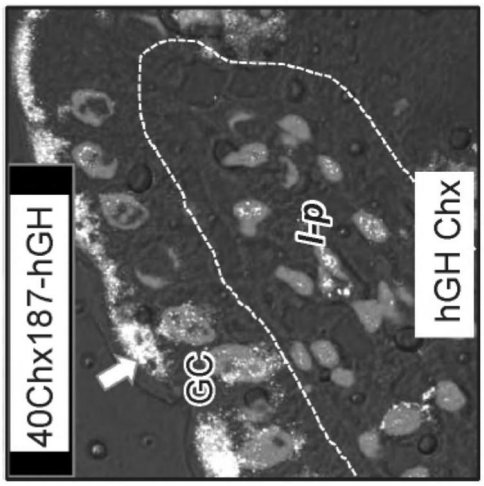


图16D

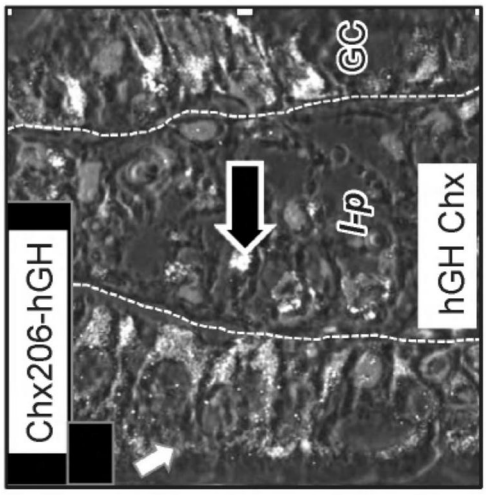


图16E

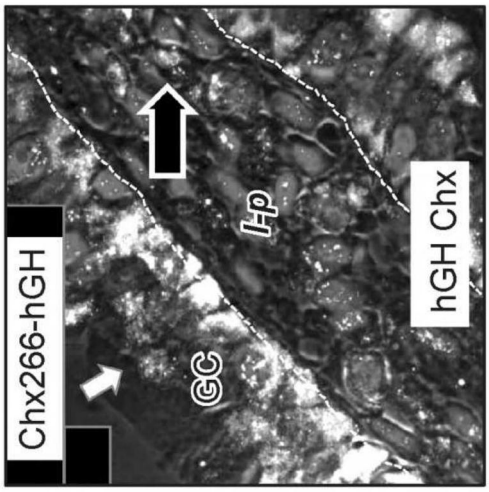


图16F

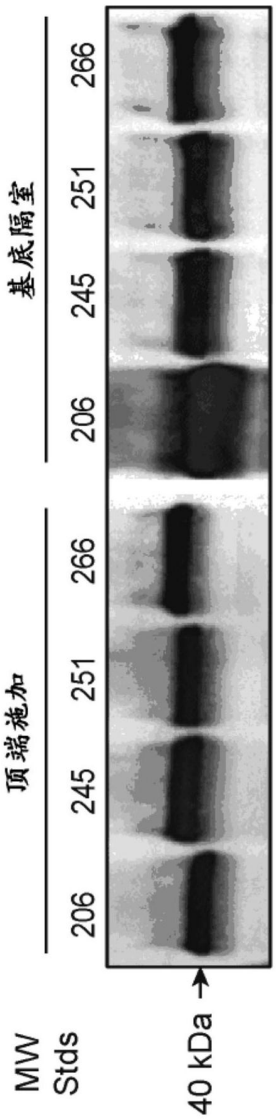


图 17A

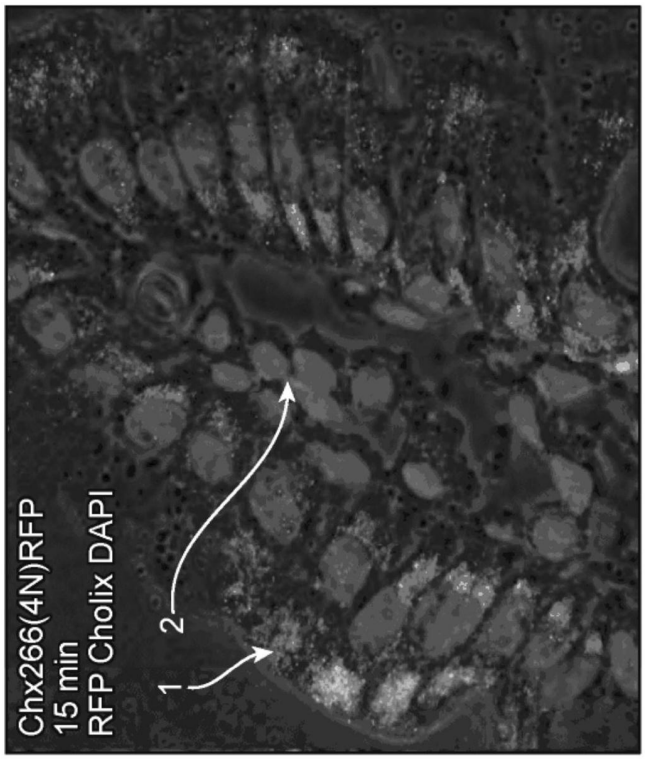


图 17C

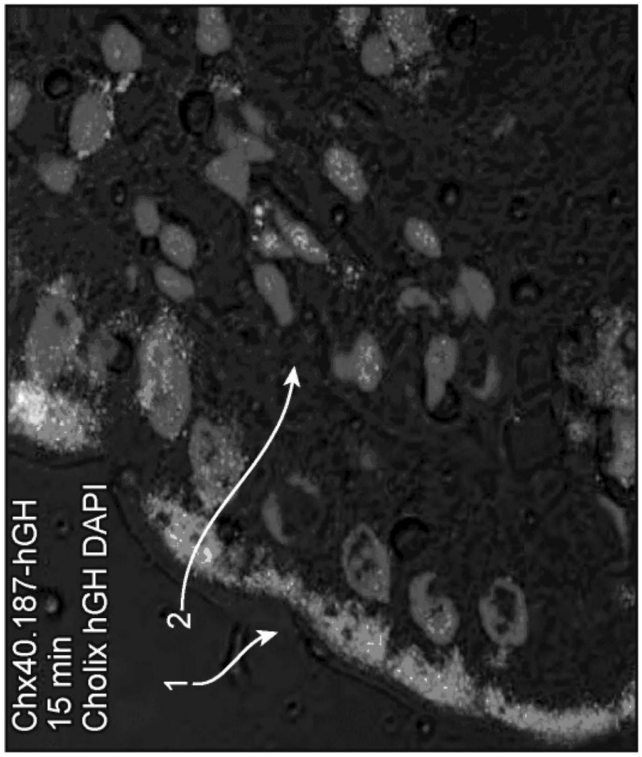


图 17B

图17

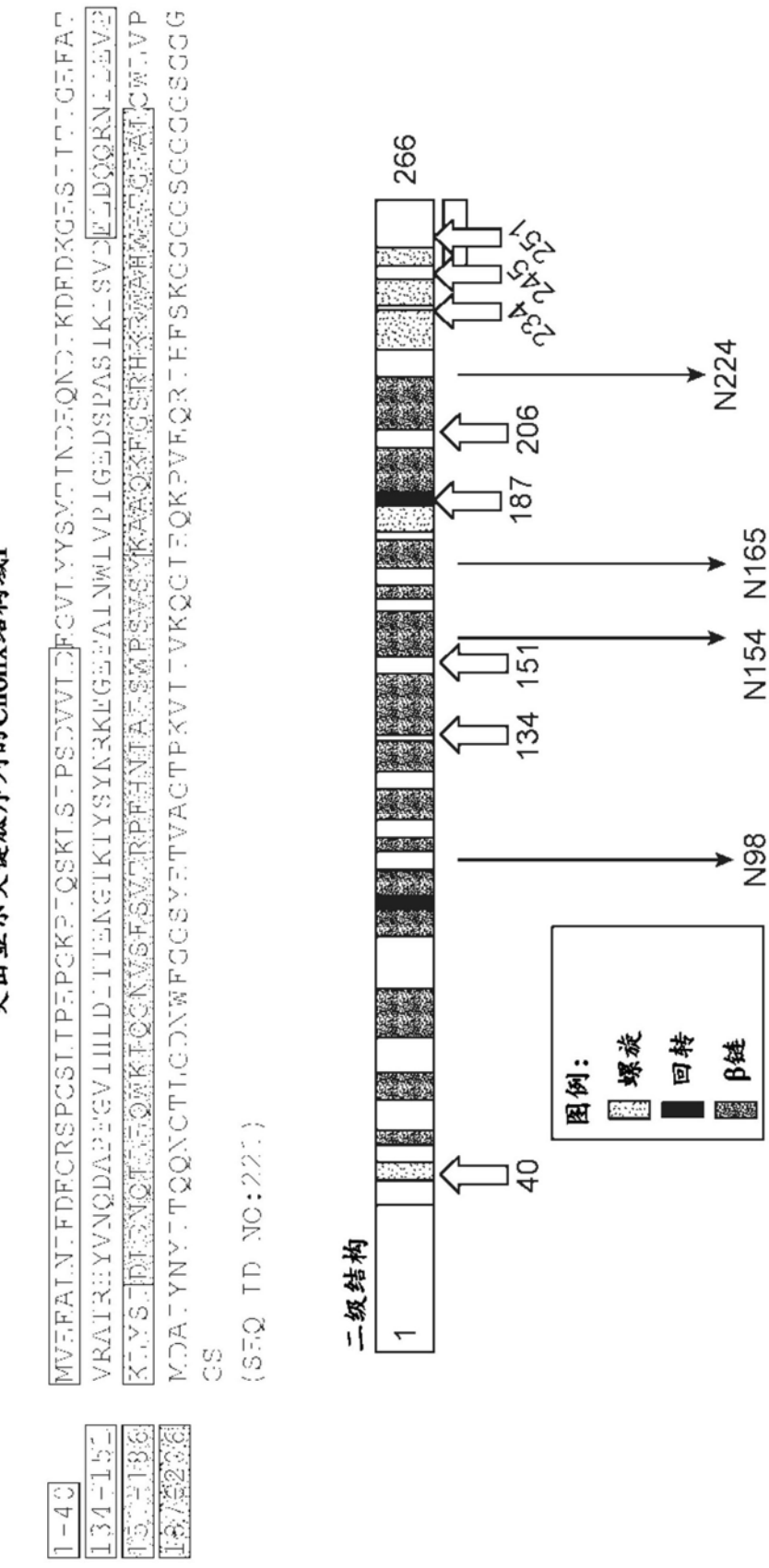

突出显示关键肽序列的Cholix结构域I
1-40
134-151
187-206
MVEFAINTFDFCRSPCSITPEPCKPTQSKTSTPSDVVLDPGVTVYSVTTNDEQNDTKDFDKGESTTCEFAT
VRAIREEYVNQDAPEGVLLLDTTENGTKTYSYNKKEGEEATNWLVPTGEDSPASTKTSVDEDQQRNEEVP
KTVSTDPSNQTEEQWKTQGNVSFSVPEPFHNTATSWPSVSVPKAQQAFQSRHKQMATKICMTVP
MDATYNYTTQQNCTLGDNWFGCSVETVACTPKVTTVKQGTPKVTEQRTHFSKGGGSGGG
GS
(SEQ ID NO:227)
二级结构
1
40
N98
134
151
N154
N165
187
206
N224
266
图例:
螺旋
回转
β链

图18

具有标记潜在糖基化位点的连接物$(G_4S)_3$的Cholix结构域I

N = 潜在糖基化的位点

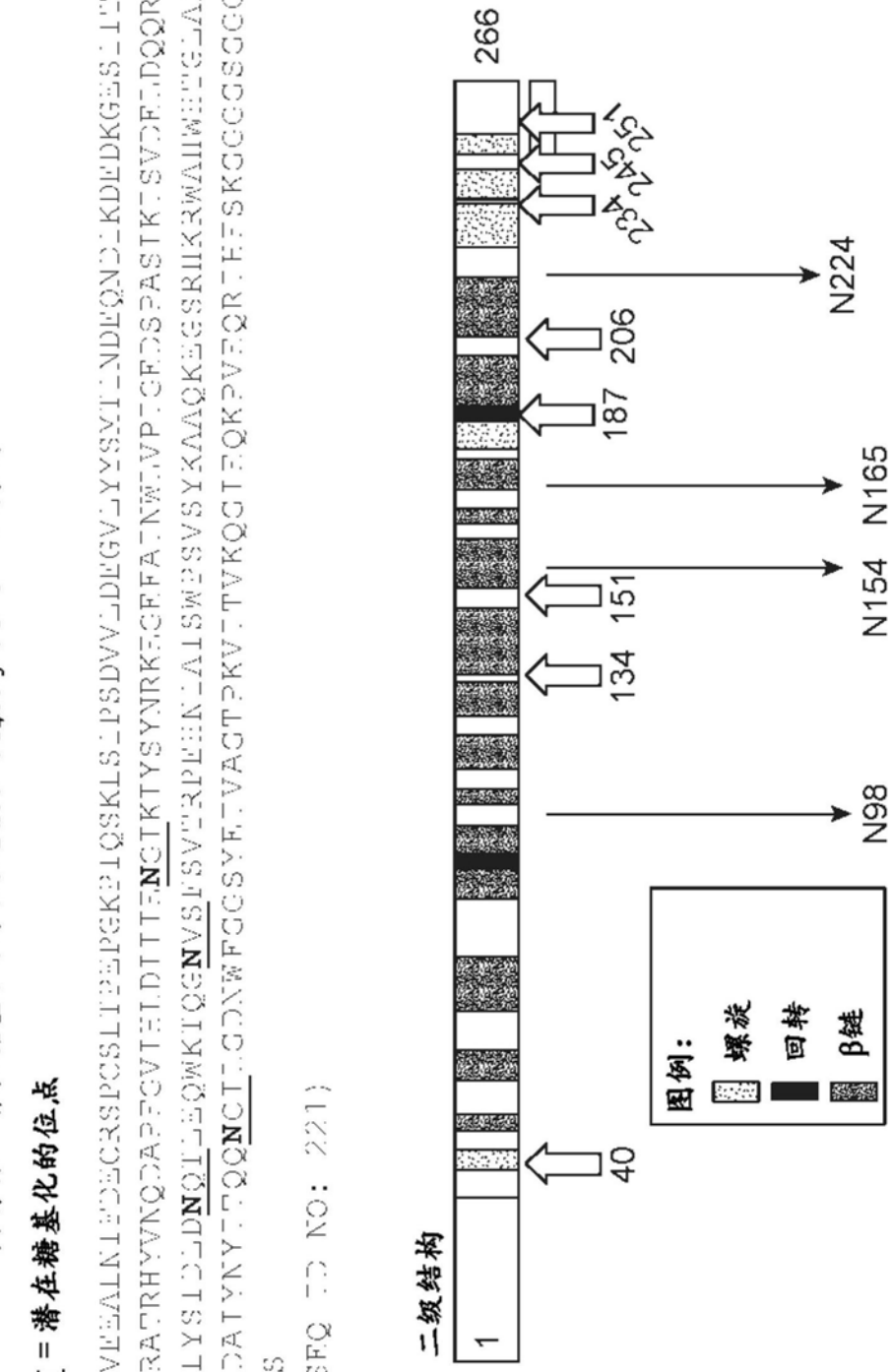


图19



图 20C

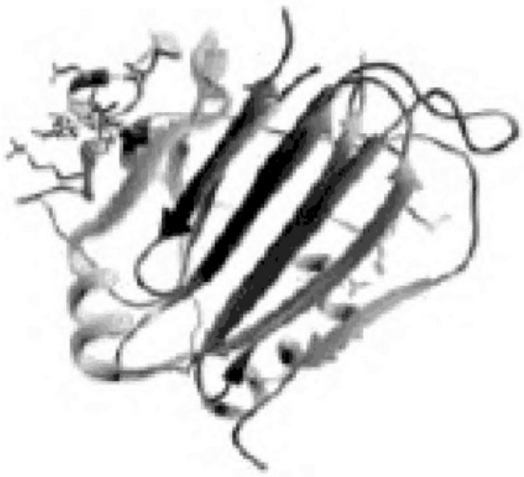


图 20B

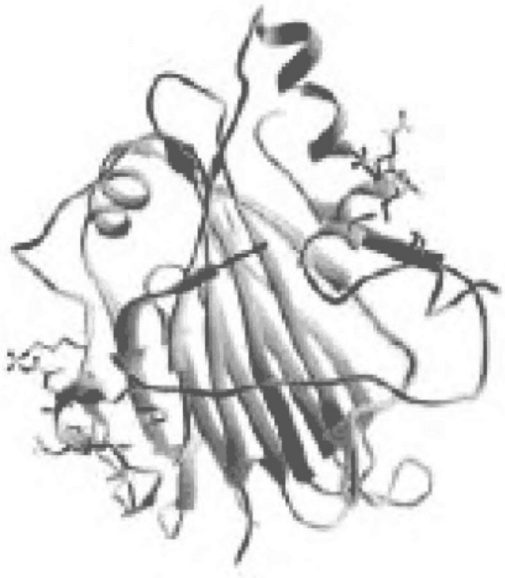


图 20A

图20

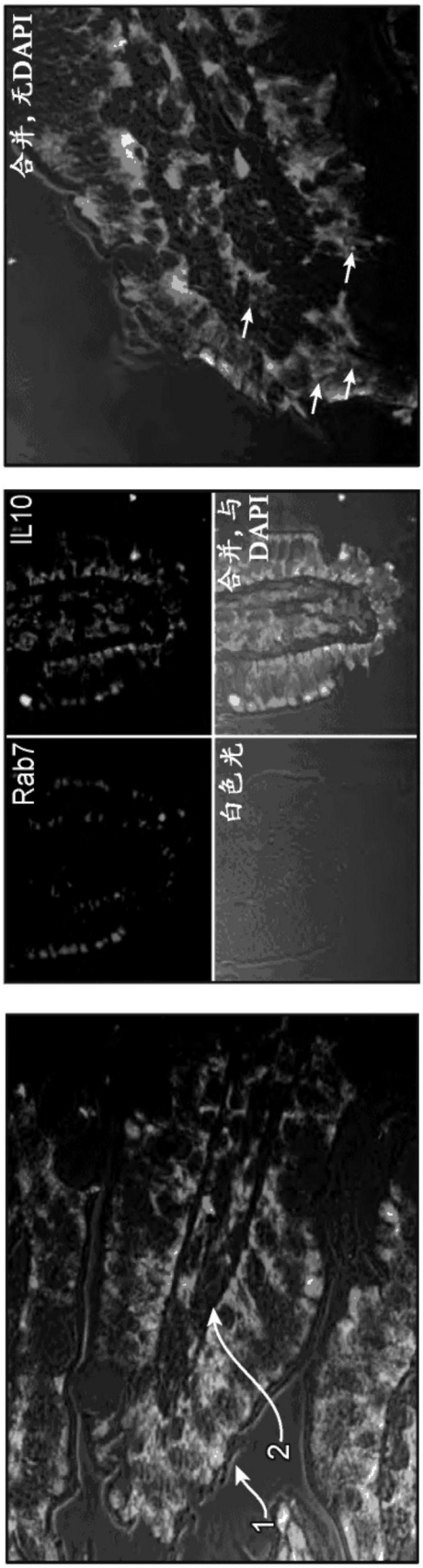


图21A

图21B

图21C

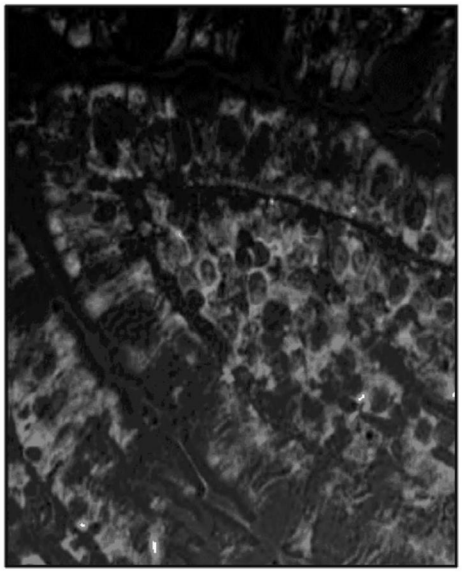


图21E

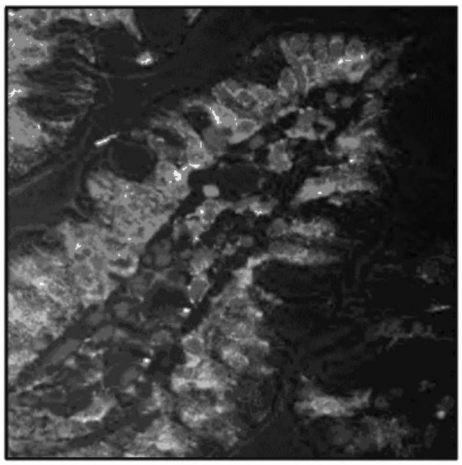


图21D

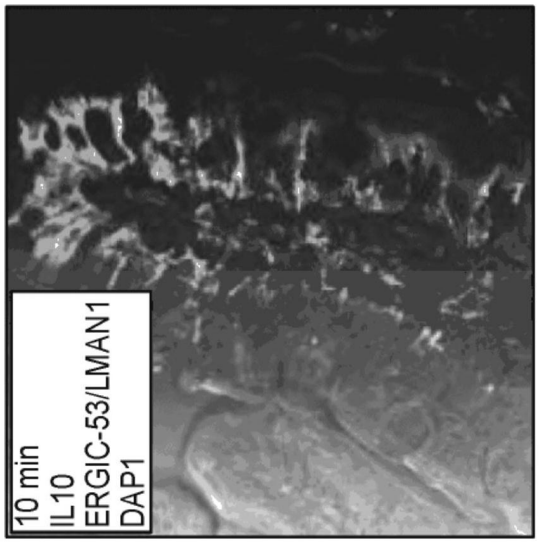


图21H

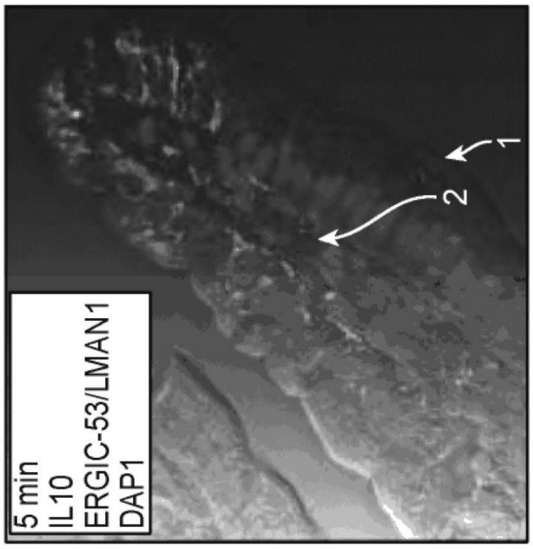


图21G

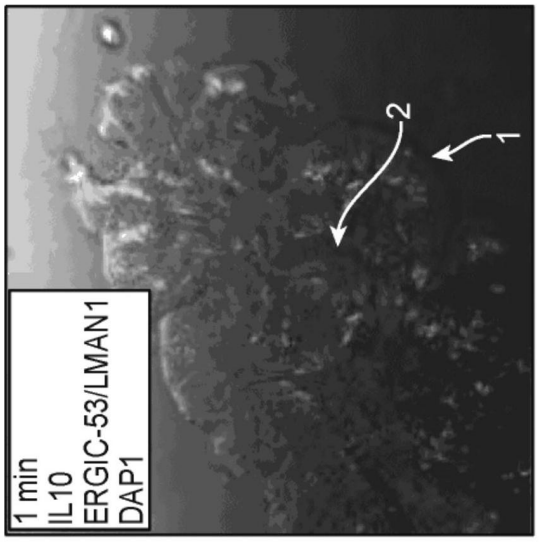


图21F

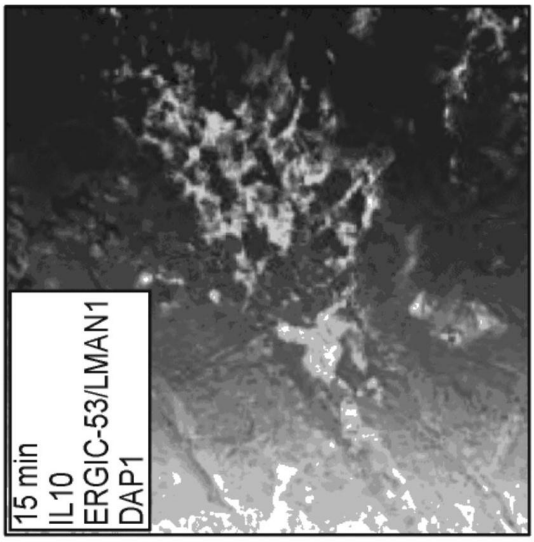


图21I

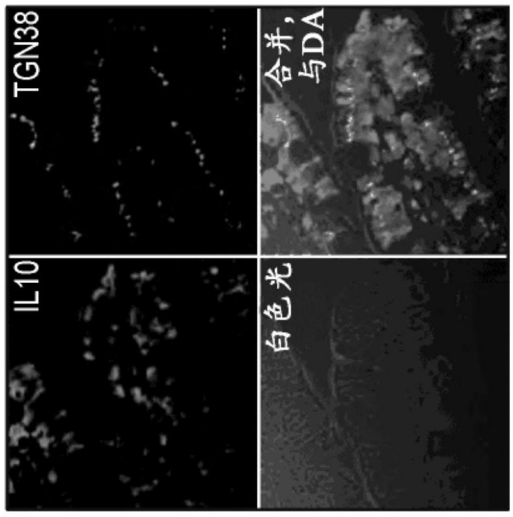


图21L

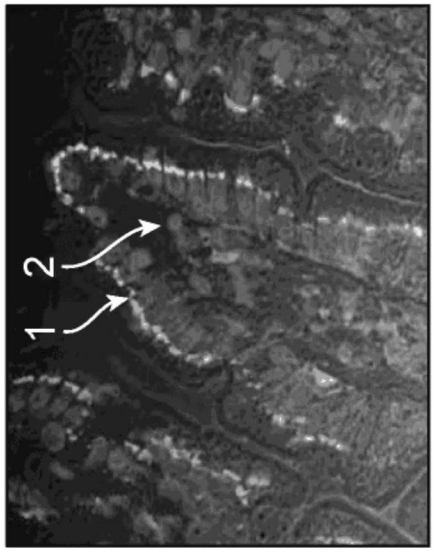


图21K

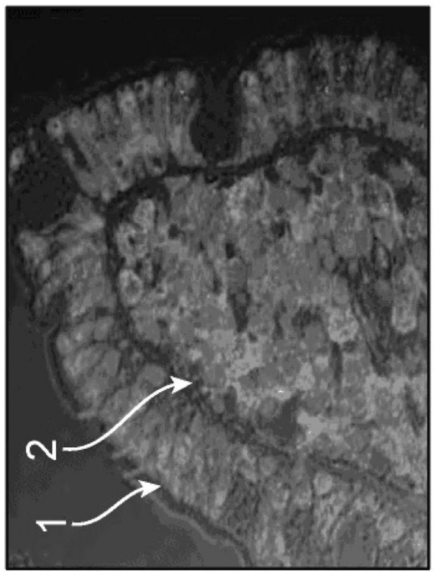


图21J

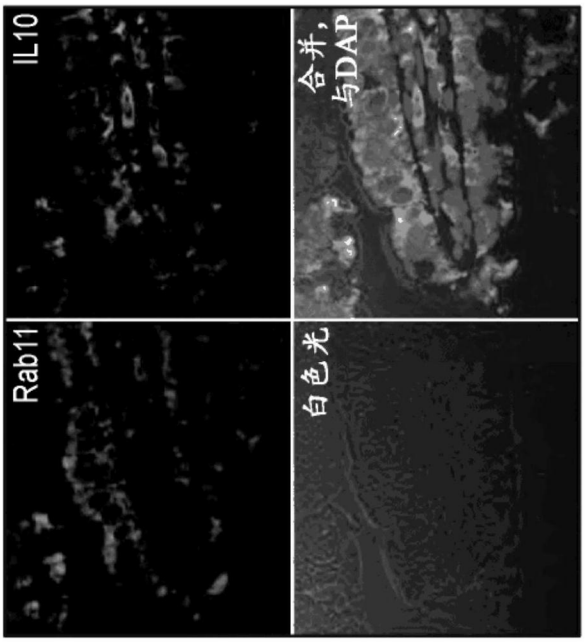
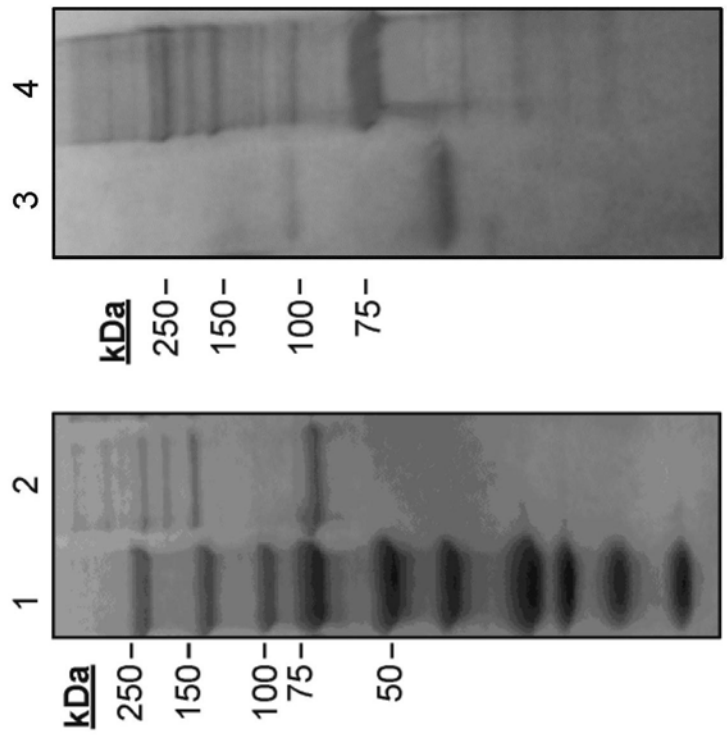


图21M

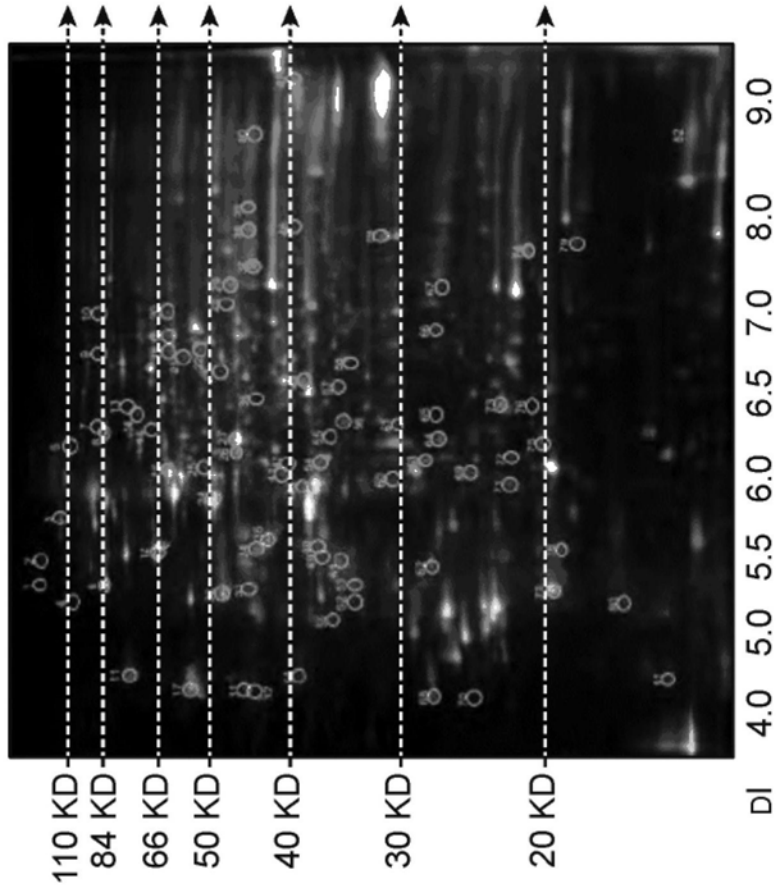
图21



1=分子量标准
2=用携带体蛋白的IP捕获
3=磁珠-生物素携带体蛋白
4=磁珠-聚His携带体蛋白

数据表明，已经确定了充分洗涤的方案能限制非特异性蛋白质捕获的程度，并且有理由发展至2-D SDS-PAGE和质谱分析方向

图22



编号的圆圈是指质谱分析所靶向以进行鉴定的特异性蛋白质。这些代表了在携带体-珠分析物库中放大的那些以及用于验证方法论的一些对照蛋白质

图23

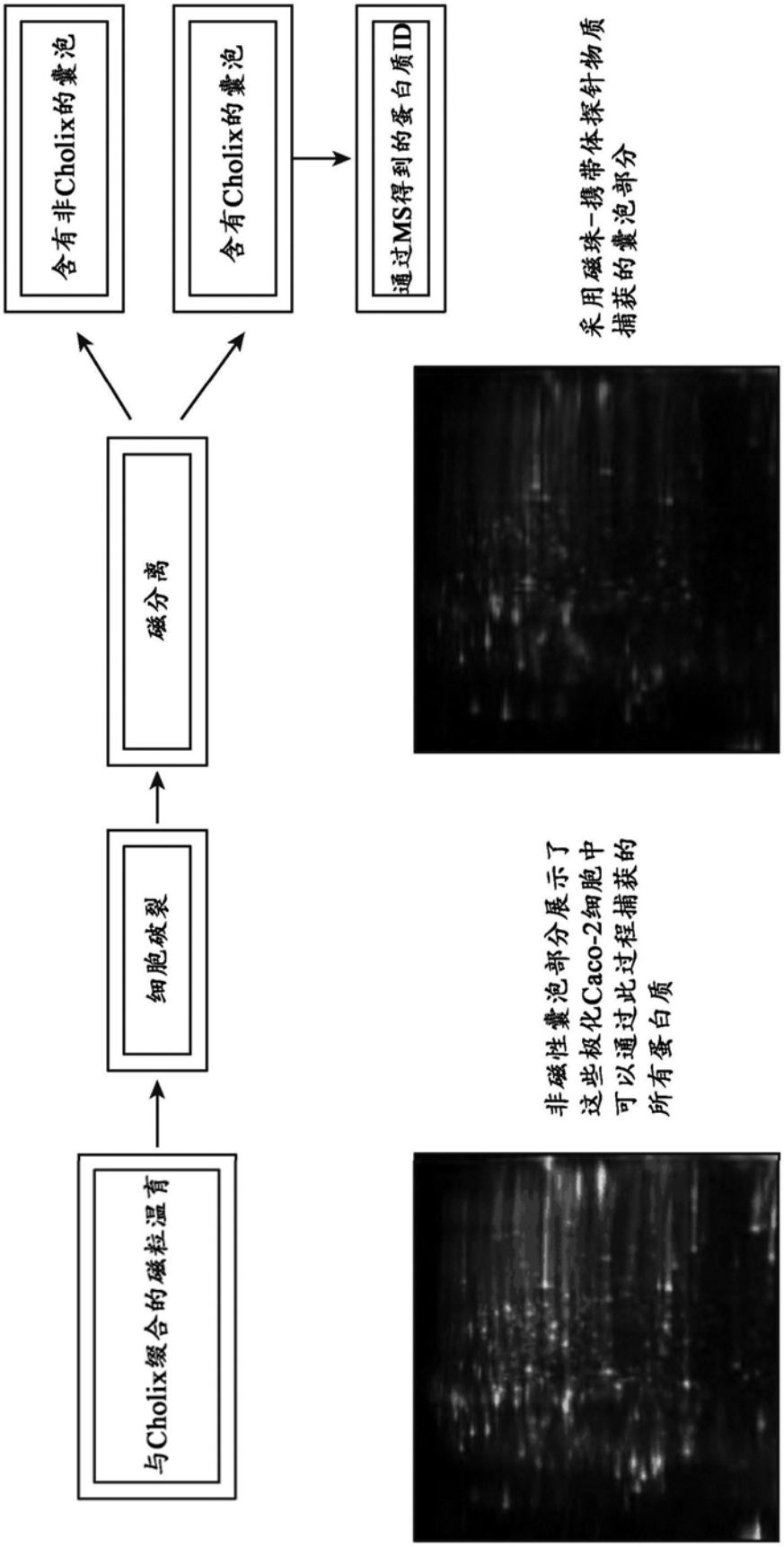

与Cholix缀合的磁粒温育
细胞破裂
磁分离
含有非Cholix的囊泡
含有Cholix的囊泡
通过MS得到的蛋白质ID
非磁性囊泡部分展示了
这些极化Caco-2细胞中
可以通过此过程捕获的
所有蛋白质
采用磁珠-携带体探针物质
捕获的囊泡部分

图24

候选蛋白质	Caco-2 囊泡	Caco-2 PD Cholix-His	Caco-2 PD Cholix-生物素	Caco-2 IP 抗F4/80	大鼠空肠 PD Cholix-His	大鼠空肠 PD Cholix-生物素	MS置信度
细胞角蛋白	✓	✓	✓	✓	✓	✓	高
硫酸乙酰肝素蛋白聚糖		✓					高
热激蛋白	✓	✓			✓	✓	高
ATP合酶	✓	✓			✓	✓	高
层粘连蛋白	✓	✓		✓	✓	✓	低
微管蛋白	✓	✓		✓	✓	✓	低
肌动蛋白	✓	✓	✓		✓	✓	低
14-3-3	✓				✓	✓	高
胶质纤维酸性蛋白	✓				✓		
Dickkopf		✓					??

图25

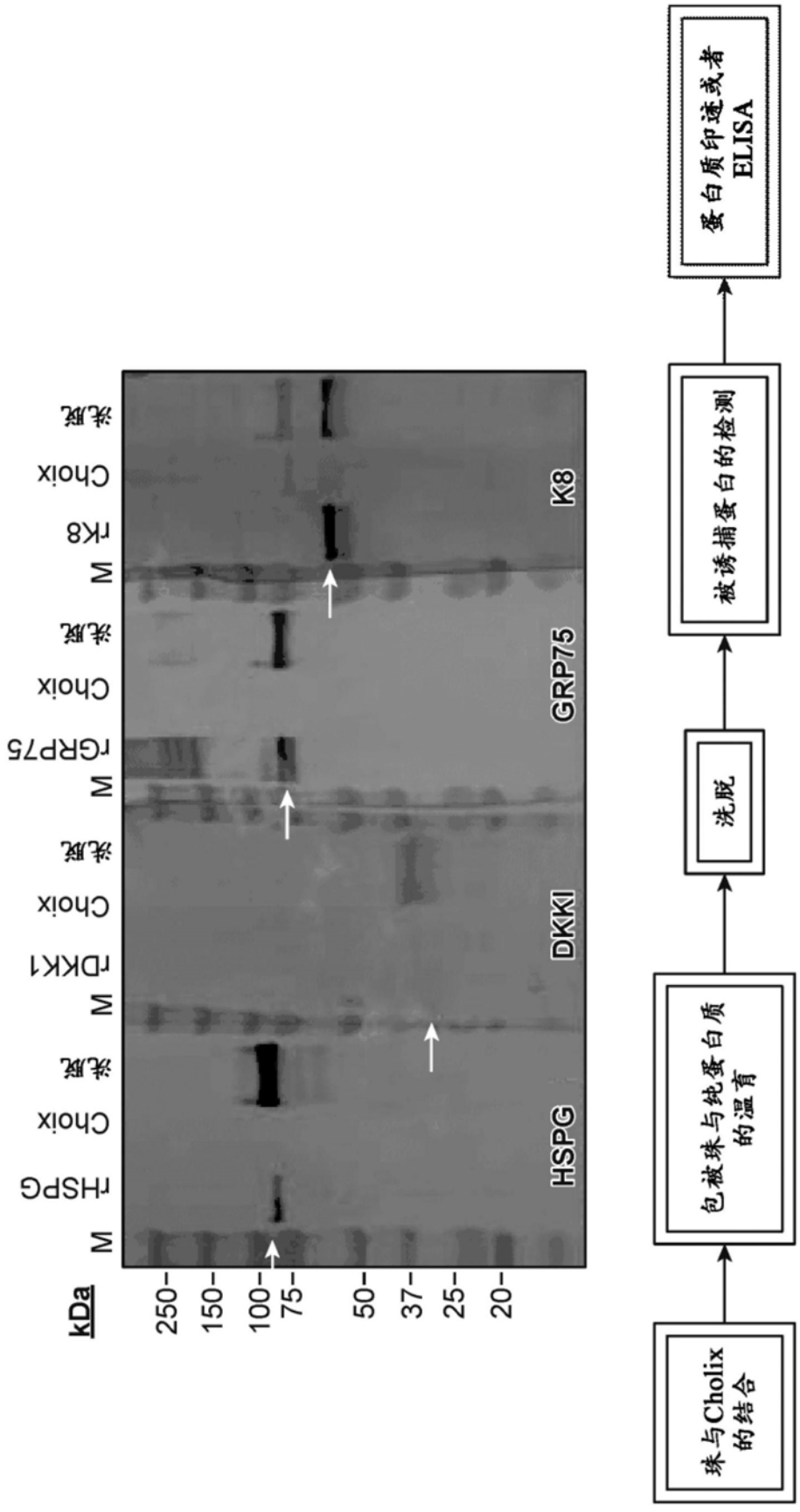

珠与Cholix的结合
包被珠与纯蛋白质的温育
洗脱
被诱捕蛋白的检测
蛋白质印迹或者ELISA
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
M
rHSPG
Cholix
洗脱
M
rDKK1
Cholix
洗脱
M
rGRP75
Cholix
洗脱
M
rK8
Cholix
洗脱
HSPG
DKKI
GRP75
K8

图26

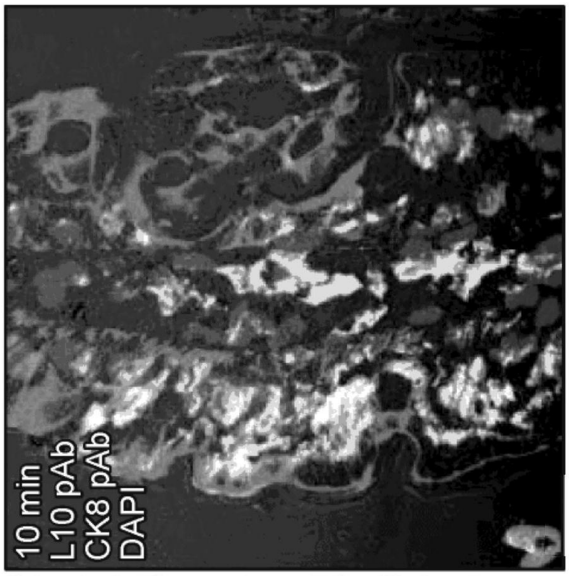


图 27C

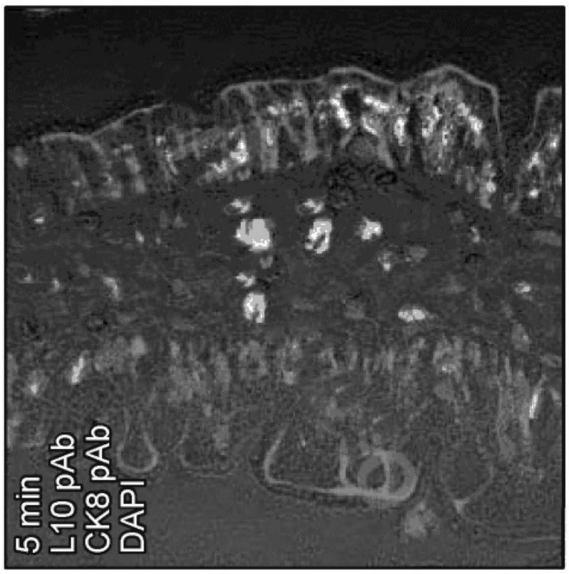


图 27B

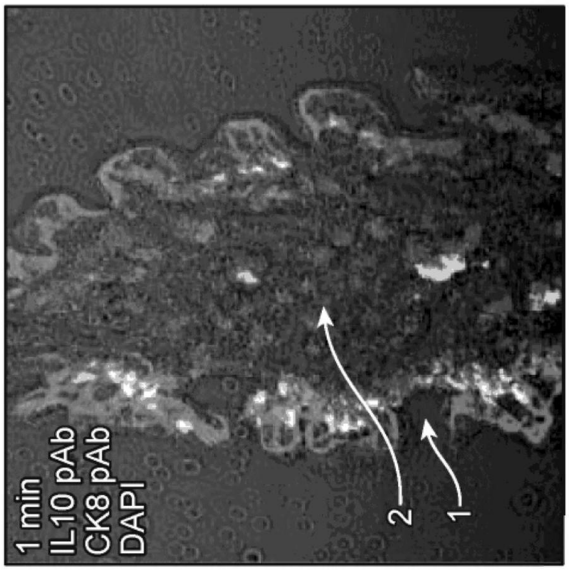


图 27A

图27

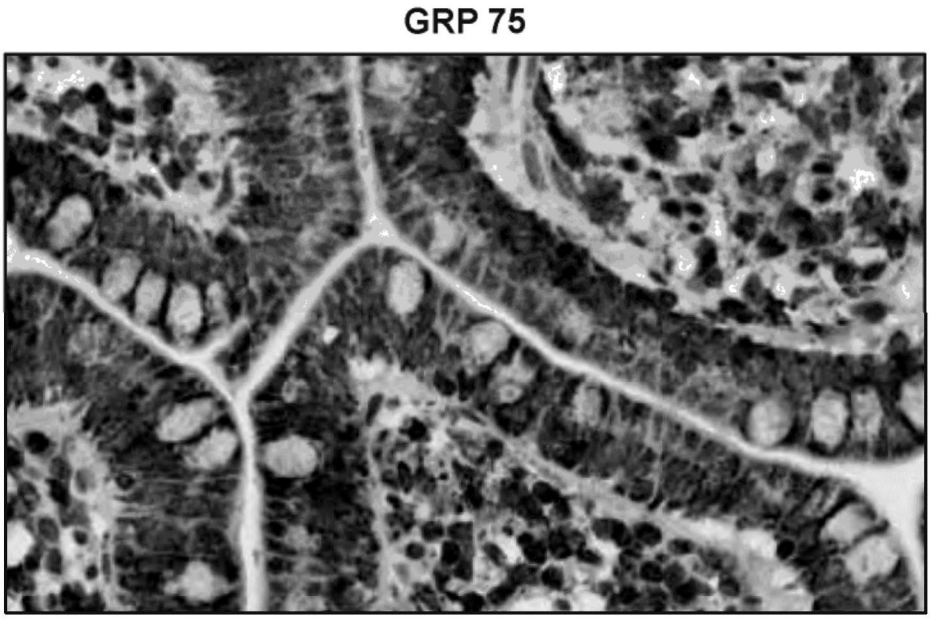


图28A

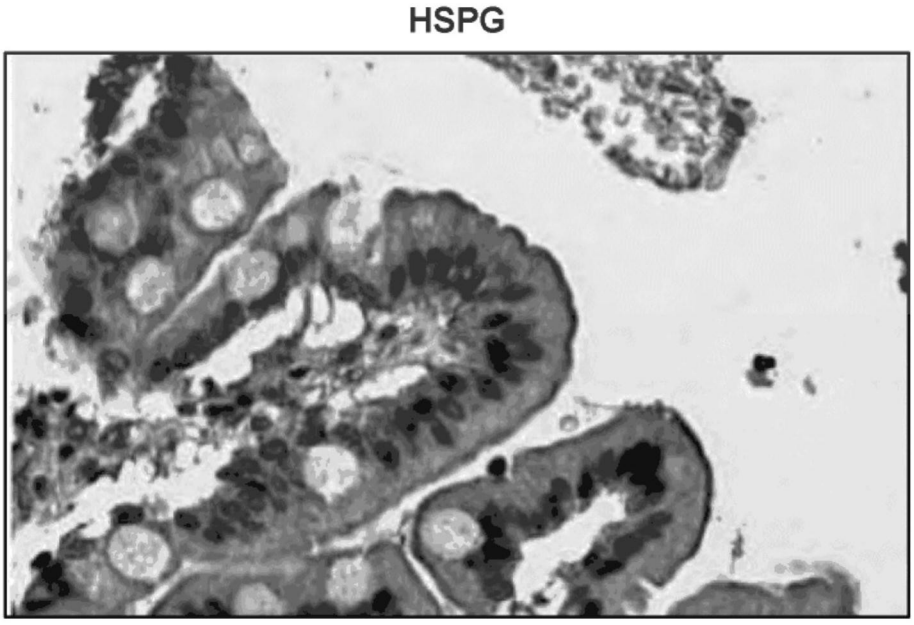


图28B

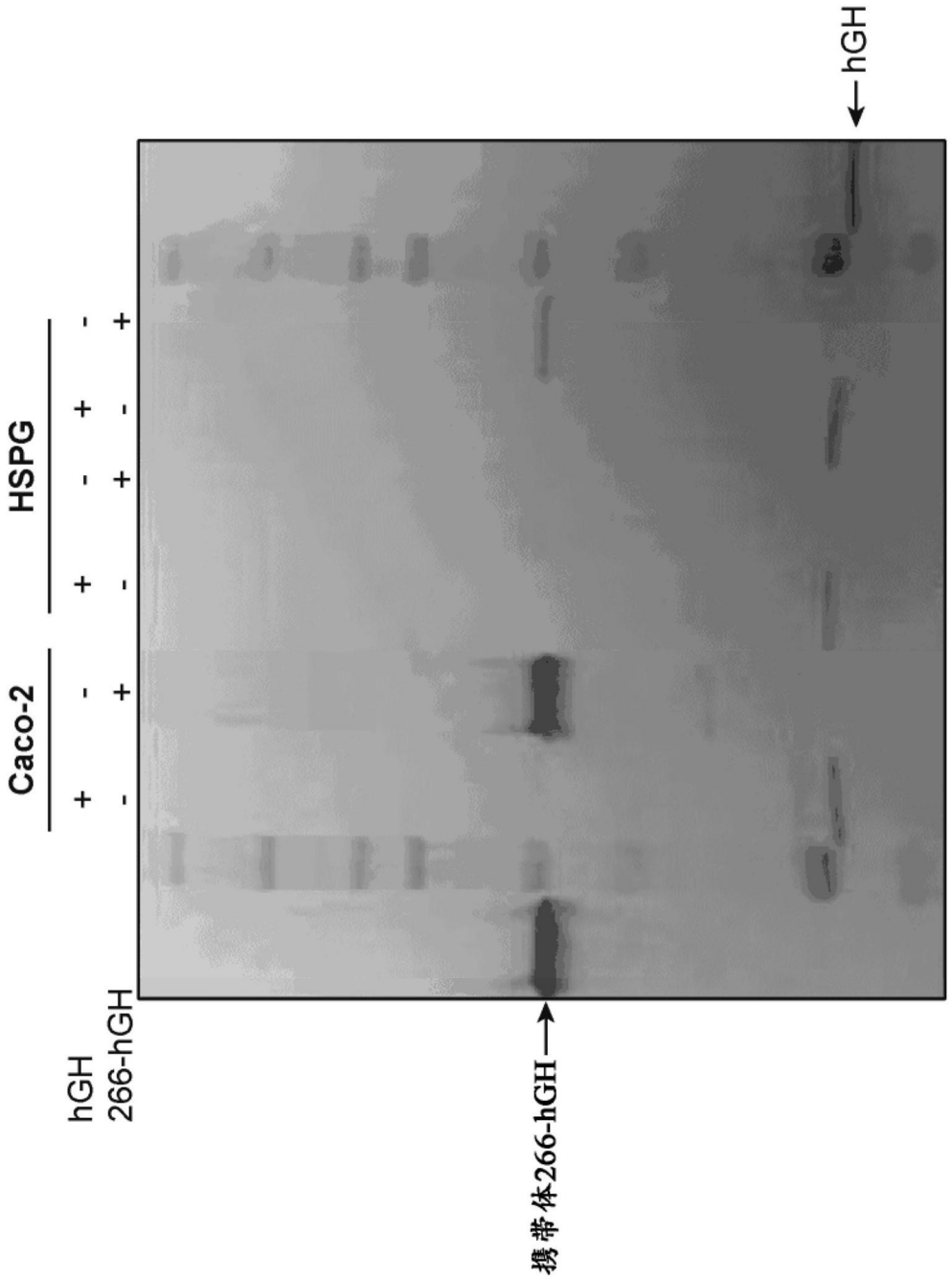


图29

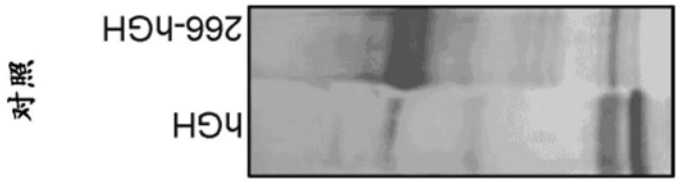


图 30D

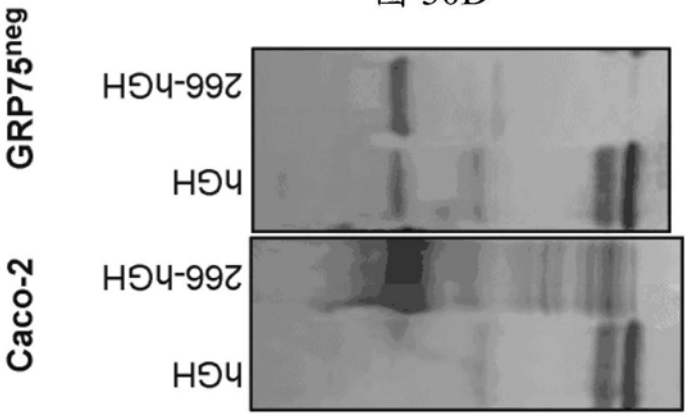


图 30C

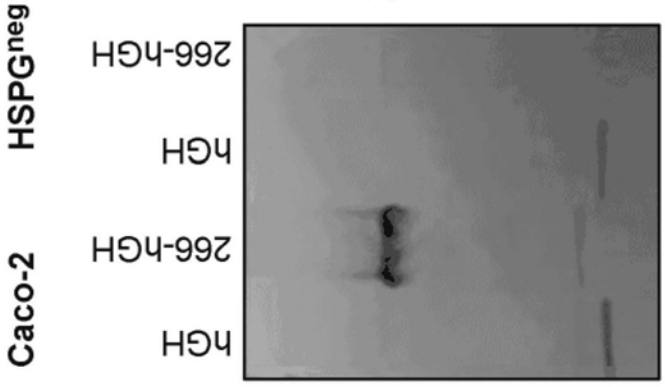


图 30B

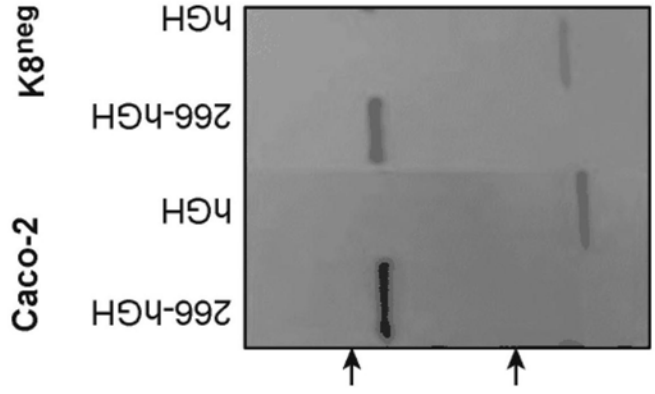


图 30A

图30

测试蛋白质	包被蛋白质	测试缓冲液	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD(M)	亲和力
Grp75	Chx-生物素	1xTBS,pH5.5	1.64E+04	2.68E-04	1.63E-08	16.3 nM
Grp75	Chx-生物素	1xTBS,pH6.5	3.77E+04	2.33E-05	6.17E-10	0.617 nM
Grp75	Chx-生物素	1xTBS,pH7.5	2.87E+04	3.53E-04	1.23E-08	12.3 nM

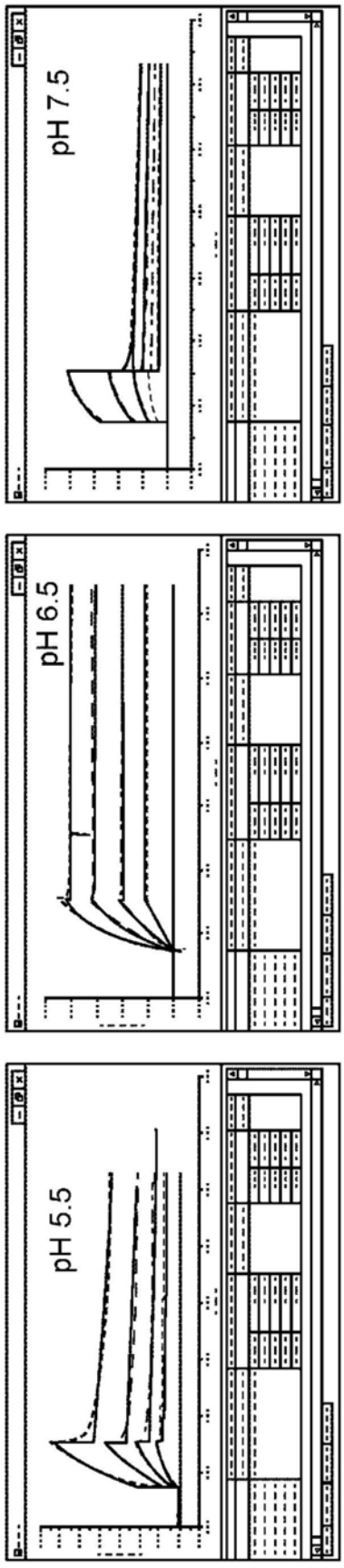


图31

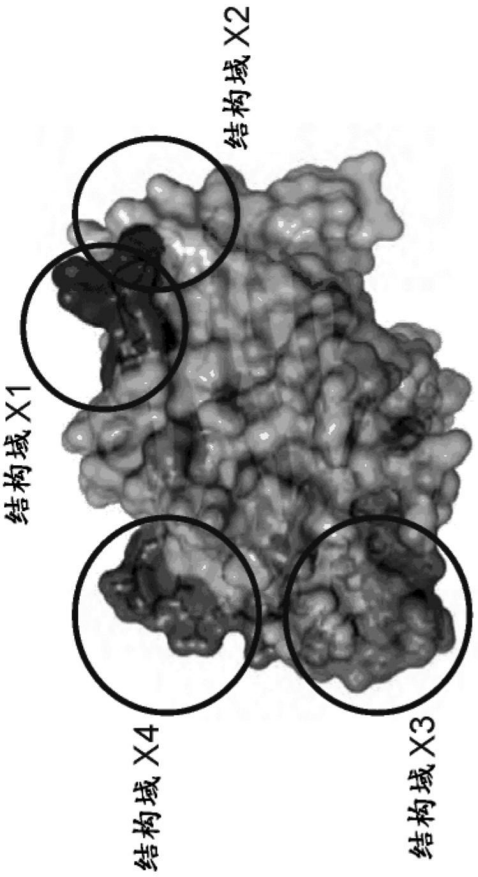


图 32B

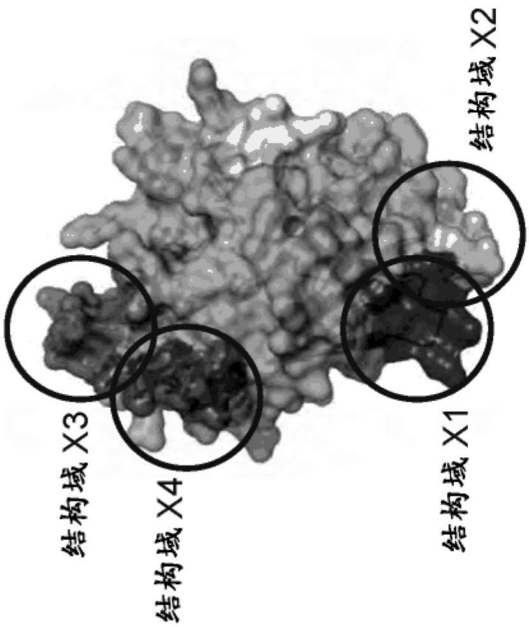


图 32D

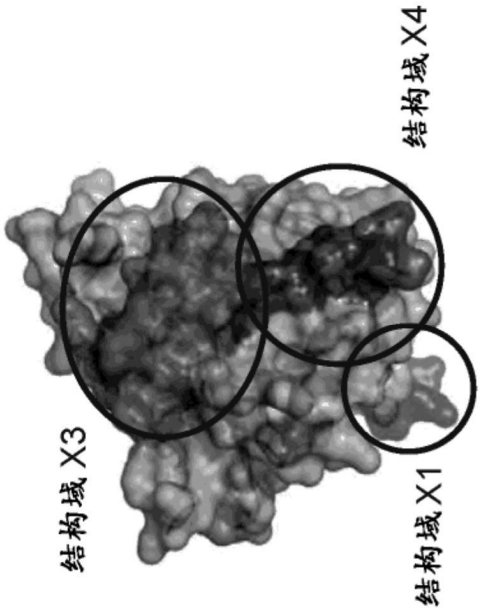


图 32A

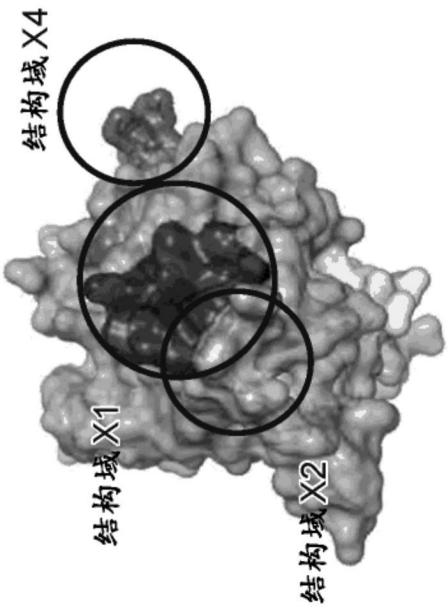


图 32C

图32