



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102247** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
C07K 16/12 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2010 12168	(72) Винахідник(и): Фернандес-Салас Естер (US), Ванг Йоан (US), Герей Паттон Е. (US), Вонг Ліна С. (US), Ходгес Д., Діан (US), Аокі Кей Роджер (US)
(22) Дата подання заявки: 13.03.2009	(73) Власник(и): АЛЛЕРГАН, ІНК., 2525 Dupont Drive, T2-7H, Irvine, CA 92612, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.06.2013	(74) Представник: Брагарник Олександр Миколайович, реєстр. №326
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/036,723	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: NABOKINA S ET AL: "Intracellular location of SNAP-25 in human neutrophils." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 20 OCT 1997, vol. 239, no. 2, 20 October 1997 (1997-10-20), pages 592-597
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 14.03.2008	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.01.2011, Бюл.№ 2	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2013, Бюл.№ 12	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2009/037046, 13.03.2009	

(54) ІМУНОЛОГІЧНІ АНАЛІЗИ АКТИВНОСТІ БОТУЛІНІЧНОГО ТОКСИНУ СЕРОТИПУ А

(57) Реферат:

Винахід стосується розкриття композиції SNAP-25, способу одержання антитіл α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, антитіл α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, способів виявлення активності BoNT/A і способів виявлення нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A.

UA 102247 C2

У даній заявці на патент заявлений пріоритет відповідно до 35 U.S.C. (Збірка законів США) § 119(e) щодо попередньої заявки на патент США № 61/036723 поданої 14 березня 2008 року, яка включена тут шляхом посилання.

Здатність клостридіальних токсинів, таких як, наприклад, ботулінічні нейротоксини (BoNTs), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F і BoNT/G і правцевого нейротоксину (TENT) інгібувати нейрональне проведення широко використовується в терапевтичних і косметичних застосуваннях, наприклад William J. Lipham, *Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin* (Slack, Inc., 2004). Клострідіальні токсини, наявні в продажі у вигляді фармацевтичних композицій, включають препарати BoNT/A, такі як, наприклад BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, England), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GMBH., Frankfurt, Germany), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, South Korea), BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China); і препарати BoNT/B, такі як, наприклад MYOBLOC®/NEUROBLOC® (Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA). Як приклад, BOTOX® в даний час схвалений в США для лікування шийної дистонії у дорослих людей для зменшення тяжкості аномального положення голови і болю в шиї, що асоціюються з шийною дистонією; для лікування важкої первинної пахової пітливості, яка не адекватно управляється за допомогою місцевих агентів; і для лікування косоокості і блефароспазму, що асоціюються з дистонією, включають доброякісний есенціальний блефароспазм або розлади VII нерва у пацієнтів у віці від 12 років.

В даний час біоаналіз LD₅₀ (середньої летальної дози) у мишей, тест на летальність, залишається "золотим стандартом", використовуваним всіма фармацевтичними виробниками для виразу сили їх препаратів. S. S. Arnon et al., *JAMA* 285: 1059-1070 (2001). Фактично, одиниці на ярликах фармацевтичних препаратів є одиницями LD₅₀, одержаними на мишах, і кількість тварин, необхідних для одержання статистично значущих даних LD₅₀, є великою. Перевага біоаналізу LD₅₀ на мишах полягає в тому, що він вимірює всі стадії, необхідні для захоплення ботулінічного токсину (наприклад, пов'язання токсину з рецептором клітинної поверхні, інтерналізацію комплексу токсин-рецептор, транслокація легкого ланцюга в цитоплазму, розщеплювання легким ланцюгом субстрату), замість визначення активності тільки для частини цього процесу інтоксикації, такого як, наприклад аналізи *in vitro*, які вимірюють тільки ферментативну активність легкого ланцюга. На жаль, біоаналіз LD₅₀ на мишах має безліч недоліків, що включають високу вартість проведення унаслідок великої кількості потрібних лабораторних тварин, втрата специфічності, оскільки все серотипи BONT викликають однакові вимірювані результати, і можливість неточності в тому випадку, якщо не використовують великі групи тварин. Додатково, групи, що працюють з тваринами, випробовують тиск з боку регулюючих органів в США (FDA/NICEATM/ICCVAM) і в Європі (MHRA і EDQM), а також тиск виявляється на фармацевтичні компанії, що проводять продукти на основі ботулінічного нейротоксину, що полягає в скороченні тестування на тваринах і, що важливіше, заміни біоаналізу LD₅₀ на мишах при виробництві продукту. Регулюючі органи зобов'язують фармацевтичні компанії застосовувати принцип три "R" відносно тестування сили ботулінічних нейротоксинів: "Зменшити, Поліпшити, Замінити" (Reduce, Refine, Replace). D. Straughan, *Progress in Applying the Three Rs to the Potency Testing of Botulinum Toxin Type A*, *Altern. Lab. Anim.* 34(3): 305-313 (2006). Останніми роками декілька стадій вже зробили для зменшення і поліпшення біоаналізу LD₅₀ на мишах для стандартизації протоколу і одержання більш узгоджених даних з використанням меншої кількості тварин на аналіз.

Таким чином, простий, надійний, валидйований, що приймається державними регулюючими органами аналіз активності ботулінічного токсину, який може оцінювати інтегрованість всіх стадій, необхідних для поглинання ботулінічного токсину, може мати значну цінність, оскільки такий аналіз, не заснований на тваринах, може зменшити потребу в тестуванні на тваринах, і ослабити всі недоліки, вартісні характеристики і етичні аспекти, що асоціюються з цим типом аналізу, заснованим на тваринах. У даному описі запропоновані нові композиції, клітини і способи аналізу активності ботулінічного токсину А, корисні для різних видів промисловості, таких як, наприклад фармацевтична і харчова промисловість, а також забезпечуючі переваги. Такі композиції, клітини і способи не використовують живих тварин або тканини, відібрані у живих тварин, але можуть оцінювати всі стадії, необхідні для дії нейротоксину.

Докладний опис фігур

Фіг. 1 демонструє схему моделі вивільнення нейромедіатора і інтоксикації клостридіальним токсином, що існує в даний час, в нейронах центральної нервової системи і периферичної нервової системи.

Фіг. 1А демонструє схему механізму вивільнення нейромедіатора в нейронах центральної нервової системи і периферичної нервової системи. Процес вивільнення може бути описаний за

допомогою двох стадій: 1) зашторювання везикули, при якому білок SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor), пов'язаний з везикулою, що містить молекули нейромедіатора, приєднується до пов'язаного з мембраною білка SNARE, розташованого на мембрані цитоплазми; і 2) вивільнення нейромедіатора, при якому везикула зливається з мембраною цитоплазми і молекули нейромедіатора екзоцитують.

Фіг. 1В демонструє схему механізму інтоксикації для правцевого і ботулінічного токсину в нейронах центральної нервової системи і периферичної нервової системи. Цей процес інтоксикації може бути описаний за допомогою чотирьох стадій: 1) пов'язання з рецептором, де кластридальний токсин зв'язується з комплексом кластридиального рецептора і ініціює процес інтоксикації; 2) інтерналізація комплексу, при якому після скріплення токсину везикула, що містить комплекс токсин/рецептор, ендочитує в клітину; 3) транслокація легкого ланцюга, при якому, як вважають, відбуваються множинні події, що включають зміни рН усередині везикули, утворення пор, що містять домен H_N важкого ланцюга кластридиального токсину, відділення легкого ланцюга кластридиального токсину від важкого ланцюга, і вивільнення легкого ланцюга і 4) ферментативна модифікація мішені, де легкий ланцюг кластридиального токсину протеолітично розщеплює його субстрати-мішені SNARE, такі як, наприклад SNAP-25, VAMP або Syntaxin, таким чином, запобігаючи зашторювання везикулам і вивільненню нейромедіатора.

Фіг. 2 демонструє порівняння захоплення BoNT/A в чотирьох клітинних лініях за допомогою аналізу шляхом вестерн-блоттингу.

Фіг. 2А демонструє графік виявлення продукту розщеплювання SNAP-25 виходячи з кількості BoNT/A, використовуваної для обробки клітинної лінії. Дані аналізували в програмі SigmaPlot з використанням 4-х параметричних логістичних моделей, і значення EC_{50} (середньої ефективної концентрації) одержували для кожної клітинної лінії. Розташування виявлених сигналів продуктів розщеплювання SNAP-25 було наступним: SiMa>> Neuro-2a>LA1-55n> PC12.

Фіг. 2В демонструє відношення сигнал/шум для необроблених сигналів при концентрації 300 пМ в порівнянні з 0 пМ і 1,2 пМ в порівнянні з 0 пМ, що розраховуються для аналізу. Клітини SiMa забезпечували найбільше відношення сигнал/шум і найменші значення EC_{50} .

Фіг. 3 демонструє оптимізацію середовищ для клітинного диференціювання для стійких клітинних ліній, корисних в імунологічному способі виявлення активності BoNT/A, розкритому в даному описі.

Фіг. 4 демонструє оптимізацію часу для клітинного диференціювання для стійких клітинних ліній, придатних в імунологічному способі виявлення активності BoNT/A, розкритому в даному описі

Фіг. 5 демонструє оптимізацію обробки BoNT/A клітин стійких клітинних ліній, корисних в імунологічному способі виявлення активності BoNT/A, розкритому в даному описі. Результати указують на те, що EC_{50} менше ніж 2 пМ досягається з будь-якою з тестованих обробок BoNT/A.

Фіг. 6 демонструє чутливість імунологічного способу виявлення активності BoNT/A, розкритого в даному описі. Результати вказують на те, що захоплення BoNT/A клітинами займає менше ніж одну хвилину перед продукцією значних кількостей продукту розщеплювання SNAP-25 в порівнянні з фоновим значенням.

Фіг. 7 демонструє специфічність імунологічного способу виявлення активності BoNT/A, розкритого в даному описі. Результати указують на те, що імунологічні способи виявлення активності BoNT/A, розкриті в даному описі, можуть вимірювати всі стадії, залучені в інтоксикацію BoNT/A.

Фіг. 8 демонструє криву залежності відповіді від дози для диференційованих клітин SiMa, оброблених комплексом BoNT/A, з використанням імунологічного способу виявлення активності BoNT/A, розкритого в даному описі.

Фіг. 9 демонструє результати імунологічного способу визначення активності BoNT/A для виготовленого фармацевтичного продукту BoNT/A з використанням імунологічного способу виявлення активності BoNT/A, розкритого в даному описі.

Фіг. 10 демонструє виявлення нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A у людській сироватці крові з використанням імунологічного способу виявлення активності BoNT/A, розкритого в даному описі.

Докладний опис винаходу

У даному описі запропоновані нові аналізи для визначення присутності або відсутності активного BoNT/A в зразку і для визначення активності/сили препарату BoNT/A. Нові клітинні аналізи, розкриті в даному описі засновані на клітинах, реагентах і способах детекції, що дозволяє визначати в аналізі пікомолярні кількості BoNT/A в зразку. Клітинні аналізи, розкриті в даному описі, зменшують необхідність в дослідженнях токсичності на тваринах, в той же час

служать для аналізу множинних функцій BoNT/A, а саме, скріплення і клітинного захоплення токсину, транслокації в клітинний цитозоль, і протеазну активності. Як додатково обговорюється нижче, нові способи і композиції можуть бути використані для аналізу неочищених зразків і зразків в партіях, а також високоочищених дволанцюжкових токсинів і виготовлених продуктів токсинів і додатково застосовні для форматів автоматизованого високопродуктивного аналізу.

Таким чином, в одному з аспектів, розкритих в даному описі, запропоновані композиції для продукції антитіл α -SNAP-25, які можуть зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець (карбоксильний) на залишку P1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25. Композиції можуть містити ад'ювант і композицію, що включає антиген SNAP-25, носій, пов'язаний з антигеном SNAP-25, або носій, пов'язаний з гнучкою вставкою, пов'язаною з антигеном SNAP-25, де гнучкий лінкер розташовується між антигеном SNAP-25 і носієм. Представляється, що будь-який і всі антигени SNAP-25, що запускають імунну відповідь, продукує антиген α -SNAP-25, що може зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець на залишку P1 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, можуть бути корисні як антиген SNAP-25, що включає без обмеження антиген SNAP-25, що походить з того, що зустрічається в природі SNAP-25, антиген SNAP-25, що походить з того, що не зустрічається в природі SNAP-25, і антиген SNAP-25, що містить імунореактивний фрагмент SNAP-25, SNAP-25 з того, що зустрічається в природі SNAP-25 або SNAP-25, що не зустрічається в природі. Антигени SNAP-25, корисні для продукції α -SNAP-25, які можуть зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець на залишку P1 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, включають без обмеження антигени SNAP-25, що містять пептид SNAP-25, що має карбоксильований С-кінцевий глутамін, пов'язаний з несучим пептидом, включає без обмеження SEQ ID NO: 38. Інші композиції, корисні для одержання антитіл α -SNAP-25, які можуть зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець на залишку P1 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, включають без обмеження композицію, що містить носій, пов'язаний з гнучким лінкером, пов'язаною з карбоксильованим С-кінцевим глутаміном антигена SNAP-25, де гнучкий лінкер розташовується між антигеном SNAP-25 і носієм. Передбачається, що будь-який і всі ад'юванти можуть бути корисні в такій композиції, що включають без обмеження поліетиленгліколь (PEG), монометоксиполіетиленгліколь (mPEG), полівиниловий спирт (PVA), повний і неповний ад'ювант Фрейнда.

У ще одному аспекті, розкритому в даному описі запропоновані способи продукції антитіла α -SNAP-25, яке може зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець на залишку P1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Аспект цього способу включає стадії (а) введення тварині композиції, розкритої в даному описі; (б) відбору у тваринного зразка, що містить антитіло α -SNAP-25 або клітини, що продукують антитіло α -SNAP-25; і (в) виділення антитіла α -SNAP-25 із зразка. Розкриті способи корисні для одержання моноклональних антитіл α -SNAP-25, які можуть зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець глутаміну продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, або поліклональних антитіл α -SNAP-25, які можуть зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець глутаміну продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A.

В ще одному аспекті, розкритому в даному описі, запропоновано антитіло α -SNAP-25, яке може зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець на залишку P1 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25. Такі антитіла α -SNAP-25 включають антитіла, що зустрічаються в природі і не зустрічаються в природі, а також, моноклональні антитіла α -SNAP-25 або поліклональні антитіла α -SNAP-25. Моноклональні антитіла α -SNAP-25, корисні як антитіла α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, включають без обмеження моноклональні антитіла α -SNAP-25, продуктовані з гібридомних клітинних ліній 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 і 3C3E2.

У ще одному аспекті, розкритому в даному описі, запропоновані способи виявлення активності BoNT/A. Аспект цього способу включає стадії (а) обробки клітини із стабільної клітинної лінії зразком BoNT/A, де клітина із стабільної клітинної лінії чутлива до інтоксикації BoNT/A; (б) виділення з обробленої клітини компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A; (в) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, яке може зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець на залишку P1 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25; і (г) виявлення присутності комплексу антитіло-антиген, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25;

де виявлення за допомогою комплексу антитіло-антиген є показником активності BoNT/A. Антитіло α -SNAP-25 із стадії (с) можливо може бути пов'язано з твердофазним носієм.

У ще одному аспекті, розкритому в даному описі, запропоновані способи виявлення активності BoNT/A. Аспект цього способу включає стадії (а) обробки клітини із стабільної клітинної лінії зразком, BoNT/A, де клітина із стабільної клітинної лінії може захоплювати BoNT/A; (б) виділення з обробленої клітини компоненту SNAP-25, SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A; (в) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, яке може зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25; і (г) виявлення присутності комплексу антитіло-антиген, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25; де виявлення за допомогою комплексу антитіло-антиген є показником активності BoNT/A. Антитіло α -SNAP-25 із стадії (с) необов'язково може бути пов'язано з твердофазним носієм.

У ще одному аспекті, розкритому в даному описі, запропоновані способи визначення імунорезистентності до BoNT/A у ссавця. Аспект цього способу включає стадії (а) додавання BoNT/A до тестованого зразка одержаного у ссавця, тестованого на наявність або відсутність антитіл, нейтралізуючих α -BoNT/A; (б) обробки клітини із стабільної клітинної лінії тестованим зразком, де клітина із стабільної клітинної лінії чутлива до інтоксикації BoNT/A;

(в) виділення з оброблених клітин компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

(г) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, яке може зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25;

(д) виявлення присутності комплексу антитіло-антиген, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25;

(е) повторення стадій (а) -(д) з негативним контрольним зразком замість тестованого зразка і (ж) порівняння кількості комплексу антитіло-антиген, виявленого на стадії (д), з кількістю комплексу антитіло-антиген, виявленого на стадії (е), де виявлення меншої кількості комплексу антитіло-антиген, виявленого на стадії (д), в порівнянні з кількістю комплексу антитіло-антиген, виявленого на стадії (е), є показником присутності α -BoNT/A нейтралізуючих антитіл. Антитіло α -SNAP-25 із стадії г може необов'язково бути пов'язане з твердофазним носієм. Контрольний зразок на стадії е також може включати позитивний контрольний зразок додатково до негативного контрольного зразка.

Токсини клостридій, продуковані *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium baratii* і *Clostridium butyricum*, найширше використовуються в терапевтичному лікуванні і косметичній обробці людей і інших ссавців. Штами *C. botulinum* продукують сім що відрізняються антигенами серотипов ботулінічних токсинів (BoNTs), які ідентифікують шляхом вивчення спалахів ботулізму у людей (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/e і BoNT/F), тварин (BoNT/C1 і BoNT/D), або виділені з ґрунту (BoNT/G). Хоча всі сім серотипів ботулінічного токсину мають схожу структуру і біологічні властивості, кожен з них також демонструє гетерогенні характеристики, такі як, наприклад різні фармакологічні властивості. Навпаки, правцевий токсин (TENT) продукується однорідною групою *C. tetani*. Два інших види клостридій *C. baratii* і *C. butyricum* також продукують токсини, схожі на BoNT/F і BoNT/E, відповідно.

Кожен з клостридіальних токсинів транслюється у вигляді одноланцюгового поліпептиду з масою приблизно 150 кДа, який потім розщеплюється шляхом протеолітичного розщеплювання усередині дисульфідної петлі протеазою, що зустрічається в природі, такою як, наприклад ендогенна протеаза клостридіального токсину або протеаза, що зустрічається в природі, продукується в навколишньому середовищі. Цей посттрансляційний процесінг дозволяє одержувати дволанцюжкову молекулу, що містить легкий ланцюг масою приблизно 50 кДа (LC), і важкий ланцюг масою приблизно 100 кДа (HC), що утримуються разом за допомогою одиничного дисульфідного зв'язку і нековалентних взаємодій. Кожна із зрілих дволанцюжкових молекул містить три функціонально різних домена: 1) ферментативний домен, розташований в LC, який включає область металлопротеази, що має залежну від цинку ендопептидазну активність, яка специфічно націлена на кірові компоненти апарату вивільнення нейромедіатора; 2) домен транслокації, що міститься в N-кінцевій половині HC (HN), який полегшує вивільнення LC з внутріклітинних везикул в цитоплазму клітини-мішені; і 3) зв'язуючий домен, виявлений в С-кінцевій половині HC (HC), який визначає зв'язуючу активність і зв'язуючу специфічність токсину відносно рецепторного комплексу, розташованого на поверхні клітини-мішені.

Зв'язуюча транслокуюча і ферментативна активності цих трьох функціональних доменів всі

разом необхідні для токсичності. Хоча не всі деталі цього способу точно відомі, загальний механізм клітинної інтоксикації, за допомогою якого клостридіальні токсини проникають в нейрон і інгібують вивільнення нейромедіатора є схожим незалежно від серотипу або підтипу. Хоча автори винаходу не бажали обмежуватися наступним описом, механізм інтоксикації може

бути описаний таким чином, що містить щонайменше чотири стадії: 1) пов'язання з рецептором, 2) інтерналізація комплексу, 3) транслокація легкого ланцюга, і 4) ферментативна модифікація мішені (Фіг. 1). Процес ініціюється, коли домен НС клостридіального токсину зв'язується з токсин-специфічною рецепторною системою, розташованою на поверхні мембрани цитоплазми клітини-мішені. Вважають, що специфічність скріплення рецепторного комплексу досягається частково шляхом специфічних комбінацій гангліозидів і білкових рецепторів, які по різному включають кожен з рецепторних комплексів клостридіального токсину. Після скріплення комплексу токсин/рецептор інтерналізуються шляхом ендоцитозу, і інтерналізовані везикули сортуються за допомогою специфічних внутріклітинних шляхів. Стадія транслокації запускається закисленням везикули компартмента. Цей процес ініціює важливі залежні від рН структурні перегрупування, які збільшують гідрофобність, сприяють утворенню пор і полегшують розділення важкого і легкого ланцюгів токсину. Після розділення ендopeптидази легкого ланцюга токсину вивільняється з внутріклітинної везикули в цитозоль, де специфічно націлюється на кірові компоненти апарату вивільнення нейромедіатора. Ці кірові білки, що є мембранним білком (VAMP) /синаптобrevін, що асоціюється з везикулою, білком 25 кДа (SNAP-25) і синтаксин, що асоціюється з синапсоматомами, необхідні для синаптичного закріплення везикули і злиття з нервовим закінченням, і є членами сімейства розчинних чутливих до N-етилmaleїмїду білкових рецепторів, що приєднують чинник (SNARE). BoNT/A і BoNT/E розщеплюють SNAP-25 в С-кінцевий області, вивільняючи амінокислотний фрагмент завдовжки дев'ять або двадцять шість амінокислот, відповідно, і BoNT/C1 також розщеплює SNAP-25 біля С-кінця, вивільняючи фрагмент завдовжки вісім амінокислот. Ботулінові серотипи BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F і BoNT/G, і правцевий токсин діють на консервативний центральний фрагмент VAMP, і вивільняють N-кінцевий фрагмент VAMP в цитозоль. BoNT/C₁ розщеплює синтаксин в одному місці біля поверхні цитозольної мембрани. Селективний протеоліз синаптичних SNARE відповідає за блокування вивільнення нейромедіатора, викликаного клостридіальними токсинами *in vivo*. Білок SNARE, націлений на клостридіальні токсини, є звичайним для екзоцитозу в різних не нейрональних типах клітин; у цих клітинах, таких як в нейронах, активність пептидази легкого ланцюга інгібує екзоцитоз, наприклад Yann Humeau et al., How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release, 82(5) Biochimie. 427-446 (2000); Kathryn Turton et al., Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility, 27(11) Trends Biochem. Sci. 552-558. (2002); Giovanna Lalli et al., The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons, 11(9) Trends Microbiol. 431-437 (2003).

Аспекти даного опису включають, частково, композиції для продукції антитіл α -SNAP-25, які можуть зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Інші аспекти даного опису включають, частково, композицію, що викликає імунну відповідь, для продукції антитіл α -SNAP-25, які можуть зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25. Використовуваний тут термін "композиція, що викликає імунну відповідь" відноситься до композиції, що містить антиген SNAP-25, який при введенні тварині стимулює імунну відповідь проти антигена SNAP-25, таким чином, продукує антитіло α -SNAP-25, яке може зв'язуватися з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25. Термін "імунна відповідь" відноситься до будь-якої відповіді імунної системи тварини на композицію, що викликає імунну відповідь. Приклади імунних відповідей включають клітинний, а також локальний і системний гуморальний імунітет, такий як, наприклад відповіді CTL, що включають антиген-специфічну індукцію CD8+CTL, хелперні відповіді, Т-клітинні відповіді, що включають Т-клітинні проліферативні відповіді і вивільнення цитокінів, і В-клітинні відповіді, що включають, наприклад відповідь продукує антитіла. Термін "індукція імунної відповіді" відноситься до введення композиції, що викликає імунну відповідь, або кодуємого поліпептиду композицію, що викликає імунну відповідь, де на імунну відповідь виявляється вплив, наприклад, він стимулюється, ініціюється або індукується.

Композиція містить антиген SNAP-25. Використовуваний тут термін "антиген" відноситься до молекули, яка викликає імунну відповідь і включає без обмеження пептиди, полісахариди і кон'югати ліпідів, такі як наприклад ліпопротеїни і гліколіпіди. Використовуваний тут термін "антиген SNAP-25" відноситься до будь-якого антигену, який має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, який може викликати імунну відповідь.

Антиген SNAP-25, використовуваний в композиції, що викликає імунну відповідь, має бути достатньо великим для того, щоб бути по суті унікальним за послідовністю, таким чином, зменшуючи можливість продукції антитіл, що мають перехресну реактивність відносно антигенів, що відрізняються від SNAP-25. Додатково, антиген SNAP-25, використовуваний в композиції, що викликає імунну відповідь, має бути достатньо невеликим для того, щоб запускати імунну відповідь тільки по суті проти SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, таким чином, збільшуючи вірогідність продукції антитіл α -SNAP-25, які можуть розрізняти SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, від SNAP-25, позбавленого С-кінця на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Крім того, також вельми бажано продукувати антитіла α -SNAP-25 одиначної амінокислотної послідовності з добрим виходом, які мають відтворювану вибірковість і зв'язуються з прийнятною авідністю для того, щоб дати можливість для розробки високочутливого аналізу.

Послідовність, що оточує сайт розщеплювання BoNT/A, представленого в SNAP-25, позначається як $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$, де P_1-P_1' позначає розщеплюваний зв'язок. Після розщеплювання під дією BoNT/A продукти розщеплювання, що утворюються в результаті, містять фрагмент, що включає послідовність $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$, і фрагмент, включаючий $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$. Таким чином, використовуваний тут термін "SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A" відноситься до будь-якого SNAP-25, що має залишок P_1 на своїй С-кінцевій амінокислоті. Наприклад $Q_{197}-R_{198}$ людського SNAP-25 (SEQ ID NO: 5) демонструє розщеплюваний зв'язок P_1-P_1' для сайту розщеплювання BoNT/A. Сам по собі "SNAP-25, що має С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A" може бути будь-яким продуктом розщеплювання SNAP-25, що має глутамін на своїй С-кінцевій амінокислоті, де глутамін представляє Q_{197} розщеплюваного зв'язку. Як ще один приклад $K_{204}-H_{205}$ Torpedo marmorata SNAP-25 (SEQ ID NO: 16) представляє розщеплюваний зв'язок P_1-P_1' для сайту розщеплювання BoNT/A. Сам по собі "SNAP-25, що має С-кінцевий лізин розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A" може бути будь-яким продуктом розщеплювання SNAP-25, що має лізин на своїй С-кінцевій амінокислоті, де лізин є K_{204} розщеплюваного зв'язку.

Антиген SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A з сайту розщеплювання BoNT/A, може бути модифікований для посилення імуногенності антигена SNAP-25, гаптену або будь-якої іншої антигенної сполуки, що є імуногенною, неімуногенною або слабо імуногенною, коли не асоціюється з модифікацією. У аспекті цього втілення С-кінцевий залишок P_1 розщеплюваного зв'язку антигену SNAP-25 може бути карбоксильований. Карбоксилування збільшує бажані імуногенні властивості антигену SNAP-25 в двох аспектах. По-перше, оскільки заряджені амінокислоти підсилюють імуногенність, то додавання групи COO^- до С-кінцевого залишку збільшує загальну імуногенність антигену SNAP-25. По-друге, оскільки залишок P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A знаходиться в зарядженому стані при розщеплюванні, то додавання групи COO^- до С-кінцевого залишку краще імітуватиме реальний антиген, проти якого розробляється антитіло α -SNAP-25, розкрите в даному описі, для пов'язання з ним.

У одному з аспектів цього втілення N-кінцевий залишок антигена SNAP-25 може бути модифікований шляхом додавання амінокислоти, адаптованої для приєднання антигену SNAP-25 до білка-носія, такому як, наприклад гемоціанін лімфи равлика (KLH), овальбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий трипсиновий інгібітор (STI) або множинний антигенний пептид (MAP). Наприклад, цистеїновий залишок може бути поміщений в N-кінець для кон'югації білка-носія KLH.

Таким чином, як втілення антиген SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати довжину, наприклад, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9, щонайменше 10, щонайменше 11, щонайменше 12, щонайменше 13, щонайменше 14, щонайменше 15, щонайменше 16, щонайменше 17, щонайменше 18, щонайменше 19, щонайменше 20, щонайменше 25, або, щонайменше 30 амінокислот. У ще одному втіленні антиген SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати довжину, наприклад, максимум 5, максимум 6, максимум 7, максимум 8, максимум 9, максимум 10, максимум 11, максимум 12, максимум 13, максимум 14, максимум 15, максимум 16, максимум 17, максимум 18, максимум 19, максимум 20, максимум 25, або максимум 30 амінокислот. У ще одному втіленні антиген SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати довжину, наприклад 7-12 амінокислот, 10-15 амінокислот

або 13-18 амінокислот.

У ще одному втіленні антиген SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, містить SEQ ID NO: 32. У аспектах цього втілення антиген SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, містить SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, або SEQ ID NO: 148. У ще одному втіленні антиген SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, містить SEQ ID NO: 38.

У ще одному втіленні антиген SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, містить SEQ ID NO: 39. У аспектах цього втілення антиген SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, містить SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 або SEQ ID NO: 44. У ще одному втіленні антиген SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, містить SEQ ID NO: 45.

Передбачається, що будь-який і всі антигени SNAP-25, що запускають імунну відповідь, продукуючого антитіла α-SNAP-25, яке зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, можуть бути корисні як антиген SNAP-25. Таким чином, варіанти N-кінцевої послідовності, SEQ ID NO, що містять: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, або SEQ ID NO: 148 можуть бути корисні як антиген SNAP-25 для запуску імунної відповіді, продукуючого антитіла α-SNAP-25, яке зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Таким чином, у втіленні антиген SNAP-25 може мати, щонайменше 1, щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, або, щонайменше 5 амінокислотних замін, делецій або вставок щодо антигенів SNAP-25, SEQ ID NO, що містять: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147 або SEQ ID NO: 148. У ще одному втіленні антиген SNAP-25 може мати, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або, щонайменше 95 % амінокислотну ідентичність з антигенами SNAP-25, SEQ ID NO, що містять: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147 або SEQ ID NO: 148.

Передбачається, що один або більше ніж один носій може бути пов'язаний з антигеном SNAP-25 для посилення імуногенності антигену SNAP-25, який є імуногенним, неімуногенним або слабо імуногенним, будучи не асоційованим з носієм. Винаходи, що не обмежують об'єм, приклади включають, наприклад гемоціанін лімфи равлика (KLH), овалбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий трипсиновий інгібітор (STI) або множинний антигенний пептид (MAP). Як добре відомо в області техніки, неантигенний або слабо антигенний антиген може стати антигенним шляхом пов'язання антигена з носієм. Різні інші носії і способи скріплення антигена з носієм добре відомі в області техніки. Дивися, наприклад Harlow and Lane, вище, 1998a; Harlow and Lane, вище, 1998b; і David W. Waggoner, Jr. et al., Immunogenicity-enhancing carriers and compositions thereof and methods of з використанням the same, публікація заявки на патент США №. 20040057958 (25 березня 2004 року). Епітоп також може бути одержаний шляхом експресії епітопу у вигляді злитого білка. Способи експресії поліпептидного злиття добре відомі фахівцям в даній області техніки, як описано, наприклад в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999). Як С-кінцевого кінця антигена SNAP-25 може бути залишком P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, носій має бути пов'язаний з N-кінцем антигену SNAP-25.

Передбачається, що один або більш ніж один гнучкий лінкер може бути пов'язаний з антигеном SNAP-25 для посилення імуногенності антигена SNAP-25, який є імуногенним, неімуногенним або слабо імуногенним, будучи не асоційованим з гнучкими лінкерами. Гнучкий лінкер збільшує загальну довжину пептиду антигену SNAP-25 і забезпечує гнучкість, таким чином полегшуючи правильну презентацію антигену SNAP-25 імунним клітинам. Як приклад, що не обмежує об'єм винахід, композиція може містити антиген SNAP-25, пов'язаний з одним або більш ніж одним гнучким лінкером в тандемі для більш хорошої презентації антигену SNAP-25 імунним клітинам, таким чином полегшуючи імунну відповідь.

Гнучкий лінкер, що містить пептид, має довжину щонайменше одну амінокислоту, і містить

не заряджену амінокислоту з невеликими R групами бічного ланцюга, таку як, наприклад гліцин, аланін, валін, лейцин або серин. Таким чином, втілення гнучкого лінкера може мати довжину, наприклад щонайменше 1, щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9, або, щонайменше 10 амінокислот. У ще одному втіленні гнучкий лінкер може мати довжину, наприклад щонайменше 1, максимально 2, максимально 3, максимально 4, максимально 5, максимально 6, максимально 7, максимально 8, максимально 9, або максимальні 10 амінокислот. У ще одному втіленні гнучкий лінкер може мати довжину, наприклад 1-3 амінокислоти, 2-4 амінокислоти, 3-5 амінокислот, 4-6 амінокислот або 5-7 амінокислот. Винаходи, що не обмежують об'єм, приклади гнучкого лінкера включають, наприклад G-спейсери, такі як GGG, GGGG (SEQ ID NO: 55), і GGGGS (SEQ ID NO: 56) або A-спейсери, такі як AAA, AAAA (SEQ ID NO: 57) і AAAAV (SEQ ID NO: 58). Гнучкий лінкер зв'язаний в рамці прочитування з антигеном SNAP-25 у вигляді злитого білка.

Як обговорювалося вище, гнучкий лінкер використовується, частково, для збільшення загальної довжини пептиду антигену SNAP-25. Наприклад антиген SNAP-25 з 5-10 амінокислот може мати загальну довжину, збільшену шляхом скріплення гнучкого лінкера з 3-5 амінокислот з N-кінцем антигена SNAP-25. Як ще один приклад антиген SNAP-25 з 5-10 амінокислот може мати загальну довжину, збільшену шляхом скріплення гнучкого лінкера з 4-6 амінокислот з N-кінцем антигену SNAP-25. Як ще один приклад антиген SNAP-25 з 5-10 амінокислот може мати загальну довжину, збільшену шляхом скріплення гнучкого лінкера з 7-10 амінокислот з N-кінцем антигену SNAP-25. Як ще один приклад антиген SNAP-25 з 7-12 амінокислот може мати загальну довжину, збільшену шляхом скріплення гнучкого лінкера з 1-3 амінокислот з N-кінцем антигену SNAP-25. Як ще один приклад антиген SNAP-25 з 7-12 амінокислот може мати загальну довжину, збільшену шляхом скріплення гнучкого лінкера з 4-6 амінокислот з N-кінцем антигену SNAP-25. Збільшена довжина, що забезпечується гнучким лінкером, дає можливість для вибору антигену SNAP-25 малого розміру, таким чином збільшуючи вірогідність того, що антиген SNAP-25 запускатиме тільки імунну відповідь по суті проти SNAP-25, що має C-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, таким чином збільшуючи вірогідність продукції антитіл α-SNAP-25, які можуть відрізнати SNAP-25, що має C-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, від SNAP-25, позбавленого C-кінця на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A.

Передбачається, що композиції, розкриті в даному описі, можуть можливо містити антиген SNAP-25, розкритий в даному описі, і один або більш ніж один ад'ювант. Використовуваний тут термін "ад'ювант", використовуваний з посиланням на композицію SNAP-25, відноситься до будь-якої речовини або суміші речовин, яка збільшує або диверсифікує імунну відповідь на антиген SNAP-25. Ад'ювант може, наприклад, служити для зменшення кількості імунізацій або кількості антигена, потрібного для захисної імунізації. Застосування ад'ювантів в композиції, що викликає імунну відповідь, добре відомо. Основне завдання цих ад'ювантів полягає в тому, щоб дати можливість для збільшення імунної відповіді. Ад'юванти, що не обмежують об'єм винаходу, включають, наприклад ліпосоми, масляні фази, що включають без обмеження ад'юванти Фрейнда, такі як, повний ад'ювант Фрейнда (FCA); неповний ад'ювант Фрейнда (FIA); сапогенінові глікозиди, такі як, наприклад сапоніни; карбопол; N-ацетилмураміл-L-аланіл-D-ізоглутамін (зазвичай відомий як мураміддипептид або "MDP"); і ліпополісахарид (LPS). Такі ад'юванти загалом використовуються у формі емульсії з водною фазою, або, зазвичай, можуть складатися з водорозчинних неорганічних солей. Ці неорганічні солі можуть полягати, наприклад з гідроксиду алюмінію, сульфату цинку, колоїдного гідроксиду заліза, ортофосфату кальцію або хлориду кальцію. Гідроксид алюмінію (Al(OH) 3) є зазвичай використовуваний ад'ювант. В даний час, єдиний схвалений FDA ад'ювант для використання людьми є солі алюмінію (алюм), використовувані для "запасання" антигенів шляхом осадження антигенів. Приведені вище ад'юванти всього лише є прикладами. Фактично в композиції SNAP-25, розкритій в даному описі, може бути використаний будь-який ад'ювант, а також ад'ювант, що задовольняє необхідним вимогам для індукції імунної відповіді.

Носій, розкритий в даному описі, також може служити як ад'ювант. Конкретні ад'юванти і способи їх одержання і застосування описані, наприклад в Gupta et al. Vaccine, 11: 993-306, 1993; Arnon, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987; і David W. Waggoner, Jr. et al., Immunogenicity-Enhancing Carriers and Compositions Thereof and Methods of 3 використанням the Same, публікація заявки на патент США №. 20040057958 (25 березня 2004 року). Додаткові ад'юванти включають будь-яку сполуку, описану в розділі 7 (стор. 141-227) в "Vaccine Design, The Subunit and Ад'ювант Approach" (eds. Powell, M. F. and Newman, M. J.) Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Plenum Press (New York). Приклади з даних вказівок

включають мурамідіпептид (MDP) і Montanide 720. Молекули, такі як поліінозин:цитозин (Poly I:C) або плазмідна ДНК, що містить мотиви CPG, також можуть бути введені як ад'юванти в комбінації з антигенами, інкапсульованими в мікрочастках. У ще одному прикладі ад'ювант є агент, який полегшує проникнення антигенної сполуки в цитоплазму клітини, таке як

5 листеріолізін, стрептолізін або їх суміш.

Таким чином, у втіленні композиція SNAP-25 містить антиген SNAP-25, що має карбоксильований глутамін С-кінцевий, пов'язаний з несучим пептидом. У аспектах цього втілення антиген SNAP-25, що має карбоксильований глутамін С-кінцевий, містить SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147 або SEQ ID NO: 148. У ще одному аспекті цього втілення антиген SNAP-25 містить SEQ ID NO: 38. У аспектах цього втілення несучим пептидом є гемоціанін лімфи равлика (KLH), овальбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий трипсиновий інгібітор (STI) або множинний антигенний пептид (MAP).

У ще одному втіленні композиція SNAP-25 містить антиген SNAP-25, що має карбоксильований С-кінцевий лізін, пов'язаний з несучим пептидом. У аспектах цього втілення антиген SNAP-25, що має карбоксильований С-кінцевий лізін, містить SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 або SEQ ID NO: 44. У ще одному аспекті цього втілення антиген SNAP-25 містить SEQ ID NO: 45. У аспектах цього втілення несучим пептидом, є гемоціанін лімфи равлика (KLH), овальбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий трипсиновий інгібітор (STI) або множинний антигенний пептид (MAP).

У ще одному втіленні композиція SNAP-25 містить антиген SNAP-25, що має карбоксильований С-кінцевий глутамін, пов'язаний з одним або більш ніж одним гнучким лінкером, і несучим пептид, де гнучкі лінкери розташовані між антигеном SNAP-25 і несучим пептидом. У аспектах цього втілення антиген SNAP-25, що має карбоксильований С-кінцевий глутамін, містить SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, або SEQ ID NO: 148. У ще одному втіленні антиген SNAP-25 містить SEQ ID NO: 46. У аспектах цього втілення несучим пептидом є гемоціанін лімфи равлика (KLH), овальбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий трипсиновий інгібітор (STI) або множинний антигенний пептид (MAP). У аспектах цього втілення гнучкий лінкер є G-спейсер або A-спейсер.

У ще одному втіленні композиція SNAP-25 містить антиген SNAP-25, що має карбоксильований С-кінцевий лізін, пов'язаний з гнучким лінкером, і несучий пептид, де гнучкий лінкер розташовується між антигеном SNAP-25 і несучим пептидом. У аспектах цього втілення антиген SNAP-25, що має карбоксильований С-кінцевий лізін, містить SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 або SEQ ID NO: 44. У ще одному аспекті цього втілення антиген SNAP-25 містить SEQ ID NO: 47. У аспектах цього втілення несучим пептидом є гемоціанін лімфи равлика (KLH), овальбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий трипсиновий інгібітор (STI) або множинний антигенний пептид (MAP). У аспектах цього втілення гнучкий лінкер є G-спейсер або A-спейсер.

Аспекти даного опису включають частково спосіб продукції антитіл α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25. Антитіло α -SNAP-25, яке зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, можуть бути одержані за допомогою широкої різноманітності способів, які добре відомі в області техніки. Специфічні протоколи одержання і використання антитіл, а також виявлення і вимірювання антитілозв'язуючої специфічності, зв'язуючими афінності і зв'язуючою авідності добре відомі в області техніки. Дивися, наприклад *Antibodies: A Laboratory Manual* (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998a); і 3 використанням *Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I* (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2001; і *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004; David Anderson et al., *Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use*, U.S. Patent 7,034,132 (Apr. 25, 2005); і Beatriz M. Carreno et al., *Antibodies Against CTLA4*, U.S. Patent 7,034,121 (Apr. 25, 2006).

Як винахід прикладу поліклональних антитіл, що не обмежує об'єм α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, можуть бути одержані шляхом ін'єкції тварині, такий як, наприклад кролик, коза, миша або інший ссавець, одній або більш ніж одній ін'єкції композиції, розкритої в даному описі. Як ще один винахід прикладу, що не обмежує

об'єм, поліклональні антитіла α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, можуть бути одержані шляхом ін'єкції в яйце, таке як, наприклад куряче яйце, одній або більш ніж одній ін'єкції композиції, розкритої в даному описі. Титр антитіла в імунізованій тварині можна контролювати протягом часу за допомогою стандартних способів, таких як за допомогою імуноферментного аналізу (ELISA) з використанням іммобілізованого антигену або клітинного аналізу активності. За бажання поліклональні антитіла α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, можуть бути виділені у ссавця (з корови) і додатково очищені за допомогою добре відомих способів, таких як аффінна хроматографія на білці А, з одержанням фракції IGG, або за допомогою аффінного очищення проти пептиду, використовуваного для продукції антитіл.

Як ще один приклад, що не обмежує об'єм винаходу, моноклональне антитіло α -SNAP-25, яке зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може бути одержане з використанням гібридомної технології. Дивися, наприклад розділ 6 в *Monoclonal Antibodies*, стор. 196-244, Harlow & Lane, вище, 1998a; і розділ 7 *Growing Hybridomas*, стор. 245-282, Harlow & Lane, вище, 1998a; і Goding, стор. 59-103, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986). У цьому способі тварині-господареві, такій як, наприклад миша, хом'як або інша відповідна тварина-господар типово вводять одну або більш ніж одну ін'єкцію антигену SNAP-25, розкритого в даному описі, для того, щоб викликати продукцію лімфоцитів, що продукують або здатних продукувати антитіло α -SNAP-25, яке специфічно зв'язується з SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Титр антитіла у імунізованій тварині можна контролювати протягом часу за допомогою стандартних способів, таких як за допомогою імуноферментного аналізу (ELISA) з використанням іммобілізованого антигену, або клітинного аналізу активності. Альтернативно, лімфоцити можуть бути імунізовані *in vitro* з використанням відповідної лінії культури клітин. У відповідний момент часу після імунізації, наприклад коли титр антитіл є найвище, клітини, що продукують антитіло, виділяють з тварини. Як правило, лімфоцити периферичної крові використовують в тому випадку, якщо бажані клітини людського походження, або використовують клітини селезінки, або клітини лімфатичних вузлів, якщо як джерела бажані ссавці, що відрізняються від людей. Виділені клітини, що продукують антитіло, зливають з імморталізованою клітинною лінією з використанням відповідного агента для злиття, такого як поліетиленгліколь, з одержанням клітини гібридами. Імморталізованні клітинні лінії зазвичай є трансформованими клітинами ссавця, зокрема клітини міеломи гризунів, корів і людей. Типово, клітинну лінію мишачої міеломи зливають із спленоцитами, відібраними відповідним чином у імунізованій миші, з утворенням гібридом. Переважні імморталізованні клітинні лінії є клітинні лінії мишачої міеломи, які чутливі до культурального середовища, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (HAT). Будь-яка з безлічі міеломних клітинних ліній може бути використана як партнер злиття відповідно до стандартних способів, наприклад лінії міеломи P_3 -NS1/1-Ag4-1, P_3 -x63-Ag8.653 або Sp2/O-Ag14. Гібридомні клітини, що виникають в результаті злиття, потім відбирають з використанням середовища HAT, яке вбиває клітини міеломи, що не зливаються і непродуктивно зливаються (спленоцити, що не зливаються, гинуть через декілька днів в культурі з огляду на те, що вони не трансформовані). Культуральне середовище, в якому ростуть гібридомні клітини, потім може бути проаналізована відносно присутності моноклональних антитіл α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Наприклад супернатанти гібридами можуть бути відібрані з використанням α -SNAP-25 позитивних середовищ в аналізі імунопреципітації, аналізі скріплення *in vitro*, такому як, імуноферментний аналіз (ELISA), або в клітинному аналізі активності. Такі способи і аналізи добре відомі в області техніки. Дивися, наприклад розділ 11 *Immunoprecipitation*, стор. 421-470, Harlow & Lane, вище, 1998a; розділ 12 *Immunoblotting*, стор. 471-510, Harlow & Lane, вище, 1998a; розділ 14 *Immunoassays*, стор. 553-612, Harlow & Lane, вище, 1998a. Додаткові дослідження потім можуть бути проведені для визначення того, чи є антитіло також нереактивним відносно SNAP-25, позбавленого С-кінця на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Аффіність скріплення моноклонального антитіла α -SNAP-25 також може бути визначена, наприклад за допомогою аналізу Ськетчарда. Дивися, наприклад Peter J. Munson and David Rodbard, *Ligand: A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand-Binding Systems*, 107(1) *Anal. Biochem.* 220-239 (1980). Після ідентифікації бажаних клітин гібридами способи обмежуючого розведення використовують для

виділення клонів, що походять з одиначної клітини до одержання клональної клітинної лінії, експресуючої бажане моноклональне антитіло. Це антитіло достатньо вибіркоче відносно SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, і що пов'язує з достатньо високою авідністю, вибрано для подальшого встановлення характеристик і дослідження.

Як ще одна альтернатива одержання моноклонального антитіла α-SNAP-25, яке зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, здійснюють шляхом скринінгу рекомбінантної комбінаторної імуноглобулінової бібліотеки, такий як, наприклад бібліотека антитіл на основі фагового дисплею, з пептидом SNAP-25, і виділяють члени імуноглобулінової бібліотеки, які зв'язуються з SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Набори для одержання і скринінгу бібліотек на основі фагового дисплею є у продажу, такі як, наприклад the Recombinant Phage Antibody System (Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ); і SurfZAP™ Phage Display Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Додатково, приклади способів і реагентів, корисні для одержання і скринінгу бібліотеки дисплею антитіл можна знайти, наприклад в Ladner et al. патент США 5223409; Borrebaeck et al. патент США 5712089; Griffiths et al. патент США 5885793; Griffiths et al. патент США 5962255; McCafferty et al. патент США 5969108; Griffiths et al. патент США 6010884; Jespers et al. патент США 6017732; Borrebaeck et al. патент США 6027930; Johnson et al. патент США 6140471; McCafferty et al. патент США 6172197, кожен з яких включений тут шляхом посилання.

Аспекти даного опису включають, частково, збір зразка, що містить антитіло α-SNAP-25 або клітини, що продукують антитіло α-SNAP-25. Використовуваний тут термін "зразок, що містить антитіло α-SNAP-25 або клітини, що продукують антитіло α-SNAP-25" відноситься до будь-якого біологічного матеріалу, що містить або потенційно містить щонайменше одне антитіло α-SNAP-25, яке зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25. Передбачається, що будь-який і всі зразки, які можуть містити антитіло α-SNAP-25, яке зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, можуть бути використані в цьому способі, що включають без обмеження кров, плазму крові, сироватку крові і лімфотичну рідину. Також передбачається, що будь-яка клітина, здатна продукувати антитіло α-SNAP-25, яке зв'язується з С-кінцем, що містить епітоп, на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може бути використана в цьому способі, що включає без обмеження, клітини CD8, клітину CTL, хелперну Т-клітину і В-клітину. Різноманітність добре відомих способів може бути використано для відбору у індивіда зразка, що містить антитіло α-SNAP-25 або клітини, що продукують антитіло α-SNAP-25, наприклад Harlow & Lane, 1998a; і Harlow & Lane, 1998b. Аналогічно, різноманітність добре відомих способів може бути використано для обробки зразка для виділення антитіла α-SNAP-25, яке зв'язується з С-кінцем, що містить епітоп, на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Спосіб для відбору зразка може бути вибраний на основі типу антитіла, що виділяється. Як винахід прикладу, що не обмежує об'єм, коли виділяють поліклональні антитіла α-SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, відповідний зразок може бути зразком крові, що містить таке антитіло α-SNAP-25, тоді як при виділенні моноклональних антитіл α-SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, відповідний зразок може бути клітиною, що продукує антитіло α-SNAP-25, такою як клітина селезінки або гібридоми.

Аспекти даного опису включають, частково, виділення із зразка антитіла α-SNAP-25, яке зв'язується з С-кінцем, що містить епітоп, на залишку P₁ з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25. Способи виділення такого антитіла α-SNAP-25, такого як, наприклад поліклональне антитіло α-SNAP-25, яке зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, або моноклональне антитіло α-SNAP-25, яке зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, добре відомі фахівцям в даній області техніки. Дивися, наприклад Harlow and Lane, вище, 1998a; і Harlow and Lane, вище, 1998b. Наприклад, такі поліклональні антитіла α-SNAP-25 можуть бути виділені із зразка за допомогою добре відомих способів, таких як, наприклад афінна хроматографія з використанням білка А

або білка G, яка дозволяє одержати перш за все фракцію IGG імунної сироватки крові. Потім, або альтернативно, специфічний антиген SNAP-25 може бути іммобілізований на колонці або магнітних частинках для очищення поліклональних антитіл α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, за допомогою імуноафінної хроматографії. Моноклональні антитіла α -SNAP-25, які зв'язуються з С-кінцем, що містить епітоп, на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, можуть бути виділені з культурального середовища або асцитної рідини за допомогою звичайних способів очищення імуноглобулінів, таких як, наприклад білок А-сефароза, гідроксипатитна хроматографія, гель-електрофорез, діаліз або афінна хроматографія.

Таким чином, у втіленні спосіб продукції антитіла α -SNAP-25, яке зв'язується з С-кінцем, що містить епітоп, на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, включає стадії (а) введення тварині композиції, що містить антиген SNAP-25, що має карбоксильований С-кінцевий глутамін, пов'язаний з пептидом-носієм;

(б) відбору у тваринного зразка, що містить антитіло α -SNAP-25 або клітини, що продукують антитіло α -SNAP-25; і

(в) виділення компоненту антитіла α -SNAP-25 із зразка. У аспекті цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке зв'язується з С-кінцем, що містить епітоп, на залишку P_1 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, є поліклональне антитіло. У ще одному аспекті цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке зв'язується з С-кінцем, що містить епітоп, на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, є моноклональне антитіло. У ще одному аспекті цього втілення продукують моноклональні антитіла α -SNAP-25, які зв'язуються з С-кінцем, що містить епітоп, на залишку P_1 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, мають підтип IGG. У інших аспектах цього втілення композиція SNAP-25 додатково містить ад'ювант, такий як, наприклад поліетиленгліколь (PEG), монометоксиполіетиленгліколь (mPEG) або полівініловий спирт (PVA).

У ще одному втіленні спосіб продукції антитіл α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, включає стадії (а) введення тварині композиції, що містить пептид SNAP-25, що має карбоксильований С-кінцевий глутамін, пов'язаний з гнучким лінкером, і несучий пептид, де гнучкий лінкер розташовується між пептидом SNAP-25 і несучим пептидом;

(б) відбору у тваринного зразка, що містить антитіло α -SNAP-25 або клітини, що продукують антитіло α -SNAP-25; і

(в) виділення антитіла α -SNAP-25 із зразка. У аспекті цього втілення антитіла α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, є поліклональні антитіла. У ще одному аспекті цього втілення антитіла α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, є моноклональні антитіла. У ще одному аспекті цього втілення продукують моноклональні антитіла α -SNAP-25, які зв'язуються з С-кінцем, що містить епітоп, на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, мають підтип IGG. У інших аспектах цього втілення композиція SNAP-25 додатково містить ад'ювант, такий як, наприклад поліетиленгліколь (PEG), монометоксиполіетиленгліколь (mPEG) або полівініловий спирт (PVA).

Аспекти даного опису включають, частково, виділене антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Використовуваний тут термін "виділені" відноситься до виділення молекули з її природного оточення за допомогою людського втручання. Використовуваний тут термін "антитіло" відноситься до молекули, продлущуючої імунною системою у відповідь на конкретний антиген, який специфічно зв'язується з цим антигеном, і включає антитіло, що зустрічається в природі, і антитіло, що не зустрічається в природі. Використовуваний тут термін " α -SNAP-25" є синонімом "анти-SNAP-25" і відноситься до антитіла, яке зв'язується з антигеном SNAP-25. Наприклад, антитілом можуть бути поліклональне антитіло, моноклональне антитіло, димір, мультимір, мультиспецифічне антитіло, гуманізоване антитіло, химерне антитіло, біфункціональне антитіло, асоційоване з клітиною антитіло, таке як рецептор Ig, лінійне антитіло, діатіло або мінітіло, до тих пір, поки фрагмент демонструє бажану біологічну активність, і їх одноланцюгові похідні. Антитіло може бути повнорозмірною молекулою імуноглобуліну, що містить домени VH і VL, а також константний домен легкого ланцюга (CL) і

константні домени важкого ланцюга, CH_1 , CH_2 і CH_3 , або імунологічно активний фрагмент повнорозмірної молекули імуноглобуліну, такої як, наприклад Fab фрагмент, $F(ab')_2$ фрагмент, F_c фрагмент, F_d фрагмент, F_v фрагмент. Антитіло може походити з будь-якого виду хребтної тварини (наприклад людини, кози, коня, осла, миші, щура, кролика або курчати), і може мати будь-який тип (наприклад IGG, IGE, IGM, IGD і IGA), клас (наприклад IGA, IGD, IGE, IGG і IGM) або підклас (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2). Загальний опис структури антитіла, що зустрічається в природі, не зустрічається в природі антитіла і його антигенних фрагментів, що зв'язуються із сполуком, наприклад в Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2d ed. (Oxford University Press 1995), кожна з яких включена тут шляхом посилання.

Антитіла, що зустрічаються в природі, зазвичай є гетеротетрамірні глікопротеїнами приблизно 150000 дальтон, складаються з двох ідентичних легких (L) ланцюгів і двох ідентичних важких (H) ланцюгів. Кожен легкий ланцюг пов'язаний з важким ланцюгом за допомогою одного ковалентного дисульфідного зв'язку, хоча кількість дисульфідних зв'язків розрізняється між важкими ланцюгами різних ізотипів імуноглобуліну. Кожен важкий і легкий ланцюг також має регулярно розташовані міжланцюгові дисульфідні містки. Кожен важкий ланцюг має з одного кінця варіабільний домен (VH), за яким слідує безліч константних доменів. Кожен легкий ланцюг має варіабільний домен з одного кінця (VL) і константний домен з іншого кінця. Константний домен легкого ланцюга суміщений з першим константним доменом важкого ланцюга, і варіабільний домен легкого ланцюга суміщений з варіабільним доменом важкого ланцюга. Вважають, що конкретні амінокислотні залишки утворюють простір між варіабільними доменами легкого ланцюга і важкого ланцюга.

Повний сайт розпізнавання антигена і скріплення антигена міститься у варіабільних доменах антитіла, тобто F_v фрагмент. Цей фрагмент включає димір одного варіабільного домена важкого ланцюга (VH) і одного варіабільного домена легкого ланцюга (VL) в тісній нековалентній асоціації. Кожен домен містить чотири скелетні області (FR), які в основному приймають конфігурацію α -листа, зв'язані трьома гіперваріабільними областями, які утворюють петлі, що зв'язують, і в деяких випадках створюючи частину структури α -листа. Кожна гіперваріабільна область містить амінокислотну послідовність, відповідну гіперваріабільним ділянкам (CDR). В сукупності, вона є тривимірною конфігурацією шести областей CDR, які визначають антигензв'язуючий сайт на поверхні диміра VH-VL, який визначає антигензв'язуючу специфічність. Дивися, наприклад Cyrus Chothia, et al., *Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions*, *Nature* 342(6252): 877-883 (1989); Elvin A. Kabat, et al *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), кожна з яких включена тут шляхом посилання. Константні домени антитіла не залучені безпосередньо в пов'язання антитіла з антигеном, але демонструють різні ефекторні функції, такі як участь антитіла в залежній від антитіла клітинній цитотоксичності.

Антиген-мішень як правило має один або більш ніж один сайт скріплення, також званий епітопами, який розпізнається утворенням CDR антигензв'язуючим сайтом. Використовуваний тут "епітоп" є синонімом "антигенної детермінанти" і відноситься до сайту на антигені-мішені, такий як, наприклад пептид, полісахарид або ліпідомістяща молекула, здатна до специфічного пов'язання з імуноглобуліном або Т-клітинним рецептором або іншої взаємодії з молекулою. Кожне антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом, що відрізняється, має структуру, що відрізняється. Таким чином, один антиген може мати більш ніж одне відповідне антитіло.

Поліклональні антитіла відносяться до гетерогенної популяції молекул антитіл, які містять щонайменше два види антитіл, здатних зв'язуватися з конкретним антигеном. Відповідно до визначення поліклональне антитіло включає два різні антитіла, які зв'язуються з щонайменше двома різними епітопами. Використовуваний тут термін "моноклональне антитіло" або "моноклональні антитіла" відносяться до гомогенної популяції молекул антитіл, які містять тільки один вид антитіл, здатний зв'язуватися з конкретним антигеном, тобто індивідуальні антитіла, складові популяції, ідентичні за винятком можливих мутацій, що зустрічаються в природі, які можуть бути представлені в мінорних кількостях. Відповідно до визначення моноклональне антитіло зв'язується з одиничним епітопом. Моноклональні антитіла є високоспецифічними, оскільки направлені проти одиничного антигенного сайту. Крім того, в протилежність поліклональним антитілам, кожне моноклональне антитіло направлено проти одиничної детермінанти на антигені. Додатково до своєї специфічності моноклональні антитіла сприятливі в тому, що вони можуть синтезуватися без домішок інших антитіл. Визначення "моноклональні" указує на характер антитіла, одержаного з по суті гомогенної популяції антитіл, і його не слід розглядати, як вимогу продукції антитіла за допомогою якого-небудь конкретного

чину. Наприклад моноклональні антитіла, використовувані відповідно до даного опису, можуть бути одержані за допомогою гібридомної технології, вперше описаної Kohler et al (1975) Nature 256:495, або можуть бути одержані за допомогою способів рекомбінантної ДНК (дивися, наприклад: патент США № 4816567; патент США №. 5807715). Моноклональні антитіла також

можуть бути виділені з бібліотек фагового антитіла з використанням способів, описаних, наприклад Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597. Таким чином, у втіленні антитіло α -SNAP-25 містить варіабільний домен важкого ланцюга (VH) і варіабільний домен легкого ланцюга (VL), які вибірково зв'язуються з SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. У аспекті цього втілення варіабільний домен важкого ланцюга (VH) є SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80 або SEQ ID NO: 82. У ще одному аспекті цього втілення варіабільний домен легкого ланцюга (VL) є SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 або SEQ ID NO: 92.

У ще одному втіленні антитіло α -SNAP-25 містить CDR₁ область, CDR₂ область, CDR₃ область варіабільного домена важкого ланцюга (VH), або будь-яку їх комбінацію, яка вибірково зв'язується з SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. У аспекті цього втілення CDR₁ область варіабільного домена важкого ланцюга (VH) є SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 або SEQ ID NO: 120. У ще одному аспекті цього втілення CDR₂ область варіабільного домена важкого ланцюга (VH) є SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, або SEQ ID NO: 123. У ще одному аспекті цього втілення CDR₃ область варіабільного домена важкого ланцюга (VH) є SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 або SEQ ID NO: 124.

У ще одному втіленні антитіло α -SNAP-25 містить CDR₁ область, CDR₂ область, CDR₃ область варіабільного домена легкого ланцюга (VL) або будь-яку їх комбінацію, яка вибірково зв'язується з SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. У аспекті цього втілення CDR₁ область варіабільного домена легкого ланцюга (VL) є SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128 або SEQ ID NO: 129. У ще одному аспекті цього втілення CDR₂ область варіабільного домена легкого ланцюга (VL) є SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 або SEQ ID NO: 112. У ще одному аспекті цього втілення CDR₃ область варіабільного домена легкого ланцюга (VL) є SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 або SEQ ID NO: 117.

У ще одному втіленні антитіло α -SNAP-25 специфічно зв'язується з епітопом, що містить SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. У аспекті цього втілення епітоп містить SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147 або SEQ ID NO: 148. У аспекті цього втілення епітоп містить SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 або SEQ ID NO: 44.

Як обговорювалося вище, послідовність, що оточує сайт розщеплювання BoNT/A, представлена в SNAP-25, позначається $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$, де P_1-P_1' є розщеплюваним зв'язком. При розщеплюванні під дією BoNT/A продукти розщеплювання, що утворюються в результаті, містять фрагмент, що включає послідовність $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$, і фрагмент, включаючий $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$. Використовуваний тут термін "антитіло α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 продукту розщеплювання SNAP-25 з розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A" відноситься до антитіл α -SNAP-25, які вибірково зв'язуються з будь-яким фрагментом продукту розщеплювання SNAP-25, що містить послідовність $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$, але не до будь-якого фрагмента продукту розщеплювання SNAP-25, що містить послідовність $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$, або до будь-якого SNAP-25, що має інтактний розщеплюваний зв'язок P_1-P_1' сайту розщеплювання BoNT/A. Використовуваний тут термін "антитіло α -SNAP-25197" відноситься до антитіла, яке вибірково зв'язується з SNAP-25, що має на С-кінцевий залишок P_1 , який відповідає глутаміну 197 в SEQ ID NO: 5. Використовуваний тут термін "антитіло α -SNAP-25204" відноситься до антитіла, яке вибірково зв'язується з SNAP-25, що має С-кінцевий залишок P_1 , який відповідає лізину 204 в SEQ ID NO: 16.

Використовуваний тут термін "вибірково" відноситься до того, що має унікальну дію або вплив, або вступаючи у взаємодію тільки одним чином або тільки з одним об'єктом. Використовуваний тут термін "вибірково зв'язується", коли застосовується з посиланням на антитіло, відноситься до різного пов'язання антитіла з вказаним епітопом-мішенню, таким чином, що антитіло по суті не надає перехресної взаємодії з епітопами, що відрізняються від

епітопів-мішеней. Мінімальний розмір визначеного тут пептидного епітопа складає приблизно п'ять амінокислот, і пептидний епітоп типово містить щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9, щонайменше 10, щонайменше 15 або, щонайменше 20 амінокислот. Пептидний епітоп може бути переривистим, тобто він містить амінокислотні залишки, які не є сусідніми з первинною структурою пептиду, але разом приносяться в епітоп завдяки вторинній, третинній або четвертинній структурі пептиду. Крім того, також відзначають, що епітоп може містити фрагмент молекули, що відрізняється від амінокислотної послідовності, такий як, наприклад вуглеводневе угруповання, ліпідне угруповання, таке як ліпопротеїни або гліколіпіди, або хімічно модифіковане амінокислотне угруповання, таке як амінокислота, що фосфорилує. У аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може вибірково зв'язуватися з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, що містить щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9, щонайменше 10, щонайменше 15 або, щонайменше 20 амінокислот. У інших аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може вибірково зв'язуватися з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, що містить максимально 5, максимально 6, максимально 7, максимально 8, максимально 9, максимально 10, максимально 15 або максимальні 20 амінокислот.

Виборче скріплення включає зв'язуючі властивості, такі як, наприклад аффіність скріплення, специфічність скріплення і авидність скріплення. Дивися David J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, pp. 240 (1998). Аффіність скріплення відноситься до тривалого проміжку часу, протягом якого антитіло залишається на сайті скріплення епітопа, і може бути розглянута як сила, з якою антитіло зв'язується зі своїм епітопом. Аффіність скріплення може бути описана як рівноважна константа дисоціації антитіла (KD), яка визначається як відношення K_d/K_a в стані рівноваги. Де K_a є константою швидкості асоціації антитіла і K_d є константою швидкості дисоціації антитіла. Аффіність скріплення визначається як асоціацією, так і дисоціацією і самостійно ні висока асоціація, ні низька дисоціація не можуть забезпечити високу аффіність. Константа швидкості асоціації (K_a), або швидкість асоціації (K_{on}) вимірює кількість скріплень в одиницю часу, або схильність антитіла і антигена оборотно асоціювати в комплекс антитіло-антиген. Константа швидкості асоціації виражається в $M^{-1} s^{-1}$, і розраховується таким чином: $[Ab] \times [Ag] \times K_{on}$. Чим більша константа швидкості асоціації, тим швидше антитіло зв'язується зі своїм антигеном, або вище за аффіність скріплення між антитілом і антигеном. Константа швидкості дисоціації (K_d) або швидкість дисоціації (K_{off}) вимірює кількість подій дисоціації в одиницю часу або схильність комплексу антитіло-антиген оборотно розділятися (диссоціювати) на молекули, що становлять, а саме антитіло і антиген. Константа швидкості дисоціації виражається в s^{-1} , і розраховується таким чином: $[Ab+Ag] \times K_{off}$. Чим менша константа швидкості дисоціації, тим тісніше зв'язано антитіло зі своїм антигеном або вище за аффіність скріплення між антитілом і антигеном. Рівноважна константа дисоціації (KD) вимірює швидкість, з якою утворюються нові комплекси антитіло-антиген, і вона дорівнює швидкості, з якою комплекси антитіло-антиген диссоціюють в рівновазі. Рівноважна константа дисоціації виражається в M, і визначається як $K_{off}/K_{on} = [Ab] \times [Ag]/[Ab+Ag]$, де $[Ab]$ є молярною концентрацією антитіла, $[Ag]$ є молярною концентрацією антигена, і $[Ab+Ag]$ є молярною концентрацією комплексу антитіло-антиген, де всі концентрації є такими, що система знаходиться в рівновазі. Чим менше рівноважна константа дисоціації, тим тісніше зв'язано антитіло зі своїм антигеном, або вище за аффіність скріплення між антитілом і антигеном.

Таким чином, у втіленні аффіність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати константу швидкості асоціації, наприклад менше ніж $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, менше ніж $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, менше ніж $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, або менше ніж $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. У ще одному втіленні аффіність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати константу швидкості асоціації, наприклад більш ніж $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, більш ніж $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, більш ніж $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ або більш ніж $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. У інших аспектах аффіність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати константу швидкості асоціації від $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ до $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, від $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ до $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, від $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ до $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ або від $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ до $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$.

1.

У ще одному втіленні афінність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати константу швидкості дисоціації менше ніж $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ або менше ніж $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$. У інших аспектах цього втілення афінність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, можуть мати константу швидкості дисоціації, наприклад менше ніж $1,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $2,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $3,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $4,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $5,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $6,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $7,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $8,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ або менше ніж $9,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$. У ще одному втіленні афінність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати константу швидкості дисоціації, наприклад більш ніж $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, більш ніж $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ або більш ніж $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$. У інших аспектах цього втілення афінність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати константу швидкості дисоціації, наприклад більш ніж $1,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більш ніж $2,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більш ніж $3,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більш ніж $4,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більш ніж $5,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більш ніж $6,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більш ніж $7,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більш ніж $8,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ або більш ніж $9,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$.

У ще одному втіленні, афінність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, можуть мати рівноважну константу дисоціації менше ніж 0,500 нМ. У аспектах цього втілення афінність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, можуть мати рівноважну константу дисоціації, наприклад менше ніж 0,500 нМ, менше ніж 0,450 нМ, менше ніж 0,400 нМ, менше ніж 0,350 нМ, менше ніж 0,300 нМ, менше ніж 0,250 нМ, менше ніж 0,200 нМ, менше ніж 0,150 нМ, менше ніж 0,100 нМ або менше ніж 0,050 нМ. У ще одному втіленні афінність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати рівноважну константу дисоціації більш ніж 0,500 нМ. У аспектах цього втілення афінність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати рівноважну константу дисоціації, наприклад більш ніж 0,500 нМ, більш ніж 0,450 нМ, більш ніж 0,400 нМ, більш ніж 0,350 нМ, більш ніж 0,300 нМ, більш ніж 0,250 нМ, більш ніж 0,200 нМ, більш ніж 0,150 нМ, більш ніж 0,100 нМ або більш ніж 0,050 нМ.

У ще одному втіленні афінність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати константу швидкості асоціації для інтактного SNAP-25, наприклад менше ніж $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ або менше ніж $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. У ще одному втіленні афінність скріплення антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може мати константу швидкості асоціації для інтактного SNAP-25, наприклад максимально $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, максимально $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, максимально $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, максимально $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ або максимально $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Зв'язуюча специфічність є здатністю антитіла розрізняти молекулу, що містить його епітоп, і молекулу, яка не містить цей епітоп. Один з шляхів вимірювання зв'язуючої специфічності полягає в порівнянні K_{on} швидкості асоціації антитіла для молекули, що містить його епітоп, відносно K_{on} швидкості асоціації антитіла для молекули, яка не містить цей епітоп. Наприклад порівняння константи швидкості асоціації (K_a) антитіла α -SNAP-25 для епітопа SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, відносно SNAP-25, що не містить цей епітоп, такого як, наприклад епітоп SNAP-25, що не містить С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, або епітоп SNAP-25, що має інтактну P_1 -розщеплюваний зв'язок сайту розщеплювання BoNT/A. У аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, має константу швидкості асоціації (K_a) для SNAP-25, що не містить його епітоп(и), наприклад менше ніж $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менше ніж $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ або менше ніж $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. У інших аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, має константу швидкості асоціації (K_a) для SNAP-25, що не містить

його епітоп(и), наприклад максимально $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, максимально $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, максимально $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, максимально $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ або максимально $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

У інших аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, має константу швидкості асоціації (Ka) для свого епітопа відносно SNAP-25, що не містить цей епітоп, наприклад щонайменше в 2 рази більше, щонайменше в 3 рази більше, щонайменше в 4 рази більше, щонайменше в 5 разів більше, щонайменше в 6 разів більше, щонайменше в 7 разів більше, щонайменше в 8 разів більше або, щонайменше в 9 разів більше. У додаткових аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, має константу швидкості асоціації (Ka) для свого епітопа в порівнянні з SNAP-25, що не містить цей епітоп, наприклад щонайменше в 10 разів більше, щонайменше в 100 разів більше, щонайменше в 1000 разів більше або, щонайменше в 10000 разів більше. У інших аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, має константу швидкості асоціації (Ka) для свого епітопа в порівнянні з SNAP-25, що не містить цього епітопа, наприклад, максимально в 1 раз більше, максимально в 2 рази більше, максимально в 3 рази більше, максимально в 4 рази більше, максимально в 5 разів більше, максимально в 6 разів більше, максимально в 7 разів більше, максимально в 8 разів більше або максимально в 9 разів більше. У інших аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, має константу швидкості асоціації (Ka) для свого епітопа в порівнянні з SNAP-25, що не містить цього епітопа, наприклад максимально в 10 разів більше, максимально в 100 разів більше, максимально в 1000 разів більше або максимально в 10000 разів більше.

Зв'язуюча специфічність антитіла α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, також може бути охарактеризована як відношення, при якому антитіло α -SNAP-25 може відрізнити свій епітоп SNAP-25 від SNAP-25, що не містить цей епітоп, такий як, наприклад епітоп SNAP-25, позбавлений С-кінця на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, або епітоп SNAP-25, що має інтактний розщеплюваний зв'язок P_1 - P_1 сайту розщеплювання BoNT/A. У аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, має відношення зв'язуючої специфічності для його епітопа SNAP-25 до SNAP-25, що не містить цей епітоп, наприклад щонайменше 2:1, щонайменше 3:1, щонайменше 4:1, щонайменше 5:1, щонайменше 6:1, щонайменше 7:1, щонайменше 8:1, щонайменше 9:1, щонайменше 10:1, щонайменше 15:1, щонайменше 20:1, щонайменше 25:1, щонайменше 30:1, щонайменше 35:1 або, щонайменше 40:1. У інших аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, має відношення зв'язуючої специфічності для його епітопа SNAP-25 до SNAP-25, позбавленого С-кінця на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, наприклад щонайменше 2:1, щонайменше 3:1, щонайменше 4:1, щонайменше 5:1, щонайменше 6:1, щонайменше 7:1, щонайменше 8:1, щонайменше 9:1, щонайменше 10:1, щонайменше 15:1, щонайменше 20:1, щонайменше 25:1, щонайменше 30:1, щонайменше 35:1 або, щонайменше 40:1. У інших аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, має відношення зв'язуючої специфічності для його епітопа SNAP-25 до SNAP-25, що має інтактний розщеплюваний зв'язок P_1 - P_1 сайту розщеплювання BoNT/A, наприклад щонайменше 2:1, щонайменше 3:1, щонайменше 4:1, щонайменше 5:1, щонайменше 6:1, щонайменше 7:1, щонайменше 8:1, щонайменше 9:1, щонайменше 10:1, щонайменше 15:1, щонайменше 20:1, щонайменше 25:1, щонайменше 30:1, щонайменше 35:1 або, щонайменше 40:1.

Авідність скріплення, також відома як функціональна аффіність, відноситься до сукупності функціональної сили скріплення між мультвалентним антитілом і його антигеном. Молекули антитіла можуть мати більш ніж один сайт скріплення (наприклад 2 для IGG, 10 для IGM), і безліч антигенів містять більш ніж один антигенний сайт. Хоча авідність скріплення антитіла залежить від аффіностей скріплення індивідуальних сайтів скріплення антитіла, авідність скріплення більш ніж аффіність скріплення, оскільки всі взаємодії антитіло-антиген повинні порушуватися одночасно для того, щоб антитіло повністю диссоціювало. Передбачається, що антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку

P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може вибірково зв'язуватися з будь-яким і всіма епітопами для цього антитіла.

Таким чином, у втіленні антитіло α -SNAP-25 є антитілом α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. У аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25 є антитілом α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінцевий глутамін, або антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінцевий лізин. У інших аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25 є антитілом α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінцевий залишок P₁, відповідний глутаміну 197 в SEQ ID NO: 5, або антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінцевий залишок P₁, відповідний лізину 204 в SEQ ID NO: 16. У інших аспектах цього втілення антитіло α -SNAP-25 є антитілом α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має а С-кінцеву амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, або SEQ ID NO: 148.

Аспекти даного опису включають, частково, імунологічний спосіб виявлення активності BoNT/A. Імунологічні способи, розкриті в даному описі, можуть бути оцінені за допомогою декількох параметрів, що включають, наприклад правильність, точність, межу виявлення (LOD), межі кількісного визначення (LOQ), діапазон, специфічність, вибірковість, лінійність, міцність і придатність системи. Правильність способу полягає у вимірюванні акуратності аналітичного способу, або близькості вимірюваного значення і значення, яке признається, як загальноприйняте правильне значення, або прийнятне референсне значення. Точністю способу є ступінь згоди між результатами індивідуальних тестів, коли спосіб застосовується повторно відносно безлічі відібраних зразків з гомогенного зразка. Сама по собі точність оцінює 1) варіабільність усередині аналізу; 2) варіабільність протягом доби (повторюваність); і 3) варіабільність між добами (внутрішньолабораторна точність); і 4) варіабільність між лабораторіями (відтворюваність). Коефіцієнт варіації (CV%) є кількісною мірою точності, вираженою щодо середнього значення, що виявляється або теоретичного.

Імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має бути здатний виявляти відносну присутність комплексу антитіло α -SNAP-25-антиген, що містить SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Межа виявлення (LOD) способу відноситься до концентрації аналіта, яка викликає сигнал, який істотно відрізняється від негативного контролю або бланку, і є найменшою концентрацією аналіту, яка може відрізнитися від фону.

Таким чином, у втіленні імунологічного способу, розкритого в даному описі, може виявляти LOD для BoNT/A в кількості, яка істотно відрізняється від негативного контролю або бланка. У аспекті цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 10 нг або менше, 9 нг або менше, 8 нг або менше, 7 нг або менше, 6 нг або менше, 5 нг або менше, 4 нг або менше, 3 нг або менше, 2 нг або менше, 1 нг або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 900 пг або менше, 800 пг або менше, 700 пг або менше, 600 пг або менше, 500 пг або менше, 400 пг або менше, 300 пг або менше, 200 пг або менше, 100 пг або менше BoNT/A. У додаткових аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 90 пг або менше, 80 пг або менше, 70 пг або менше, 60 пг або менше, 50 пг або менше, 40 пг або менше, 30 пг або менше, 20 пг або менше, 10 пг або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 9 пг або менше, 8 пг або менше, 7 пг або менше, 6 пг або менше, 5 пг або менше, 4 пг або менше, 3 пг або менше, 2 пг або менше, 1 пг або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 0,9 пг або менше, 0,8 пг або менше, 0,7 пг або менше, 0,6 пг або менше, 0,5 пг або менше, 0,4 пг або менше, 0,3 пг або менше, 0,2 пг або менше, 0,1 пг або менше BoNT/A.

У ще одному аспекті цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 10 нМ або менше, 9 нМ або менше, 8 нМ або менше, 7 нМ або менше, 6 нМ або менше, 5 нМ або менше, 4 нМ або менше, 3 нМ або менше, 2 нМ або менше або 1 нМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 900 пМ або менше, 800 пМ або менше, 700 пМ або менше, 600 пМ або менше, 500 пМ або менше, 400 пМ або менше, 300 пМ або менше, 200 пМ або менше або 100 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 100 пМ або менше, 90 пМ або менше, 80 пМ або менше, 70 пМ або менше, 60 пМ або менше, 50 пМ або менше, 40 пМ або менше, 30 пМ або менше, 20 пМ

або менше або 10 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 10 пМ або менше BoNT/A, 9 пМ або менше, 8 пМ або менше, 7 пМ або менше, 6 пМ або менше, 5 пМ або менше, 4 пМ або менше, 3 пМ або менше, 2 пМ або менше або 1 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 1000 фМ або менше, 900 фМ або менше, 800 фМ або менше, 700 фМ або менше, 600 фМ або менше, 500 фМ або менше, 400 фМ або менше, 300 фМ або менше, 200 фМ або менше або 100 фМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 100 фМ або менше, 90 фМ або менше, 80 фМ або менше, 70 фМ або менше, 60 фМ або менше, 50 фМ або менше, 40 фМ або менше, 30 фМ або менше, 20 фМ або менше або 10 фМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOD, наприклад 10 фМ або менше, 9 фМ або менше, 8 фМ або менше, 7 фМ або менше, 6 фМ або менше, 5 фМ або менше, 4 фМ або менше, 3 фМ або менше, 2 фМ або менше або 1 фМ або менше ніж бутулінічний нейротоксин А.

Межі кількісного визначення (LOQ) є найменшою і найвищою концентраціями аналіту в зразку або пробі, які можуть бути зміряні з прийнятним рівнем правильності і точності. Нижня межа кількісного визначення відноситься до найменшої дози, яку спосіб виявлення може вимірювати систематично щодо фону. Верхня межа кількісного визначення є найвищою дозою, яку спосіб виявлення може вимірювати систематично до насичення сигналу. Лінійним діапазоном способу є площа між нижньою і верхньою межами кількісного визначення. Лінійний діапазон розраховується шляхом віднімання нижньої межі кількісного визначення з верхньої межі кількісного визначення. Використовуваний тут термін "відношення сигналу до шуму для нижньої асимптоти" відноситься до сигналу, що виявляється в способі на нижній межі виявлення, розділеного на фоновий сигнал. Використовуваний тут термін "відношення сигналу до шуму для верхньої асимптоти" відноситься до сигналу, що виявляється в способі на верхній межі виявлення, розділеного на фоновий сигнал.

Таким чином, у втіленні імунологічного способу, розкритого в даному описі, може виявляти LOQ для BoNT/A в кількості, яка істотно відрізняється від негативного контролю або бланка. У аспекті цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOQ, наприклад 10 нг або менше, 9 нг або менше, 8 нг або менше, 7 нг або менше, 6 нг або менше, 5 нг або менше, 4 нг або менше, 3 нг або менше, 2 нг або менше, 1 нг або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOQ, наприклад 900 пг або менше, 800 пг або менше, 700 пг або менше, 600 пг або менше, 500 пг або менше, 400 пг або менше, 300 пг або менше, 200 пг або менше, 100 пг або менше BoNT/A. У додаткових аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOQ, наприклад 90 пг або менше, 80 пг або менше, 70 пг або менше, 60 пг або менше, 50 пг або менше, 40 пг або менше, 30 пг або менше, 20 пг або менше, 10 пг або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOQ, наприклад 9 пг або менше, 8 пг або менше, 7 пг або менше, 6 пг або менше, 5 пг або менше, 4 пг або менше, 3 пг або менше, 2 пг або менше, 1 пг або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOQ, наприклад 0,9 пг або менше, 0,8 пг або менше, 0,7 пг або менше, 0,6 пг або менше, 0,5 пг або менше, 0,4 пг або менше, 0,3 пг або менше, 0,2 пг або менше, 0,1 пг або менше BoNT/A.

У ще одному аспекті цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOQ наприклад 10 нМ або менше, 9 нМ або менше, 8 нМ або менше, 7 нМ або менше, 6 нМ або менше, 5 нМ або менше, 4 нМ або менше, 3 нМ або менше, 2 нМ або менше, або 1 нМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOQ, наприклад 900 пМ або менше, 800 пМ або менше, 700 пМ або менше, 600 пМ або менше, 500 пМ або менше, 400 пМ або менше, 300 пМ або менше, 200 пМ або менше або 100 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOQ, наприклад 100 пМ або менше, 90 пМ або менше, 80 пМ або менше, 70 пМ або менше, 60 пМ або менше, 50 пМ або менше, 40 пМ або менше, 30 пМ або менше, 20 пМ або менше або 10 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOQ, наприклад 10 пМ або менше BoNT/A, 9 пМ або менше, 8 пМ або менше, 7 пМ або менше, 6 пМ або менше, 5 пМ або менше, 4 пМ або менше, 3 пМ або менше, 2 пМ або менше або 1 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOQ, наприклад 1000 фМ або менше, 900 фМ або менше, 800 фМ або менше, 700 фМ або менше, 600 фМ або менше, 500 фМ або менше, 400 фМ або менше, 300 фМ або менше, 200 фМ або менше або 100 фМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має

LOQ, наприклад 100 фМ або менше, 90 фМ або менше, 80 фМ або менше, 70 фМ або менше, 60 фМ або менше, 50 фМ або менше, 40 фМ або менше, 30 фМ або менше, 20 фМ або менше або 10 фМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має LOQ, наприклад 10 фМ або менше, 9 фМ або менше, 8 фМ або менше, 7 фМ або менше, 6 фМ або менше, 5 фМ або менше, 4 фМ або менше, 3 фМ або менше, 2 фМ або менше або 1 фМ або менше BoNT/A.

Імунологічний аналіз, корисний для практичного застосування аспекту розкритих способів, повинен мати точність не більш ніж 50 %. У аспектах цього втілення імунологічний аналіз має точність не більш ніж 50 %, не більш ніж 40 %, не більш ніж 30 %, або не більш ніж 20 %. У інших аспектах цього втілення імунологічний аналіз має точність не більш ніж 15 %, не більш ніж 10 %, або не більш ніж 5 %. У інших аспектах цього втілення імунологічний аналіз має точність не більш ніж 4 %, не більш ніж 3 %, не більш ніж 2 %, або не більш ніж 1 %.

Імунологічний аналіз, корисний для практичного застосування аспекту розкритих способів, повинен мати правильність, щонайменше 50 %. У аспектах цього втілення імунологічний аналіз має правильність щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 % або, щонайменше 80 %. У інших аспектах цього втілення імунологічний аналіз має правильність в меншій мірі 85 %, щонайменше 90 % або, щонайменше 95 %. У інших аспектах цього втілення імунологічний аналіз має правильність щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або, щонайменше 99 %.

Імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, повинен мати відношення сигналу до шуму для нижньої асимптоти, яке є статистично значущим, і відношення сигналу до шуму для верхньої асимптоти, яке є статистично значущим. У аспектах цього втілення імунологічний спосіб, розкритий в даному описі, має відношення сигналу до шуму для нижньої асимптоти, наприклад, щонайменше 3:1, щонайменше 4:1, по меншій мірі 5:1, щонайменше 6:1, щонайменше 7:1, щонайменше 8:1, щонайменше 9:1, щонайменше 10:1, щонайменше 15:1 або, щонайменше 20:1. У інших аспектах цього втілення імунологічний спосіб має відношення сигналу до шуму для верхньої асимптоти, наприклад, щонайменше 10:1, щонайменше 15:1, щонайменше 20:1, щонайменше 25:1, щонайменше 30:1, щонайменше 35:1, щонайменше 40:1, щонайменше 45:1, щонайменше 50:1, щонайменше 60:1, щонайменше 70:1, щонайменше 80:1, щонайменше 90:1, або, щонайменше 100:1, щонайменше 150:1, щонайменше 200:1, щонайменше 250:1, щонайменше 300:1, щонайменше 350:1, щонайменше 400:1, щонайменше 450:1, щонайменше 500:1, щонайменше 550:1 або, щонайменше 600:1.

Специфічність способу визначає здатність способу для вимірювання віжповідного аналіту, з виключенням інших компонентів, таких як наприклад частково активний або не активний аналіт. Вибірковість способу описує здатність аналітичного способу розрізняти різні речовини в зразку. Лінійність способу є його здатність викликати результати, які безпосередньо або за допомогою добре певного математичного перетворення пропорційні концентрації аналіту в зразку. Таким чином, втілення імунологічного способу, розкритого в даному описі, може відрізняти повністю активний BoNT/A від частково активного BoNT/A, що має, наприклад 70 % або менше, 60 % або менше, 50 % або менше, 40 % або менше, 30 % або менше, 20 % або менше, або 10 % або менше активності повністю активного BoNT/A.

Надійністю способу є відтворюваність результатів тесту одержаних для ідентичних зразків в нормальних (відсутність відхилень) умовах тесту. Робостність способу є мірою його здатності не змінюватися під дією невеликих, але навмисних варіацій в параметрах способу і вона приведена як показник надійності способу при нормальному застосуванні. Таким чином, тоді як надійність оцінює неминучі зміни, робостність оцінює навмисні зміни. Типові параметри, що оцінюються міцністю і робостністю, включають дії заморожування/відтавання, час інкубації, температура інкубації, термін придатності реагенту, приготування зразка, зберігання зразка, номер клітинного пасажу, безліч токсинів, варіабільність між очищеннями, і варіабільність між реакціями утворення розриву. Параметри робостності для клітинних аналізів включають бланк для клітин (початок, середина і кінець заморожування), рівень пасажу клітин, щільність клітинного засівання, щільність концентрованої суспензії клітин (скільки діб культури), вік клітин в колбі (час очікування до висівання), час інкубації, різні чашки, надмірні кількості сироватки крові і джерело реагентів. Системна придатність способу є визначенням якості аналізу, що включає якість реагентів і приладів, додатковий час на аналіз референсного стандарту. Системна придатність накладається відповідно до вказівок FDA, вказуючому на те, що устаткування, електроніка, якість аналізу і аналізовані зразки складають цілісну систему. Системна стабільність може бути оцінена шляхом тестування паралельності, яка при відкладанні на графіці залежності відповіді від логарифма дози, серійних розведень референсних зразків і серійних розведень зразків повинна привести до одержання паралельних кривих.

Аспекти даного опису включають, частково, клітину із стабільної клітинної лінії. Використовуваний тут термін "клітина" відноситься до будь-якої еукаріотичної клітини, чутливої до інтоксикації BoNT/A, або будь-якої еукаріотичної клітини, яка може захоплювати BoNT/A. Термін клітина охоплює клітини різних організмів, таких як, наприклад клітини миші, щура, свині, корови, коня, примату і людини; з різноманітності типів клітин, таких як, наприклад нейрональні і не нейрональні; і можуть бути виділені з або частини гетерогенної клітинної популяції, тканини або організму. Використовуваний тут термін "стійка клітинна лінія" є синонімом "імморталізована лінія клітин", або "трансформована лінія клітин" і відноситься до культури клітин, вибраних для необмеженого ділення з клітинної популяції, що походить з організму, тканини або органу. За визначенням стійка клітинна лінія виключає культуру первинних клітин. Використовуваний тут термін "первинними клітинами" є клітини, зібрані безпосередньо зі свіжих тканин або органів, і що не мають потенціалу до необмеженого ділення. Сійка клітинна лінія може містити гетерогенну популяцію клітин або однорідну популяцію клітин. Сійка клітинна лінія, що походить з одичної клітини, називається клональною клітинною лінією. Сійка клітинна лінія може бути такою клітинною лінією, в якій клітини ендогенно експресують всі компоненти, необхідні для того, щоб клітини могли зазнати загальний клітинний механізм, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25, і що охоплює пов'язання BoNT/A з рецептором BoNT/A, інтерналізацію комплексу нейротоксин/рецептор, транслокацію легкого ланцюга BoNT/A з внутріклітинної везикули в цитоплазму і протеолітичне розщеплювання SNAP-25. Альтернативно, стійка клітинна лінія може бути клітинною лінією, клітинам в якій з екзогенного джерела вводять щонайменше один компонент, необхідний клітинам для того, щоб зазнати загальний клітинний механізм, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25, і що охоплює пов'язання BoNT/A з рецептором BoNT/A, інтерналізацію комплексу нейротоксин/рецептор, транслокацію легкого ланцюга BoNT/A з внутріклітинної везикули в цитоплазму і протеолітичне розщеплювання SNAP-25. Також відносно генетично сконструйованої клітинної лінії, клітини з такої стійкої клітинної лінії можуть, наприклад експресувати екзогенний FGFR2, екзогенний FGFR3, екзогенний SV2, екзогенний SNAP-25 або будь-яку їх комбінацію.

Аспекти даного опису включають, частково, клітину із стабільної клітинної лінії, чутливу до інтоксикації BoNT/A. Використовувані тут терміни "клітина(и), чутлива(і) до інтоксикації BoNT/A", "клітина(и), чутлива(і) до інтоксикації BoNT/A" або "клітина(и) із стабільної клітинної лінії, чутлива(і) до інтоксикації BoNT/A" відносяться до клітини, яка(і) може(уть) зазнати загальний клітинний механізм, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25, і що охоплює пов'язання BoNT/A з рецептором BoNT/A, інтерналізацію комплексу нейротоксин/рецептор, транслокацію легкого ланцюга BoNT/A з внутріклітинної везикули в цитоплазму і протеолітичне розщеплювання SNAP-25. За визначенням клітина(и), чутлива(і) до інтоксикації BoNT/A, повинна(і) експресувати, або бути сконструйованою(ими) для експресії, щонайменше одного рецептора BoNT/A і щонайменше одного субстрату SNAP-25. Використовувані тут терміни "клітина(и), яка(і) можуть захоплювати BoNT/A" або "клітина(и), складова(і) стійкої клітинної лінії, яка може захоплювати BoNT/A" відносяться до клітин, які можуть зазнавати загальний клітинний механізм, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25, і що охоплює пов'язання BoNT/A з рецептором BoNT/A, інтерналізацію комплексу нейротоксин/рецептор, транслокацію легкого ланцюга BoNT/A з внутріклітинної везикули в цитоплазму і протеолітичне розщеплювання SNAP-25. За визначенням клітина(и), яка(і) може(уть) захоплювати BoNT/A, повинна(і) експресувати або бути сконструйованою(ими) для експресії, щонайменше одного рецептора BoNT/A і щонайменше одного субстрату SNAP-25.

Таким чином, у втіленні клітини із стабільної клітинної лінії чутливі до інтоксикації BoNT/A. У аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії чутливі до інтоксикації BoNT/A в концентрації, наприклад приблизно 500 пМ або менше, приблизно 400 пМ або менше, приблизно 300 пМ або менше, приблизно 200 пМ або менше або приблизно 100 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії чутливі до інтоксикації BoNT/A в концентрації, наприклад приблизно 90 пМ або менше, приблизно 80 пМ або менше, приблизно 70 пМ або менше, приблизно 60 пМ або менше, приблизно 50 пМ або менше, приблизно 40 пМ або менше, приблизно 30 пМ або менше, приблизно 20 пМ або менше, приблизно 10 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах клітини із стабільної клітинної лінії чутливі до інтоксикації BoNT/A в концентрації, наприклад приблизно 9 пМ або менше, приблизно 8 пМ або менше, приблизно 7 пМ або менше, приблизно 6 пМ або менше, приблизно 5 пМ або менше, приблизно 4 пМ або менше, приблизно 3 пМ або менше, приблизно 2 пМ або менше або приблизно 1 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах клітини із стабільної клітинної

лінії чутливі до інтоксикації BoNT/A в концентрації, наприклад приблизно 0,9 пМ або менше, приблизно 0,8 пМ або менше, приблизно 0,7 пМ або менше, приблизно 0,6 пМ або менше, приблизно 0,5 пМ або менше, приблизно 0,4 пМ або менше, приблизно 0,3 пМ або менше, приблизно 0,2 пМ, або приблизно 0,1 пМ або менше BoNT/A. Використовуваний тут термін "приблизно" при якісній оцінці заявленої суті, кількості, відсотка, або термін відноситься до діапазону плюс або хвилин десять відсотків щодо величини заявленої суті, відсотка, параметра або терміну.

У ще одному втіленні клітини, складові стійкої клітинної лінії, можуть захоплювати BoNT/A. У аспектах цього втілення клітини, складові стійкої клітинної лінії, можуть захоплювати, наприклад приблизно 500 пМ або менше, приблизно 400 пМ або менше, приблизно 300 пМ або менше, приблизно 200 пМ або менше або приблизно 100 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення клітини, складові стійкої клітинної лінії, мають здатністю захоплювати приблизно 90 пМ або менше, приблизно 80 пМ або менше, приблизно 70 пМ або менше, приблизно 60 пМ або менше, приблизно 50 пМ або менше, приблизно 40 пМ або менше, приблизно 30 пМ або менше, приблизно 20 пМ або менше або приблизно 10 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах клітини, складові стійкої клітинної лінії, мають здатністю захоплювати приблизно 9 пМ або менше, приблизно 8 пМ або менше, приблизно 7 пМ або менше, приблизно 6 пМ або менше, приблизно 5 пМ або менше, приблизно 4 пМ або менше, приблизно 3 пМ або менше, приблизно 2 пМ або менше або приблизно 1 пМ або менше BoNT/A. У інших аспектах клітини, складають стійку клітинну лінію, мають здатністю захоплювати приблизно 0,9 пМ або менше, приблизно 0,8 пМ або менше, приблизно 0,7 пМ або менше, приблизно 0,6 пМ або менше, приблизно 0,5 пМ або менше, приблизно 0,4 пМ або менше, приблизно 0,3 пМ або менше, приблизно 0,2 пМ або менше або приблизно 0,1 пМ або менше BoNT/A.

Аспекти даного опису включають, частково, BoNT/A. Використовуваний тут термін "BoNT/A" є синонімом "ботулінічного нейротоксину серотипу А" або "ботулінічного нейротоксину типу А" і відноситься до BoNT/A, що зустрічаються в природі або до BoNT/A, що не зустрічаються в природі, і включає комплекс BoNT/A, що містить приблизно 150 кДа нейротоксин BoNT/A і асоційовані нетоксичні білки (NAP), а також сам нейротоксин BoNT/A масою приблизно 150 кДа. Приклади, що не обмежують об'єм винаходу комплексів BoNT/A включають, наприклад 900-кДа комплекс BoNT/A, 500-кДа комплекс BoNT/A, 300-кДа комплекс BoNT/A. Винаходи, що не обмежують об'єм, приклади нейротоксину BoNT/A масою приблизно 150 кДа включають, наприклад SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4.

Використовуваний тут термін "зустрічається в природі BoNT/A" відноситься до будь-якого BoNT/A, що продукується за допомогою способу, що зустрічається в природі, включає без обмеження ізоформи BoNT/A, що продукуються в результаті модифікації посттрансляції, альтернативного сплайсингу транскрипту або спонтанної мутації, і підтипи BoNT/A, такі як, наприклад підтип BoNT/A1, підтип BoNT/A2, підтип BoNT/A3, підтип BoNT/A4 і підтип BoNT/A5. Що зустрічається в природі BoNT/A включає без обмеження SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, або варіанти, в яких заміщені, видалені або додані, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 амінокислот з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4. Наявні в продажі фармацевтичні композиції що зустрічається в природі BoNT/A включають без обмеження BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, England), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GMBH., Frankfurt, Germany), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, South Korea), BTX-A.

Використовуваний тут термін "не зустрічається в природі BoNT/A" відноситься до будь-якого BoNT/A, структура якого модифікована за допомогою людської маніпуляції, що включає без обмеження BoNT/A із зміненою амінокислотною послідовністю, одержаний за допомогою генетичної інженерії з використанням випадкового мутагенезу або раціонального дизайну, і BoNT/A, одержаний за допомогою хімічного синтезу in vitro. Приклади, що не обмежують об'єм винаходу, BoNT/A, що не зустрічаються в природі описані, наприклад в Steward, L.E. et al., Post-translational Modifications and Clostridial Neurotoxins, патент США № 7223577; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, патент США № 7419676; Steward, L.E. et al., Clostridial Neurotoxin Compositions and Modified Clostridial Neurotoxins, US 2004/0220386; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins With Enhanced Targeting Capabilities For Endogenous Clostridial Toxin Receptor Systems, U.S. Patent Publication No. 2008/0096248; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins With Altered Targeting Capabilities For Clostridial Toxin Target Cells, публікація заявки на патент США № 2008/0161543; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins With Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells, публікація заявки на

патент США № 2008/0241881, кожен з яких включений тут шляхом посилання.

Таким чином, у втіленні активність BoNT/A, що виявляється, відбувається з BoNT/A, що зустрічається в природі. У аспектах цього втілення активність BoNT/A, що виявляється, відбувається з ізоформи BoNT/A або підтипу BoNT/A. У аспектах цього втілення активність BoNT/A, що виявляється, відбувається з BoNT/A of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4. У інших аспектах цього втілення активність BoNT/A, що виявляється, відбувається з BoNT/A, що має, наприклад щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або, щонайменше 95 % ідентичність амінокислот з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4. У інших аспектах цього втілення активність BoNT/A, що виявляється, відбувається з BOTOX®, DYSPORT®/RELOXIN®, PURTOX®, XEOMIN®, NEURONOX® або BTX-A.

У ще одному втіленні активність BoNT/A, що виявляється, відбувається з BoNT/A, що не зустрічається в природі. У інших аспектах цього втілення активність BoNT/A, що виявляється, походить з варіанту BoNT/A, що не зустрічається в природі, має, наприклад, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або, щонайменше 95 % ідентичність амінокислот з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4. У інших аспектах цього втілення активність BoNT/A, що виявляється, походить з варіанту BoNT/A, що не зустрічається в природі, має, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш несуміжних амінокислотних замін, делецій або вставок відносно SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4. У інших аспектах цього втілення активність BoNT/A, що виявляється, походить з варіанту BoNT/A, що не зустрічається в природі, має, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш суміжних амінокислотних замін, делецій або вставок відносно SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4.

Аспекти даного опису включають, частково, SNAP-25. Використовуваний тут термін "SNAP-25" відноситься до того, що зустрічається в природі SNAP-25 або не зустрічається в природі SNAP-25, який переважно розщеплюється BoNT/A. Використовуваний тут термін "переважно розщеплюється" відноситься до того, що швидкість розщеплювання BoNT/A свого субстрату щонайменше на один порядок вище, ніж швидкість розщеплювання BoNT/A будь-якого іншого субстрату. У аспектах цього втілення швидкість розщеплювання BoNT/A свого субстрату щонайменше на два порядки вище, щонайменше на три порядки вище, щонайменше на чотири порядки вище або, щонайменше на п'ять порядків вище, ніж швидкість розщеплювання будь-якого іншого субстрату BoNT/A.

Використовуваний тут термін "зустрічається в природі SNAP-25" відноситься до будь-якого SNAP-25, що продукується за допомогою способу, що зустрічається в природі, включає без обмеження ізоформи SNAP-25, що продукуються в результаті модифікації посттрансляції, альтернативного сплайсингу транскрипту або спонтанної мутації, і підтипи SNAP-25. SNAP-25, що зустрічається в природі включає без обмеження SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24, або варіанти, в яких заміщені, видалені або додані, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш за амінокислоти з SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24.

Використовуваний тут термін "не зустрічається в природі SNAP-25" відноситься до будь-якого SNAP-25, структура якого модифікована за допомогою людської маніпуляції, що включає без обмеження SNAP-25, одержаний шляхом генетичної інженерії з використанням випадкового мутагенезу або раціонального дизайну, і SNAP-25, одержаний за допомогою хімічного синтезу *in vitro*. Приклади, що не обмежують об'єм винаходи SNAP-25, що не зустрічаються в природі описані, наприклад в Steward, L.E. et al., FRET Protease Assays for Clostridial Toxins, патент США 7332567; Fernandez-Salas et al., Lipophilic Dye-based FRET Assays for Clostridial Toxin Activity, публікація патенту США 2008/0160561, кожен з яких включений тут шляхом посилання. SNAP-25, що не зустрічається в природі може бути заміщений, мати делецію або вставку, наприклад 1

або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш за амінокислоти з SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24.

Таким чином, у втіленні SNAP-25 є SNAP-25, що зустрічається в природі. У аспектах цього втілення SNAP-25 є ізоформа SNAP-25 або підтип SNAP-25. У аспектах цього втілення що зустрічається в природі SNAP-25 є SNAP-25, що зустрічається в природі з SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24. У інших аспектах цього втілення SNAP-25 є таким, що зустрічається в природі SNAP-25, що має, наприклад щонайменше 70 % ідентичність амінокислот, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або, щонайменше 95 % ідентичність амінокислот з SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24.

У ще одному втіленні SNAP-25 є SNAP-25, що не зустрічається в природі. У інших аспектах цього втілення SNAP-25 є таким, що не зустрічається в природі SNAP-25, що має, наприклад, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або, щонайменше 95 % ідентичність амінокислот з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4. У інших аспектах цього втілення SNAP-25 є таким, що не зустрічається в природі SNAP-25, що має, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш несуміжних амінокислотних замінів, делецій або вставок відносно SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24. У інших аспектах цього втілення SNAP-25 є таким, що не зустрічається в природі SNAP-25, що має, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш суміжних амінокислотних замінів, делецій або вставок відносно SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24.

SNAP-25 може бути ендогенним SNAP-25 або екзогенний SNAP-25. Використовуваний тут термін "ендогенний SNAP-25" відноситься до SNAP-25, в природі представлений в клітині, оскільки в природі він закодований в клітинному геномі, таким чином, що клітина сама експресує SNAP-25 без необхідності зовнішнього джерела SNAP-25 або зовнішнього джерела генетичного матеріалу, кодуєчого SNAP-25. Експресія ендогенного SNAP-25 може здійснюватися з або без стимуляції з навколишнього середовища, такий як, наприклад клітинне диференціювання. За визначенням ендогенний SNAP-25 може бути що тільки зустрічається в природі SNAP-25 або його варіанти. Наприклад наступні стійкі клітинні лінії експресують ендогенний SNAP-25: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa і SK-N-BE(2) -C.

Використовуваний тут термін "екзогенний SNAP-25" відноситься до SNAP-25, експресуючого в клітині шляхом введення зовнішнього джерела SNAP-25 або зовнішнього джерела генетичного матеріалу кодуєчого SNAP-25, за допомогою людської маніпуляції. Експресія екзогенного SNAP-25 може здійснюватися з або без стимуляції з навколишнього середовища, такого як, наприклад клітинне диференціювання. Як винахід прикладу клітини, що не обмежує об'єм, із стабільної клітинної лінії можуть експресувати екзогенний SNAP-25 шляхом тимчасової або стабільної трансфекції SNAP-25. Як ще один винахід прикладу клітини, що не обмежує об'єм, із стабільної клітинної лінії можуть експресувати екзогенний SNAP-25 шляхом білкової трансфекції SNAP-25. Екзогенний SNAP-25 може бути SNAP-25, що зустрічається в природі або його варіанти, або SNAP-25, що не зустрічається в природі або його варіанти.

Таким чином, у втіленні клітини із стабільної клітинної лінії експресують ендогенний SNAP-25. У аспектах цього втілення ендогенний SNAP-25, експресується клітинами із стабільної

клітинної лінії, є SNAP-25, що зустрічається в природі. У інших аспектах цього втілення ендогенний SNAP-25, експресується клітинами із стабільної клітинної лінії, є SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24. У інших аспектах цього втілення ендогенний SNAP-25, експресується клітинами із стабільної клітинної лінії, є SNAP-25, що зустрічається в природі, такий як, наприклад ізоформа SNAP-25 або підтип SNAP-25. У інших аспектах цього втілення ендогенний SNAP-25, експресується клітинами із стабільної клітинної лінії, є SNAP-25, що зустрічається в природі, що має, наприклад щонайменше 70 % ідентичність амінокислот, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або, щонайменше 95 % ідентичність амінокислот з SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24.

У ще одному втіленні клітини із стабільної клітинної лінії сконструйовані для тимчасової або стабільної експресії екзогенного SNAP-25. У аспекті цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії сконструйовані для тимчасової або стабільної експресії SNAP-25, що зустрічається в природі. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії сконструйовані для тимчасової або стабільної експресії що зустрічається в природі SNAP-25 з SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії сконструйовані для тимчасової або стабільної експресії що зустрічається в природі SNAP-25, такого як, наприклад ізоформа SNAP-25 або підтип SNAP-25. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії сконструйовані для тимчасової або стабільної експресії що зустрічається в природі SNAP-25, що має, наприклад, щонайменше 70 % ідентичність амінокислот, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, або, щонайменше 95 % ідентичність амінокислот з SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24.

У ще одному аспекті втілення клітини із стабільної клітинної лінії сконструйовані для тимчасової або стабільної експресії SNAP-25, що не зустрічається в природі. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії сконструйовані для тимчасової або стабільної експресії SNAP-25, що не зустрічається в природі, що має, наприклад, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або, щонайменше 95 % ідентичність амінокислот з SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії сконструйовані для тимчасової або стабільної експресії що не зустрічається в природі SNAP-25, що має, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш несуміжних амінокислотних замін, делецій або вставок відносно SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії сконструйовані для тимчасової або стабільної експресії SNAP-25, що не зустрічається в природі, що має, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш суміжних амінокислотних замін, делецій або вставок відносно SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 або SEQ ID NO: 24.

Аналізи, які виявляють розщеплювання субстрату BoNT/A після дії на BoNT/A, можуть бути

використані для оцінки того, чи експресує клітина ендогенний або екзогенний SNAP-25. У цих аналізах утворення продукту розщеплювання SNAP-25 може бути виявлене в клітинах, експресуючих SNAP-25 після обробки BoNT/A. Приклади, що не обмежують об'єм винаходу, специфічного аналізу шляхом вестерн-блоттингу, а також добре охарактеризовані реагенти, умови і протоколи легко доступні з комерційних джерел, які включають без обмеження Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, і Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Зрозуміло, що ці і аналогічні аналізи розщеплювання SNAP-25 можуть бути корисні для ідентифікації клітин, експресуючих ендогенний або екзогенний SNAP-25.

Приклади, що не обмежують об'єм винаходу аналізів шляхом вестерн-блоттингу з використанням антитіла, яке розпізнає продукт розщеплювання SNAP-25 під дією BoNT/A або розщеплені і не розщеплені форми SNAP-25, може бути використаний для аналізу захоплення BoNT/A. Приклади антитіл α -SNAP-25, корисних для цих аналізів, включають без обмеження α -SNAP-25 мишине моноклональне антитіло SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD) α -SNAP-25 мишине моноклональне антитіло CI 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany) α -SNAP-25 мишине моноклональне антитіло CI 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany) α -SNAP-25 мишине моноклональне антитіло SP12 (Abcam, Cambridge, MA) α -SNAP-25 кролячу поліклональну антисироватку (Synaptic Systems, Goettingen, Germany) α -SNAP-25 кролячу поліклональну антисироватку (Abcam, Cambridge, MA) і α -SNAP-25 кролячу поліклональну антисироватку S9684 (Sigma, St Louis, MO).

Аспекти даного опису включають, частково, рецептор BoNT/A. Використовуваний тут термін "рецептор BoNT/A" відноситься до рецептора BoNT/A або рецептору BoNT/A, що не зустрічається в природі, який переважно взаємодіє з BoNT/A таким чином, що викликає відповідь на інтоксикацію BoNT/A, що зустрічається в природі. Використовуваний тут термін "переважно взаємодіє" відноситься до того, що рівноважна константа дисоціації (KD) BoNT/A відносно рецептора BoNT/A щонайменше на один порядок менше, ніж константа дисоціації BoNT/A щодо будь-якого іншого рецептора на клітинній поверхні. Рівноважна константа дисоціації, специфічний тип константи рівноваги, який вимірює здатність комплексу BoNT/A-рецептор BoNT/A оборотно розділятися (диссоціювати) на складові його молекули, а саме BoNT/A і рецептор BoNT/A, розраховується як $KD = K_a / K_d$ в рівновазі. Константа асоціації (K_a) розраховується як $K_a = [C] / [L][R]$, і константа дисоціації (K_d) розраховується як $K_d = [L][R] / [C]$, де $[L]$ дорівнює молярній концентрації BoNT/A, $[R]$ є молярною концентрацією рецептора BoNT/A, і $[C]$ є молярною концентрацією комплексу BoNT/A-рецептор BoNT/A, і де всі концентрації є такими, коли система знаходиться в рівновазі. Чим менша константа дисоціації, тим тісніше зв'язаний BoNT/A зі своїм рецептором, або вище за афінність скріплення між BoNT/A і рецептором BoNT/A. У аспектах цього втілення константа дисоціації BoNT/A для рецептора BoNT/A щонайменше на два порядки менше, щонайменше на три порядки менше, щонайменше на чотири порядки менше або, щонайменше на п'ять порядків менше ніж константа дисоціації BoNT/A відносно будь-якого іншого рецептора. У інших аспектах цього втілення афінність скріплення BoNT/A, що переважно взаємодіє з рецептором BoNT/A, може мати рівноважну константу дисоціації (KD), наприклад 500 нМ або менше, 400 нМ або менше, 300 нМ або менше, 200 нМ, або менше 100 нМ або менше. У інших аспектах цього втілення афінність скріплення BoNT/A, що переважно взаємодіє з рецептором BoNT/A, може мати рівноважну константу дисоціації (KD), наприклад of 90 нМ або менше, 80 нМ або менше, 70 нМ або менше, 60 нМ, 50 нМ або менше, 40 нМ або менше, 30 нМ або менше, 20 нМ або менше, 10 нМ або менше. Використовуваний тут термін "викликає відповідь на інтоксикацію BoNT/A" відноситься до здатності рецептора BoNT/A взаємодіяти з BoNT/A з утворенням комплексу нейротоксин/рецептор і подальшою інтерналізацією цього комплексу в клітинну цитоплазму.

Використовуваний тут термін рецептор BoNT/A", що "зустрічається в природі, відноситься до будь-якого рецептора BoNT/A, що продукується за допомогою процесу, що зустрічається в природі, включає без обмеження ізоформи рецепторів BoNT/A, що продукуються в результаті модифікації посттрансляції, альтернативного сплайсингу транскрипту або спонтанної мутації, і підтипу рецептора BoNT/A. Рецептор BoNT/A, що зустрічається в природі, включає без обмеження рецептор чинника зростання фібробластів 2 (FGFR2), рецептор чинника зростання фібробластів 3 (FGFR3), глікопротеїн синаптичних везикул 2 (SV2) і складний гангліозид, такий як GT1b, такий як гангліозид, визначений в Ester Fernandez-Salas, et al., Botulinum Toxin Screening Assays, публікація патенту США № 2008/0003240; Ester Fernandez-Salas, et al., Botulinum Toxin Screening Assays, публікація патенту США № 2008/0182799; Min Dong et al., SV2 is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A, Science (2006); S. Mahrhold et al, The Synaptic Vesicle Protein 2C Mediates the Uptake of Botulinum Neurotoxin A into Phrenic Nerves, 580(8) FEBS

Lett. 2011-2014 (2006), кожен з яких включений тут шляхом посилання. FGFR2, що зустрічається в природі включає без обмеження SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 і SEQ ID NO: 70, варіанти, в яких заміщені, видалені або додані, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш за амінокислоти з SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 і SEQ ID NO: 70. Що зустрічається в природі FGFR3 включає без обмеження SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, і SEQ ID NO: 27 або варіанти, в яких заміщені, видалені або додані, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш за амінокислоти з SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 і SEQ ID NO: 27. Що зустрічається в природі SV2 включає без обмеження SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 і SEQ ID NO: 31, варіанти, в яких заміщені, видалені або додані, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш за амінокислоти з SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 і SEQ ID NO: 31.

Використовуваний тут термін варіант рецептора BoNT/A", що "не зустрічається в природі, відноситься до будь-якого рецептора BoNT/A, що продукується за допомогою людської маніпуляції або дизайну, включає без обмеження рецептор BoNT/A, що одержується за допомогою генетичної інженерії з використанням випадкового мутагенезу або раціонального дизайну, і рецептор BoNT/A, що одержується шляхом хімічного синтезу. Приклади варіантів BoNT/A, що не зустрічаються в природі, що не обмежують об'єм винаходу, включають, наприклад консервативні варіанти рецептора BoNT/A, не консервативні варіанти рецептора BoNT/A, химерні варіанти рецептора BoNT/A і активні фрагменти рецептора BoNT/A.

Використовуваний тут термін рецептор BoNT/A", що "не зустрічається в природі, відноситься до будь-якого рецептора BoNT/A, структура якого модифікована за допомогою людської маніпуляції, що включає без обмеження рецептор BoNT/A, що одержується шляхом генетичної інженерії з використанням випадкового мутагенезу або раціонального дизайну, і рецептор BoNT/A, що одержується шляхом хімічного синтезу in vitro. Приклади рецептора BoNT/As, що не зустрічається в природі, що не обмежують об'єм винаходу, описані, наприклад в Ester Fernandez-Salas, et al., Botulinum Toxin Screening Assays, публікація патенту США № 2008/0003240; Ester Fernandez-Salas, et al., Botulinum Toxin Screening Assays, публікація патенту США № 2008/0182799, кожен з яких включений тут шляхом посилання. Рецептор BoNT/A, що не зустрічається в природі, може мати заміщення, видалення або додавання, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш за амінокислоти з SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 або SEQ ID NO: 70.

Таким чином, у втіленні рецептором BoNT/A є рецептор BoNT/A, що зустрічається в природі, такий як, наприклад FGFR2, FGFR3 або SV2. У аспектах цього втілення рецептор BoNT/A є ізоформою рецептора BoNT/A або підтип рецептора BoNT/A. У аспектах цього втілення рецептором BoNT/A, що зустрічається в природі, є рецептор BoNT/A SEQ ID NO, що зустрічається в природі: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 або SEQ ID NO: 70. У інших аспектах цього втілення рецептором BoNT/A є рецептор BoNT/A, що зустрічається в природі, має, наприклад щонайменше 70 % ідентичність амінокислот, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або, щонайменше 95 % ідентичність амінокислот з SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 або SEQ ID NO: 70.

У ще одному втіленні рецептором BoNT/A є рецептор BoNT/A, що не зустрічається в природі, такий як, наприклад, генетично сконструйований FGFR2, генетично сконструйований FGFR3 або генетично сконструйований SV2. У інших аспектах цього втілення рецептором BoNT/A є рецептор BoNT/A, що не зустрічається в природі, має, наприклад щонайменше 70 %,

щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, або, щонайменше 95 % ідентичність амінокислот з SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 або SEQ ID NO: 70. У інших аспектах цього втілення рецептором BoNT/A є рецептор BoNT/A, що не зустрічається в природі, має, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш несуміжних амінокислотних замінів, делецій, або вставок відносно SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 або SEQ ID NO: 70. У інших аспектах цього втілення рецептором BoNT/A є рецептор BoNT/A, що не зустрічається в природі, має, наприклад 1 або більш, 2 або більш, 3 або більш, 4 або більш, 5 або більш, 6 або більш, 7 або більш, 8 або більш, 9 або більш, 10 або більш, 20 або більш, 30 або більш, 40 або більш, 50 або більш, або 100 або більш суміжних амінокислотних замінів, делецій або вставок відносно SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 або SEQ ID NO: 70.

Рецептор BoNT/A може бути ендogenousним рецептором BoNT/A або екзогенний рецептор BoNT/A. Використовуваний тут термін "ендогенний рецептор BoNT/A" відноситься до рецептора BoNT/A, в природі представлений в клітині, оскільки він в природі кодується в клітинному геномі, таким чином, що клітина сама експресує рецептор BoNT/A без необхідності зовнішнього джерела рецептора BoNT/A або зовнішнього джерела генетичного матеріалу, кодує рецептор BoNT/A. Експресія ендogenousного рецептора BoNT/A може здійснюватися з або без стимуляції з навколишнього середовища, такої як, наприклад клітинне диференціювання або активація промотора. Наприклад наступні стійкі клітинні лінії експресують, щонайменше один ендogenousний рецептор BoNT/A: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa і SK-N-BE(2) -C. Ендogenousний рецептор BoNT/A тільки може бути рецептором BoNT/A, що зустрічається в природі, або його варіанти, що зустрічаються в природі.

Використовуваний тут термін "екзогенний рецептор BoNT/A" відноситься до рецептора BoNT/A, експресуючого в клітині шляхом введення зовнішнього джерела рецептора BoNT/A або зовнішнього джерела генетичного матеріалу, кодує рецептор BoNT/A за допомогою людської маніпуляції. Експресія екзогенного рецептора BoNT/A може здійснюватися за рахунок або без стимуляції з навколишнього середовища, такого як, наприклад клітинне диференціювання або активація промотора. Як приклад, що не обмежує об'єм винаходу, у клітині із стабільної клітинної лінії можуть експресувати один або більш ніж один екзогенний рецептор BoNT/A шляхом тимчасової або стабільної трансфекції молекули полінуклеотиду, кодує рецептор BoNT/A, такого як, наприклад FGFR2, FGFR3 або SV2. Як ще один приклад, що не обмежує об'єм винаходу, у клітині із стабільної клітинної лінії можуть експресувати один або більш ніж один екзогенний рецептор BoNT/A шляхом білкової трансфекції рецептора BoNT/A, такого як, наприклад FGFR2, FGFR3 або SV2. Екзогенний рецептор BoNT/A може бути рецептором BoNT/A, що зустрічається в природі, або його варіанти, що зустрічаються в природі, або рецептор BoNT/A, що не зустрічається в природі, або його варіанти, що не зустрічаються в природі.

Таким чином, у втіленні клітини із стабільної клітинної лінії експресують ендogenousний рецептор BoNT/A. У аспектах цього втілення ендogenousний рецептор BoNT/A, експресується клітинами із стабільної клітинної лінії, є рецептор BoNT/A, що зустрічається в природі. У інших аспектах цього втілення ендogenousний рецептор BoNT/A, експресується клітинами із стабільної клітинної лінії, є SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 або SEQ ID NO: 70. У інших аспектах цього втілення ендogenousний рецептор BoNT/A, експресується клітинами із стабільної клітинної лінії, є рецептор BoNT/A, що зустрічається в природі, такий як, наприклад ізоформа рецептора BoNT/A або підтип рецептора BoNT/A. У інших аспектах цього втілення ендogenousний рецептор BoNT/A, експресується клітинами із стабільної клітинної лінії, є рецептор BoNT/A, що зустрічається в природі, має, наприклад, щонайменше 70 % ідентичність амінокислот, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, або, щонайменше 95 % ідентичність амінокислот з SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 або SEQ ID NO: 70.

природі FGFR3 або не зустрічається в природі FGFR3, що зустрічається в природі SV2 або не зустрічається в природі SV2, або будь-якої їх комбінації.

Клітини, які експресують один або більш ніж один ендогенний або екзогенний рецептор BoNT/A, можуть бути ідентифіковані за допомогою стандартних способів, що включають прямі і опосередковані аналізи захоплення токсину. Аналізи, які визначають властивості скріплення або захоплення BoNT/A, можуть бути використані для оцінки того, чи експресує клітина рецептор BoNT/A. Такі аналізи включають без обмеження аналізи перехресного скріплення з використанням міченого BoNT/A, такого як, наприклад [125I] BoNT/A, [125I], дивися, наприклад Noriko Yokosawa et al., Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines, 57(1) Infect. Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa et al., Binding of botulinum type C1, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes, 29(2) Toxicon 261-264 (1991); and Tei-ichi Nishiki et al., Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes, 269(14) J. Biol. Chem. 10498-10503 (1994). Інші аналізи, що, необмежують об'єм винаходу, включають імуноцитохімічні аналізи, які виявляють скріплення BoNT/A з використанням мічених або немічених антитіл, дивися наприклад Atsushi Nishikawa et al., The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells, 319(2) Biochem. Biophys. Res. Commun. 327-333 (2004) і аналізи імунопреципітації, дивися, наприклад Yukako Fujinaga et al., Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes, 150(Pt 5) Microbiology 1529-1538 (2004), які виявляють токсин, що зв'язався, з використанням мічених або unlabeled антитіл. Антитіла, корисні для цих аналізів, включають без обмеження антитіла, вибрані проти BoNT/A, антитіла, вибрані проти рецептора BoNT/A, такі як, наприклад FGFR2, FGFR3 або SV2, і/або антитіла, вибрані проти гангліозиду, такі як, наприклад GD1a, GD1b, GD3, GQ1b, або GT1b. Якщо антитіло мічене, то скріплення молекули може бути виявлене за допомогою різних способів, що включають аналіз шляхом вестерн-блоттинга, пряме мікроскопічне спостереження за клітинною локалізацією антитіла, вимірювання пов'язані з клітиною або субстратом антитіла після стадії промивки, проточну цитометрію, електрофорез або капілярний електрофорез з використанням способів, добре відомих фахівцям в даній області техніки. Якщо антитіло немічене, то можна використовувати мічене вторинне антитіло для опосередкованого виявлення зв'язаної молекули, і виявлення може бути здійснене, як для міченого антитіла. Зрозуміло, що ці і аналогічні аналізи, які визначають властивості захоплення BoNT/A або характеристики, можуть бути корисні при ідентифікації клітин, експресуючих ендогенний або екзогенний рецептор BoNT/As.

Аналізи, які контролюють вивільнення молекули після дії BoNT/A, також можуть бути використані для оцінки того, чи експресує клітина один або більш ніж один ендогенний або екзогенний рецептор BoNT/A. У цих аналізах інгібування вивільнення молекули може відбуватися в клітинах, експресуючих рецептор BoNT/A після обробки BoNT/A. Добре відомі аналізи включають способи, які вимірюють інгібування вивільнення радіоактивно-меченого катехоламіну з нейронів, такого як, наприклад вивільнення [3H] норадреналіну або [3H] дофаміну, дивися, наприклад A Fassio et al., Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F, 90(3) Neuroscience 893-902 (1999); і Sara Stigliani et al., The sensitivity of catecholamine release to botulinum toxin C1 and E suggests selective targeting of vesicles set into the readily releasable pool, 85(2) J. Neurochem. 409-421 (2003), або вимірювання вивільнення катехоламіду з використанням флуориметричного способу, дивися, наприклад Anton de Paiva et al., A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly, 268(28) J. Biol. Chem. 20838-20844 (1993); Gary W. Lawrence et al., Distinct exocytotic responses of intact and permeabilised chromaffin cells after cleavage of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) or synaptobrevin by botulinum toxin A or B, 236(3) Eur. J. Biochem. 877-886 (1996); і Patrick Foran et al., Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release, 35(8) Biochemistry 2630-2636 (1996). Інші приклади, що не обмежують об'єм винаходу, включають аналізи, які вимірюють інгібування вивільнення гормону з ендокринних клітин, таких як, наприклад клітини передньої частки гіпофіза або клітини яєчника. Зрозуміло, що ці і схожі аналізи вивільнення молекули можуть бути корисні при ідентифікації клітин, експресуючих ендогенний або екзогенний рецептор BoNT/A.

Аналізи, які виявляють розщеплювання субстрату BoNT/A після дії на BoNT/A, також можуть бути використані для оцінки того, чи експресує клітина один або більш ніж один ендогенний або екзогенний рецептор BoNT/A. У цих аналізах утворення продукту розщеплювання субстрату

BoNT/A або зникнення інтактного субстрату BoNT/A може бути виявлене в клітинах, експресуючих рецептор BoNT/A після обробки BoNT/A. Приклади, що не обмежують об'єм винаходу, специфічного аналізу шляхом вестерн-блоттингу, а також добре охарактеризовані реагенти, умови і протоколи легко доступні з комерційних джерел, які включають, без

5 обмеження Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, і Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Зрозуміло, що ці і схожі аналізи розщеплювання субстрату BoNT/A можуть бути корисні при ідентифікації клітин, експресуючих ендogenousний або екзогенний рецептор BoNT/A.

Як не обмежують об'єм винаходу прикладів аналізу шляхом вестерн-блоттингу з використанням антитіла, що розпізнає продукт розщеплювання SNAP-25 під дією BoNT/A або розщеплену і не розщеплену форми SNAP-25, можуть бути використані для аналізу захоплення BoNT/A. Приклади антитіл α -SNAP-25, корисні для цих аналізів, включають без обмеження мишине моноклональне антитіло α -SNAP-25 SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), мишине моноклональне антитіло α -SNAP-25 CI 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen,

15 Germany), мишине моноклональне антитіло α -SNAP-25 CI 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), мишине моноклональне антитіло α -SNAP-25 SP12 (Abcam, Cambridge, MA), кролячу поліклональну антисироватку α -SNAP-25 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), кролячу поліклональну антисироватку α -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) і кролячу поліклональну антисироватку α -SNAP-25 (Abcam, Cambridge, MA).

У аспектах даного опису запропоновані клітини, які одержують шляхом генетичної маніпуляції або рекомбінантної інженерії для експресії екзогенного SNAP-25 і/або одного або більш ніж одного екзогенного рецептора BoNT/A. Клітини, корисні для експресії екзогенного SNAP-25 і/або одного або більш ніж одного екзогенного рецептора BoNT/As шляхом генетичної маніпуляції або рекомбінантної інженерії, включають нейрональні клітини і клітини, що відрізняються від нейрональних, які можуть або не можуть експресувати ендogenousний SNAP-25 і/або один або більш ніж один ендogenousний рецептор BoNT/A. Додатково зрозуміло, що такі одержані шляхом генетичної маніпуляції або рекомбінантно сконструйовані клітини можуть експресувати екзогенний SNAP-25 і один або більш ніж один екзогенний рецептор BoNT/A під контролем конститутивного тканеспецифічного, специфічного для клітин або індукованого промоторного елементу, енхансерного елементу або обидва. Зрозуміло, що будь-яка клітина є корисною, якою можна генетично маніпулювати або рекомбінантно конструювати для експресії екзогенного SNAP-25 і/або одного або більш ніж одного екзогенного рецептора BoNT/A, і здатна долати інтоксикацію BoNT/A.

Способи, придатні для введення в клітину екзогенної полінуклеотидної молекули, кодуючий компонент, необхідний для того, щоб клітини піддавалися загальному клітинному механізму, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25, такий як, наприклад SNAP-25, FGFR2, FGFR3 або SV2, включають без обмеження хімічно-опосередковані способи доставки, такі як, наприклад способи доставки, опосередковані фосфатом кальцію, диетиламіноетилом (DEAE), декстратом, ліпідом, поліетиленіміном (PEI), полілізином і полібреном; фізично опосередковані способи доставки, такі як, наприклад біолистична доставка частинок, мікроін'єкція, злиття протопластів і електропорація; і опосередковані вірусами способи доставки, такі як, наприклад опосередкована ретровірусами трансфекція, дивися, наприклад Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells, pp. 16.1-16.62 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001); Alessia Colosimo et al., Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells, 29(2) Biotechniques 314-318, 320-322, 324 (2000); Philip Washbourne & A. Kimberley McAllister, Techniques for Gene Transfer into Neurons, 12(5) Curr. Opin. Neurobiol. 566-573 (2002); і Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, pp 9.16.4-9.16.11 (2000), кожна з яких включена шляхом посилання. Фахівцям в даній області техніки зрозуміло, що вибір специфічного способу введення молекули полінуклеотиду в клітину частково залежить від того, чи містить клітина тимчасово або стабільно компонент, необхідний для того, щоб клітини зазнавали загальний клітинний механізм, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25. Винаходи, що не обмежують об'єм, приклади молекули полінуклеотиду, кодуючий компонент, необхідний для того, щоб клітини зазнавали загальний клітинний механізм, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25, є наступними: молекула полінуклеотиду FGFR2 SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, або SEQ ID NO: 138; молекула полінуклеотиду FGFR3 SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, або SEQ ID NO: 141; молекула полінуклеотиду SV2 SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, або SEQ ID NO: 144; і молекула полінуклеотиду SNAP-25 SEQ ID NO: 145 або SEQ ID NO: 146.

60 Хімічно-опосередковані способи доставки добре відомі фахівцям в даній області техніки і

описані, наприклад в Martin Jordan & Florian Worm, Transfection of Adherent and Suspended Cells by Calcium Phosphate, 33(2) Methods 136-143 (2004); Chun Zhang et al., Polyethylenimine Strategies for Plasmid Delivery to Brain-Derived Cells, 33(2) Methods 144-150 (2004), кожна з яких включена тут шляхом посилання. Такі хімічно опосередковані засоби доставки можуть бути

5 одержані за допомогою стандартних процедур і є у продажу, дивися, наприклад набір для трансфекції CellPfect (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); набір для трансфекції ссавцеві, фосфат кальцію і DEAE декстран (Stratagene, Inc., La Jolla, CA); реагент для трансфекції Lipofectamine™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); набір для трансфекції ExGen 500 (Fermentas, Inc., Hanover, MD), і набори для трансфекції SuperFect і Effectene (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

10 Фізично-опосередковані способи доставки добре відомі фахівцям в даній області техніки і

описані, наприклад в Jeike E. Biewenga et al., Plasmid-Mediated Gene Transfer in Neurons using the Biolistics Technique, 71(1) J. Neurosci. Methods. 67-75 (1997); John O'Brien & Sarah C. R. Lummis, Biolistic and Diolistic Transfection: Using the Gene Gun to Deliver DNA and Lipophilic Dyes into Mammalian Cells, 33(2) Methods 121-125 (2004); M. Golzio et al., In Vitro and In Vivo Electric

15 Field-Mediated Permeabilization, Gene Transfer, and Expression, 33(2) Methods 126-135 (2004); and Oliver Greschet al., New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells, 33(2) Methods 151-163 (2004), кожна з яких включена тут шляхом посилання.

Опосередковані вірусами способи доставки добре відомі фахівцям в даній області техніки і

описані, наприклад в Chooi M. Lai et al., Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors, 21(12)

20 DNA Cell Biol. 895-913 (2002); Ilya Frolov et al., Alphavirus-Based Expression Vectors: Strategies and Applications, 93(21) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 11371-11377 (1996); Roland Wolkowicz et al., Lentiviral Vectors for the Delivery of DNA into Mammalian Cells, 246 Methods Mol. Biol. 391-411 (2004); A. Huser & C. Hofmann, Baculovirus Vectors: Novel Mammalian Cell Gene-Delivery Vehicles and Their Applications, 3(1) Am. J. Pharmacogenomics 53-63 (2003); Tiziana Tonini et al., Transient

25 Production of Retroviral-and Lentiviral-Based Vectors for the Transduction of Mammalian Cells, 285 Methods Mol. Biol. 141-148 (2004); Manfred Gossen & Hermann Bujard, Tight Control of Gene Expression in Eukaryotic Cells by Tetracycline-Responsive Promoters, патент США № 5,464,758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, Methods for Regulating Gene Expression, патент США № 5814618; David S. Hogness, Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor

30 Polypeptides and Cells Transformed With Same, патент США № 5514578; David S. Hogness, Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor, патент США № 6245531; Elisabetta Vegeto et al., Progesterone Receptor Having C. Terminal Hormone Binding Domain Truncations, патент США № 5,364,791; Elisabetta Vegeto et al., Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy, патент США № 5874534, кожна з яких включена тут

35 шляхом посилання. Такі опосередковані вірусами засоби доставки можуть бути одержані за допомогою стандартних протоколів і є у продажу, дивися, наприклад аденовірусну систему експресії ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) і інструкцію на аденовірусну систему експресії ViraPower™ 25-0543 version A, Invitrogen, Inc., (Jul. 15, 2002); і аденовірусну систему експресії AdEasy™ (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) і інструкцію на аденовірусну систему експресії

40 AdEasy™ 064004f, Stratagene, Inc. Крім того, такі вірусні системи доставки можуть бути одержані за допомогою стандартних способів і є у продажу, дивися, наприклад системи генної експресії BD™ Tet-Off і Tet-On (BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA) і керівництво користувача для систем генної експресії BD™ Tet-Off і Tet-On, PT3001-1, BD Biosciences Clontech, (Mar. 14, 2003), система GeneSwitch™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) і і регульована міфепристоном

45 система експресії для клітин ссавця GeneSwitch™ version D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (Nov. 4, 2002); лентивірусна система експресії ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) і інструкція на лентивірусну систему експресії ViraPower™ 25-0501 version E, Invitrogen, Inc., (Dec. 8, 2003); і ретровірусна індукована система експресії ссавців Complete Control® (Stratagene, La Jolla, CA) і інструкція на ретровірусну індуковану систему експресії ссавців Complete Control®, 064005e.

50 Таким чином, у втіленні клітини із стабільної клітинної лінії, чутливі до інтоксикації BoNT/A, тимчасово містять молекулу полінуклеотиду, кодуєчий компонент, необхідний клітинам для того, щоб піддатися загальному клітинному механізму, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25. У ще одному втіленні клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, тимчасово містять молекулу полінуклеотиду,

55 кодуєчий безліч компонентів, необхідних клітинам для того, щоб зазнавати загальний клітинний механізм, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25. У аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, тимчасово містять молекулу полінуклеотиду, кодуєчу FGFR2, FGFR3, SV2 або SNAP-25. У аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, тимчасово містять

60 молекулу полінуклеотиду, кодуєчу FGFR2 з SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132,

SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 або SEQ ID NO: 138. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, тимчасово містять молекулу полінуклеотиду, кодуєму FGFR3 з SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, або SEQ ID NO: 141. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, тимчасово містять молекулу полінуклеотиду, кодуєму SV2 з SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, або SEQ ID NO: 144. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, тимчасово містять молекулу полінуклеотиду, кодуєму SNAP-25 з SEQ ID NO: 145, або SEQ ID NO: 146.

У ще одному втіленні клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, постійно містять молекулу полінуклеотиду, кодуєму компонент, необхідний клітинам для того, щоб зазнати загальний клітинний механізм, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25. У ще одному втіленні клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, стабільно містять молекулу полінуклеотиду, кодуєму безліч компонентів, необхідних клітинам для того, щоб зазнати загальний клітинний механізм, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25. У аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, стабільно містять молекулу полінуклеотиду, кодуєму FGFR2, FGFR3, SV2 або SNAP-25. У аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, стабільно містять молекулу полінуклеотиду, кодуєму FGFR2 з SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, або SEQ ID NO: 138. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, постійно містять молекулу полінуклеотиду, кодуєму FGFR3 з SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 або SEQ ID NO: 141. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, стабільно містять молекулу полінуклеотиду, кодуєму SV2 з SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143 або SEQ ID NO: 144. У інших аспектах цього втілення клітини із стабільної клітинної лінії, чутливої до інтоксикації BoNT/A, стабільно містять молекулу полінуклеотиду, кодуєму SNAP-25 з SEQ ID NO: 145 або SEQ ID NO: 146.

Як згадано вище, екзогенний компонент, необхідний клітинам для того, щоб піддатися загальному клітинному механізму, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25, такий як, наприклад SNAP-25, FGFR2, FGFR3, або SV2, розкриті в даному описі, може бути введений в клітину. Будь-який і всі способи, корисні для введення такого екзогенного компоненту з доставляючим агентом в клітинну популяцію, можуть бути корисні за умови того, що цей спосіб тимчасово вводить екзогенний компонент, розкритий в даному описі, щонайменше в 50 % клітин в даній популяції клітин. Таким чином, аспекти цього втілення можуть включати популяцію клітин, в якій, наприклад, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 %, або, щонайменше 90 % даній популяції тимчасово містять екзогенний компонент, необхідний клітинам для того, щоб зазнати загальний клітинний механізм, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25, такий як, наприклад SNAP-25, FGFR2, FGFR3, або SV2, розкритий в даному описі. Використовуваний тут термін "доставляючий агент" відноситься до будь-якої молекули, яка забезпечує або підсилює інтерналізацію ковалентного зв'язку, не ковалентного зв'язку або яким-небудь іншим чином, що асоціюється з поліпептидом в клітині. Таким чином, термін "доставляючий агент" охоплює без обмеження білки, пептиди, пептидоміметики, невеликі молекули, молекули полінуклеотидів, ліпосоми, ліпіди, віруси, ретровіруси і клітини, які без обмеження переносять ковалентний або не ковалентний зв'язану молекулу в клітинну мембрану, клітинну цитоплазму або ядро. Додатково зрозуміло, що термін "доставляючий агент" охоплює молекули, які інтерналізуються за допомогою будь-якого механізму, включаючи доставляючі агенти, які діють шляхом опосередкованого рецептором ендцитозу, і агенти, які не залежні від опосередкованого рецептором ендцитозу.

Доставляючий агент також може бути агент, який забезпечує або підсилює клітинне захоплення ковалентний зв'язаного компоненту, такого як FGFR2, FGFR3, SV2 або SNAP-25, такий як, наприклад, шляхом хімічної кон'югації або за допомогою продукованих генетично білків, що зливаються. Процеси, які ковалентно зв'язують доставляючі агенти, і способи використання таких агентів описані, наприклад в Steven F. Dowdy, Protein Transduction System and Methods of Use Thereof, International Publication No WO 00/34308; Gerard Chassaing & Alain Prochiantz, Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules, патент США № 6080724; Alan Frankel et al., Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiety, патент США № 5674980; Alan Frankel et al., TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates, патент США № 5747641; Alan Frankel et al., TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins, патент США № 5804604; Peter F. J. O'Hare et al., Use of Transport Proteins,

патент США № 6734167; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, патент США № 5807746; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, патент США № 6043339; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, патент США № 6248558; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, патент США № 6432680; Jack J. Hawiger et al., Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, патент США № 6495518; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, патент США № 6780843; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes, патент США № 6306993; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes, патент США № 6495663; and Pamela B. Davis et al., Fusion Proteins for Protein Delivery, патент США № 6287817, кожна з яких включена шляхом посилання.

Доставляючий агент також може представляти собою агент, який дає можливість або підсилює клітинне захоплення не ковалентного асоційованого компоненту, такого як FGFR2, FGFR3, SV2c або SNAP-25. Способи, що діють у відсутність ковалентного зв'язку, і способи з використанням таких агентів описані, наприклад, в Gilles Divita et al, Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use, патент США № 6841535; Philip L Felgner and Olivier Zelphati, Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use, публікація патенту США № 2003/0008813; і Michael Karas, Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids, публікація патенту США № 2004/0209797, кожна з яких включена шляхом посилання. Такі пептидні доставляючі агенти можуть бути одержані і використані за допомогою стандартних способів і є у продажу, дивися, наприклад реагент CHARIOT™ (Active Motif, Carlsbad, CA); реагент BIO-PORTER® (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA), білковий доставляючий реагент BIO TREK™ (Stratagene, La Jolla, CA), і білковий реагент для трансфекції PRO-JECT™ (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

Аспекти даного опису включають, частково, зразок, BoNT/A, що містить. Використовуваний тут термін "зразок, BoNT/A", що містить, відноситься до будь-якого біологічного матеріалу, який містить або потенційно містить активний BoNT/A. Безліч зразків може бути досліджено відповідно до способу, розкритого в даному описі, що включає без обмеження очищений, частково очищений або не очищений BoNT/A; рекомбінантний одноланцюговий або дволанцюговий токсин з природною або такою послідовністю, що не зустрічається в природі; рекомбінантний BoNT/A з модифікованою протеазною специфічністю; рекомбінантний BoNT/A із зміненою клітинною специфічністю; партію BoNT/A; приготований продукт BoNT/A, що включає, наприклад BOTOX®, DYSPORT®/RELOXIN®, XEOMIN®, PURTOX®, NEURONOX®, BTX-A і; клітини або неочищений продукт, фракціоновані або частково очищені клітинні лізати з, наприклад, бактерій, дріжджів, комах або ссавців; кров, плазму крові або сироватку крові; неочищений, частково приготований, приготований або оброблений продукти харчування; напої; корм тварин; зразки ґрунту; зразки води; ставкові донні відкладення; лосьйони; косметичні засоби; і клінічні препарати. Зрозуміло, що термін зразок охоплює зразки тканини, зразки тканини ссавців, що включають без обмеження, зразки тканини худоби, такі як зразки тканини овець, корів і свиней; зразки тканини приматів; і зразки людської тканини. Такі зразки охоплюють без обмеження інтестинальні зразки, такі як інтестинальні зразки немовлят і зразки тканин, одержані з рани. Як приклад, що не обмежує об'єм винаходу спосіб виявлення пікомолярних кількостей активності BoNT/A може бути корисний для визначення присутності або активності BoNT/A в зразку їжі або напою; для аналізу зразка, взятого у людини або тварини, наприклад підданої дії BoNT/A, або що має один або більш ніж один симптом ботулізму; для відстежування активності під час виробництва і очищення партії BoNT/A; для аналізу приготованого продукту BoNT/A, використовуваного у фармацевтичних або косметичних застосуваннях; або для аналізу зразка сироватки крові суб'єкта на присутність або відсутність нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A.

Таким чином, втілення зразка, що містить BoNT/A, є зразок, що містить будь-яку кількість BoNT/A. У аспектах цього втілення зразок, BoNT/A, що містить, містить приблизно 100 нг або менше, приблизно 10 нг або менше, приблизно 1 нг або менше, приблизно 100 пг або менше, приблизно 10 пг або менше, або приблизно 1 пг або менше BoNT/A. У інших аспектах цього втілення зразок, BoNT/A, що містить, містить приблизно 1 мМ або менше, приблизно 100 нМ або менше, приблизно 10 нМ або менше, приблизно 1 нМ або менше, приблизно 100 пМ або менше, приблизно 10 пМ або менше, приблизно 1 пМ або менше, приблизно 100 фМ або менше, приблизно 10 фМ або менше, або приблизно 1 фМ або менше BoNT/A.

Аспекти даного опису включають, частково, виділення з обробленої клітини компоненту SNAP-25, що містить SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту

розщеплювання BoNT/A. Використовуваний тут термін "компонент SNAP-25, що містить SNAP-25, має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A" відноситься до клітинного компоненту, що містить продукт розщеплювання SNAP-25. Передбачається, що будь-який спосіб, відповідний для збагачення або виділення компоненту

5 що включає SNAP-25, може бути корисний без обмеження, протоколи клітинного лізису, протоколи очищення на центрифужних колонках, імунопреципітацію, афінне очищення, і білкову хроматографію.

Аспекти даного опису включають, частково, антитіло α -SNAP-25, пов'язане з твердофазним носієм. Використовуваний тут термін "твердофазний носій" є синонімом "твердої фази" і

10 відноситься до будь-якої матриці, яка може бути використана для іммобілізації антитіла α -SNAP-25, розкритого в даному описі. Приклади твердофазних носіїв, що не обмежують об'єм, винаходу, включають, наприклад пробірку; планшет; колонку; шпильки або "щупи"; магнітну частинку, кульку або інші сферичні або волокнисті хроматографічні середовища, такі як, наприклад агарозу, сефарозу, діоксид кремнію і пластик; і листи або мембрани, такі як,

15 наприклад нітроцелюлоза і полівініліденфторидні (PVDF). Твердофазний носій може бути одержаний з використанням широкої різноманітності речовин, таких як, наприклад скло, вуглець, полістирол, полівінілхлорид, поліпропілен, поліетилен, декстран, нейлон, діазоцелюлоза або крохмаль. Вибраний твердофазний носій може мати фізичними властивостями, які наділяють його здатністю легко відділятися від розчинної або нерозчинної

20 речовини і як правило дає можливість для відділення або яким-небудь іншим способом видалення не зв'язаних речовин, таких як, наприклад надлишок реагентів, побічних продуктів реакції або розчинників (шляхом, наприклад промивки, фільтрування, центрифугування і так далі) з твердофазним пов'язаним носієм з аналізованим компонентом. Приклади, що не обмежують об'єм винаходу, того, як одержувати і використовувати твердофазні носії описані,

25 наприклад в Molecular Cloning, A Laboratory Manual, вище (2001); і Current Protocols in Molecular Biology, вище, (2004), кожна з яких включена тут шляхом посилання.

Аспекти даного опису включають, частково, виявлення присутності комплексу антитіло-антиген, що містить антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, і продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Передбачається, що будь-яка виявлена система може бути використана для практичних аспектів даного розкритого імунологічного способу, за умови, що відношення сигналу до шуму може статистично значущо відрізнитися для комплексу антитіло-антиген від фонового сигналу. Приклади імунологічних систем виявлення, що не обмежують

35 об'єм винаходу, включають аналіз шляхом імуноблоттингу, такого як вестерн-блоттинг і дот-блоттинг, аналіз шляхом імунопреципітації, імуноферментний аналіз (ELISA), і сендвіч ELISA. Виявлення сигналу може бути досягнуте з використанням авторадіографії з візуалізацією або фосфор-візуалізацією (AU), хемілюмінісценції (CL), електрохемілюмінісценції (ECL), біологічної люмінесценції (BL), флуоресценції, резонансного перенесення енергії, площинної поляризації, колориметрії, або проточної цитометрії (FC). Описи імунологічних систем виявлення розкриті, наприклад в Michael M. Rauhut, Chemiluminescence, In Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3rd ed, John Wiley and Sons, 1985); A. W. Knight, A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenenerated Chemiluminescence, Trends Anal. Chem. 18(1): 47-62 (1999); K. A. Fahnrich, et al., Recent Applications of Electrogenenerated Chemiluminescence in Chemical Analysis, Talanta 54(4): 531-559 (2001); Commonly Used Techniques in Molecular Cloning, pp. A8.1-A8-55 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001); Detection Systems, pp. A9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001); Electrogenenerated Chemiluminescence, (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004), кожна з яких

40 включена тут шляхом посилання.

Сендвіч ІФА (ELISA) (або сендвіч імуноаналіз) є спосіб, заснований на двох антитілах, які зв'язуються з різними епітопами на антигені. Захоплююче антитіло, що має високу зв'язуючу специфічність відносно відповідного антигена, пов'язане з твердою поверхнею. Потім додають антиген, а потім вторинне антитіло, назване як виявляюче антитіло. Виявляюче антитіло зв'язується з антигеном в тому, що відрізняється від захоплюючого антитіла епітопом домені. Таким чином, антигеном є "сендвіч" між двома антитілами. Афінність скріплення антитіла з антигеном зазвичай є основним показником чутливості імуноаналізу. У міру збільшення концентрації антигена збільшується величина виявлення антитілом, що приводить до вищої вимірюваної відповіді. Для кількісної оцінки ступеня скріплення можуть бути використані різні

55 репортерні системи, такі як, наприклад фермент, приєднаний до вторинного антитіла, і

60

субстрат-репортер, де ферментативна реакція приводить до прочитування сигналу, що виявляється. Сигнал, що утворюється, пропорційний кількості антигена-мішені, присутній в зразку. Субстрат-репортер, використовуваний для вимірювання зв'язуючої події, визначає спосіб виявлення. Спектрофотометрія планшетний рідер використовується для колориметричного виявлення. Розроблені хемілюмінісцентні і електрохемілюмінісцентні субстрати, які додатково ампліфікують сигнал і можуть бути візуалізовані на люмінісцентному рідері. Репортер також може представляти флуоресцентне прочитування, де ферментативна стадія аналізу заміщена на флуорофор, і прочитування тоді здійснюють з використанням флуоресцентного рідера. Реагенти і протоколи, необхідні для здійснення ECL сендвіч ІФА, є у продажу, що включають без виключення платформу для виявлення MSD сендвіч ELISA-ECL (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

Таким чином, втілення виявлення присутності комплексу антитіло-антиген, що містить антитіло α -SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, і продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, може бути здійснене з використанням аналізу методом імуноблоттингу, аналізу шляхом імунопреципітації, ІФА або сендвіч ІФА. У аспектах цього втілення виявлення здійснюють з використанням AU, CL, ECL або BL аналізу шляхом імуноблоттингу, AU, CL, ECL, BL або FC аналізу шляхом імунопреципітації, AU, CL, ECL, BL або FC ІФА, або AU, CL, ECL, BL або FC сендвіч ІФА.

Аспекти даного опису можуть бути практично реалізовані в моноплексному або мультиплексному варіантах. Імунологічний спосіб виявлення активності BoNT/A, практично реалізований в одноплексному варіанті, є спосіб, який виявляє тільки присутність комплексу антитіло-антиген, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Імунологічний спосіб виявлення активності BoNT/A, практично реалізований в мультиплексному варіанті, є спосіб, який одночасно виявляє присутність двох або більш ніж двох комплексів антитіло-антиген; один з яких є комплексом антитіло-антиген, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A; а інший(е) з яких є комплексом антитіло-антиген з другим, третім, четвертим і так далі білком, що відрізняється. Другий білок може бути використаний, наприклад як внутрішній контроль для мінімізації варіабільності між зразками шляхом нормалізації знайденої кількості комплексу антитіло-антиген α -SNAP-25/SNAP-25, щодо кількості комплексу антитіло-антиген, що виявляється для другого білка. Сам по собі, другий білок зазвичай є білком, який погоджено експресується клітиною, такий як внутрішній білок. Приклади корисного другого білка, що не обмежують об'єм винаходу, включають, наприклад гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу (GAPDH), синтаксин, цитокіни. Способи здійснення імунологічного аналізу в мультиплексному варіанті описані, наприклад в U. B. Nielsen and B. H. Geierstanger, Multiplexed Sandwich Assays in Microarray Format, J. Immunol. Methods. 290(1-2): 107-120 2004); R. Barry and M. Soloviev, Quantitative Protein Profiling using Antibody Arrays, Proteomics, 4(12): 3717-3726 (2004); M. M. Ling et al., Multiplexing Molecular Diagnostics and Immunoassays using Emerging Microarray Technologies, Expert Rev Mol Diagn. 7(1): 87-98 (2007); S. X. Leng et al., ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research, J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63(8): 879-884 (2008), кожна з яких включена тут шляхом посилання.

Таким чином, в одному з втілень імунологічний спосіб виявлення активності BoNT/A практично реалізований в моноплексному варіанті шляхом виявлення тільки присутності комплексу антитіло-антиген, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. У ще одному втіленні імунологічний спосіб виявлення активності BoNT/A практично реалізується в мультиплексному варіанті шляхом одночасного виявлення присутності комплексу антитіло-антиген, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, і, щонайменше, один інший комплекс антитіло-антиген з білком, що відрізняється від SNAP-25, таким як, наприклад GAPDH або синтаксин.

У аспектах даного опису частково запропонований спосіб визначення імунорезистентності до BoNT/A. Використовуваний тут термін "імунорезистентність до BoNT/A" означає ссавця, який повністю не реагує на терапію BoNT/A або демонструє зменшену сприятливу дію терапії BoNT/A, оскільки імунна відповідь цього ссавця прямо або опосередковано зменшує ефективність терапії. Прикладом зменшеної ефективності, що не обмежують об'єм винаходу, може бути присутність у ссавця щонайменше одного нейтралізуючого α -BoNT/A антитіла, яке

зв'язується з токсином BoNT/A таким чином, що зменшує або перешкоджає специфічності або активності токсину. Використовуваний тут термін "терапія BoNT/A" позначає обробку, засіб, лікування, загоєння, реабілітацію або будь-який інший засіб, протидіючий тому, що є небажаним для ссавця, вимагаючи нейромодуляції з використанням токсину BoNT/A токсин або введення ссавцеві однієї або більше ніж однієї контрольованої дози лікарського засобу, препарату або суміші токсину BoNT/A, який має медичну, терапевтичну, лікувальну, косметичну, цілющу або будь-яку іншу сприятливу дію. Терапія охоплює без обмеження застосування будь-якого BoNT/A, що зустрічається в природі або модифікованого фрагмента в будь-якому препараті, комбінованому з будь-яким носієм або активним інгредієнтом, і що вводиться за допомогою будь-якого шляху. Приклад добре відомій терапії BoNT/A є терапія BOTOX®.

У аспектах даного опису запропонований, частково, тестований зразок, відібраний у ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A. Використовуваний тут термін "тестований зразок" відноситься до будь-якого біологічного матеріалу, який містить або потенційно містить щонайменше одне антитіло α -BoNT/A. Антитіло α -BoNT/A може бути нейтралізуючим антитілом проти BoNT/A або не нейтралізуючим антитілом проти BoNT/A. Використовуваний тут термін "нейтралізуюче антитіло проти BoNT/A" позначає будь-яке антитіло α -BoNT/A, яке у фізіологічних умовах зв'язується з областю токсину BoNT/A так, щоб зменшити або запобігти прояву токсину своєї дії в терапії BoNT/A. Використовуваний тут термін "не нейтралізуюче антитіло проти α -BoNT/A" позначає будь-яке антитіло проти α -BoNT/A, яке у фізіологічних умовах зв'язується з областю токсину BoNT/A, але припускає, що токсин проявлятиме свою дію в терапії BoNT/A. Передбачається, що будь-який і всі зразки, які можуть містити антитіло α -BoNT/A, можуть бути використані в цьому способі, що включають без обмеження кров, плазму крові, сироватку крові і лімфатичну рідину. Додатково, будь-який і всі організми, здатні збільшувати рівень антитіл α -BoNT/A проти токсину BoNT/A, можуть служити як джерело для зразка що включає без обмеження птахів і ссавців, що включають і ссавців, включають мишей, щурів, кіз, овець, коней, ослів, корів, приматів і людей. Приклади специфічних протоколів, що не обмежують об'єм винаходу для відбору крові і приготування сироватки крові описані, наприклад в Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, Blood Collection in Healthcare (F.A. Davis Company, 2001); і Diana Garza & Kathleen Becan-McBride, Phlebotomy Handbook: Blood Collection Essentials (Prentice Hall, 6th ed., 2002). Цими протоколами є стандартні процедури, що знаходяться в обсязі знань фахівця в даній області техніки, і зрозумілі з приведеної тут ідеї. Тестований зразок може бути одержаний з організму перед дією токсину BoNT/A, після разової обробки BoNT/A, після множинних обробок токсинном BoNT/A, перед виникненням резистентності до терапії BoNT/A або після виникнення резистентності до терапії BoNT/A.

У аспектах даного опису запропонований, частково, контрольний зразок. Використовуваний тут термін "контрольний зразок" позначає будь-який зразок, для якого відома присутність або відсутність тестованого зразка і включає як негативні, так і позитивні контрольні зразки. Відносно нейтралізуючих α -BoNT/A антитіл негативний контрольний зразок може бути одержаний у індивідів, які ніколи не піддавалися дії BoNT/A, і може включати без обмеження зразок зразка індивіда, у якого відбирається тестований зразок, але відбирається до того, як здійснюється терапія з використанням BoNT/A; зразки, відібрані з різних індивідів, які ніколи не піддавалися дії BoNT/A; об'єднаний зразок, відібраний у безлічі різних індивідів, які ніколи не піддавалися дії BoNT/A. Відносно нейтралізуючих α -BoNT/A антитіл позитивний контрольний зразок може бути одержаний у індивіда, демонструючого імунорезистентність до BoNT/A, і індивіда, включеного без обмеження, для якого продемонстровано позитивне тестування в тестуючих аналізах на пацієнтах; індивіда, для якого продемонстровано позитивне тестування в біологічному аналізі *in vivo*; і індивіда, що демонструє гіперімунітет, наприклад індивіда, вакцинованого BoNT/A.

Додатково припускають, що антитіла α -BoNT/A можуть бути очищені із зразка. Антитіла проти BoNT/A можуть бути очищені із зразка з використанням різних способів, що включають без обмеження білкову хроматографію і афінну хроматографію A/G. Приклади, що не обмежують об'єм винаходу, специфічних протоколів очищення антитіл із зразка описані, наприклад в Antibodies: A Laboratory Manual (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998); Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. 1 (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998); і Molecular Cloning, A Laboratory Manual, *supra*, (2001), які включені тут шляхом посилання. Додатково, приклади способів очищення антитіл, що не обмежують об'єм винаходу, а також добре охарактеризовані реагенти, умови і протоколи легко доступні з комерційних джерел, які включають без обмеження Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; і Zymed Laboratories, Inc.,

South San Francisco, CA. Цими протоколами є стандартні процедури, добре відомі фахівцям в даній області техніки.

Таким чином, втілення зразка включає кров. У аспекті цього втілення зразок включає кров миші, кров щура, кров кози, кров вівці, кров коня, кров осла, кров корови, кров примату або кров людини. У ще одному втіленні зразок включає плазму крові. У аспекті цього втілення тестований зразок включає плазму крові миші, плазму крові щура, плазму крові кози, плазму крові вівці, плазму крові коня, плазму крові осла, плазму крові корови, плазму крові примату або плазму крові людини. У ще одному втіленні зразок включає сироватку крові. У аспекті цього втілення зразок включає сироватку крові миші, сироватку крові щура, сироватку крові кози, сироватку крові вівці, сироватку крові коня, сироватку крові осла, сироватку крові корови, сироватку крові примату і сироватку крові людини. У ще одному втіленні зразок включає лімфатичну рідину. У аспекті цього втілення зразок включає лімфатичну рідину миші, лімфатичну рідину щура, лімфатичну рідину кози, лімфатичну рідину вівці, лімфатичну рідину коня, лімфатичну рідину осла, лімфатичну рідину корови, лімфатичну рідину примату або лімфатичну рідину людини. У ще одному втіленні зразком є тестованим зразком. У ще одному втіленні зразок є контрольним зразком. У аспектах цього втілення контрольним зразком є негативний контрольний зразок або позитивний контрольний зразок.

У аспектах даного опису запропоновані, частково, порівняння кількості SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, виявленого на стадії (г), з кількістю SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, виявленого на стадії (д). У втіленні кількість продукту розщеплювання SNAP-25 в тестованому зразку вище в порівнянні з кількістю продукту розщеплювання SNAP-25 в контрольному зразку. У аспекті цього втілення вища кількість продукту розщеплювання SNAP-25 в тестованому зразку в порівнянні з позитивним контрольним зразком указує на зменшення або втрату імунорезистентності до BoNT/A у ссавця. У ще одному аспекті цього втілення еквівалентна кількість продукту розщеплювання SNAP-25 в тестованому зразку в порівнянні з негативним контрольним зразком указує на зменшення або втрату імунорезистентності до BoNT/A у ссавця. У ще одному втіленні кількість продукту розщеплювання SNAP-25 в тестованому зразку менша в порівнянні з кількістю продукту розщеплювання SNAP-25 в контрольному зразку. У аспекті цього втілення менша або еквівалентна кількість продукту розщеплювання SNAP-25 в тестованому зразку в порівнянні з позитивним контрольним зразком указує на збільшення або наявність імунорезистентності до BoNT/A у ссавця. У ще одному аспекті цього втілення менша кількість продукту розщеплювання SNAP-25 в тестованому зразку в порівнянні з негативним контрольним зразком указує на збільшення або наявність імунорезистентності до BoNT/A у ссавця.

Передбачається, що будь-яка і всі умови аналізу, відповідна для виявлення присутності нейтралізуючого α-BoNT/A антитіла в зразку, корисні в способах, розкритих в даному описі, таких як, наприклад лінійні умови аналізу і нелінійні умови аналізу. У втіленні умови аналізу є лінійними. У аспекті цього втілення кількість BoNT/A в аналізі узятя в надлишку. У ще одному аспекті цього втілення кількість BoNT/A в аналізі обмежує швидкість. У ще одному аспекті цього втілення кількість тестованого зразка в аналізі обмежує швидкість.

Аспекти даного опису також можуть бути описані таким чином:

1. Композиція, що містить носій, приєднаний до гнучкого лінкера, пов'язаного з антигеном SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A.

2. Композиція за п. 1, де залишком P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A є глутамін або лізин.

3. Композиція за п. 1, де антиген SNAP-25 містить SEQ ID NO: 147.

4. Композиція за п. 1, де амінокислотна послідовність гнучкого лінкера і антигена SNAP-25 є SEQ ID NO: 38 або SEQ ID NO: 46.

5. Виділене антитіло α-SNAP-25, де виділені антитіло α-SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25.

6. Виділені антитіло α-SNAP-25 за п. 5, де антитіло α-SNAP-25 має константу швидкості асоціації для епітопа, що не містить С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, складову менше $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; і де антитіло α-SNAP-25 має рівноважну константу дисоціації для епітопа менше 0,450 nM.

7. Виділене антитіло α-SNAP-25 за п. 5, де виділене антитіло α-SNAP-25 має варіабільну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80 і SEQ ID NO: 82; і

варіабільною область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 і SEQ ID NO: 92.

8. Виділене антитіло α -SNAP-25 за п. 5, де виділене антитіло α -SNAP-25 містить щонайменше VH CDR1 з SEQ ID NO: 93, VH CDR1 з SEQ ID NO: 94, VH CDR1 з SEQ ID NO: 95, VH CDR1 з SEQ ID NO: 118, VH CDR1 з SEQ ID NO: 119, або VH CDR1 з SEQ ID NO: 120.

9. Виділене антитіло α -SNAP-25 за п. 5, де виділене антитіло α -SNAP-25 містить щонайменше VH CDR2 з SEQ ID NO: 96, VH CDR2 з SEQ ID NO: 97, VH CDR2 з SEQ ID NO: 98, VH CDR2 з SEQ ID NO: 99, VH CDR2 з SEQ ID NO: 121, VH CDR2 з SEQ ID NO: 122, або VH CDR2 з SEQ ID NO: 123.

10. Виділене антитіло α -SNAP-25 за п. 5, де виділене антитіло α -SNAP-25 містить, щонайменше, VH CDR3 з SEQ ID NO: 100, VH CDR3 з SEQ ID NO: 101, VH CDR3 з SEQ ID NO: 102, або VH CDR3 з SEQ ID NO: 124.

11. Виділене антитіло α -SNAP-25 за п. 5, де виділене антитіло α -SNAP-25 містить, щонайменше, VL CDR1 з SEQ ID NO: 103, VL CDR1 з SEQ ID NO: 104, VL CDR1 з SEQ ID NO: 105, VL CDR1 з SEQ ID NO: 106, VL CDR1 з SEQ ID NO: 107, VL CDR1 з SEQ ID NO: 125, VL CDR1 з SEQ ID NO: 126, VL CDR1 з SEQ ID NO: 127, VL CDR1 з SEQ ID NO: 128 або VL CDR1 з SEQ ID NO: 129.

12. Виділене антитіло α -SNAP-25 за п. 5, де виділене антитіло α -SNAP-25 містить, щонайменше, VL CDR2 з SEQ ID NO: 108, VL CDR2 з SEQ ID NO: 109, VL CDR2 з SEQ ID NO: 110, VL CDR2 з SEQ ID NO: 111, або VL CDR2 з SEQ ID NO: 112.

13. Виділене антитіло α -SNAP-25 за п. 5, де виділені антитіло α -SNAP-25 містить, щонайменше, VL CDR3 з SEQ ID NO: 113, VL CDR3 з SEQ ID NO: 114, VL CDR3 з SEQ ID NO: 115, VL CDR3 з SEQ ID NO: 116, або VL CDR3 з SEQ ID NO: 117.

14. Виділене антитіло α -SNAP-25 за п. 5, де виділене антитіло α -SNAP-25 містить варіабільну область важкого ланцюга, SEQ ID NO, що містить: 93, SEQ ID NO: 121 і SEQ ID NO: 100; і варіабільну область легкого ланцюга, SEQ ID NO, що містить: 105, SEQ ID NO: 110 і SEQ ID NO: 115.

15. Виділене антитіло α -SNAP-25 за п. 5, де виділене антитіло α -SNAP-25 вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25 в SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147 або SEQ ID NO: 148.

16. Виділене антитіло α -SNAP-25 за п. 5, де виділене антитіло α -SNAP-25 вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25 в SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 або SEQ ID NO: 44.

17. Спосіб виявлення активності BoNT/A, де спосіб включає стадії: а) обробки клітини із стабільної клітинної лінії зразком, що містить BoNT/A, де клітина із стабільної клітинної лінії чутлива до інтоксикації BoNT/A;

б) виділення з обробленої клітини компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

в) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, де антитіло α -SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25; і

г) виявлення присутності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25; де виявлення за допомогою комплексу антиген-антитіло є показником активності BoNT/A.

18. Спосіб виявлення активності BoNT/A, де спосіб включає стадії: а) обробки клітини із стабільної клітинної лінії зразком, що містить BoNT/A, де клітина із стабільної клітинної лінії чутлива до інтоксикації BoNT/A;

б) виділення з обробленої клітини компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

в) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, пов'язаним з твердофазним носієм, де антитіло α -SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25; і

г) виявлення присутності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25; де виявлення за допомогою комплексу антитіло-антиген є показником активності BoNT/A.

19. Спосіб виявлення активності BoNT/A, де спосіб включає стадії:

а) обробки клітини із стабільної клітинної лінії зразком, що містить BoNT/A, де клітина із стабільної клітинної лінії чутлива до інтоксикації BoNT/A;

б) виділення з обробленої клітини компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

в) фіксації компоненту SNAP-25 на твердофазному носії;

г) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α-SNAP-25, де антитіло α-SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25; і

д) виявлення наявності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α-SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25; де виявлення за допомогою комплексу антиген-антитіло є показником активності BoNT/A.

20. Спосіб виявлення активності BoNT/A, де спосіб включає стадії:

а) обробки клітини із стабільної клітинної лінії зразком, що містить BoNT/A, де клітина із стабільної клітинної лінії може захоплювати BoNT/A;

б) виділення з обробленої клітини компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

в) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α-SNAP-25, де антитіло α-SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25; і

г) виявлення наявності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α-SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25; де виявлення за допомогою комплексу антиген-антитіло є показником активності BoNT/A.

21. Спосіб виявлення активності BoNT/A, де спосіб включає стадії:

а) обробки клітини із стабільної клітинної лінії зразком, що містить BoNT/A, де клітина із стабільної клітинної лінії може захоплювати BoNT/A;

б) виділення з обробленої клітини компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

в) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α-SNAP-25, пов'язаним з твердофазним носієм, де антитіло α-SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25; і

г) виявлення присутності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α-SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25; де виявлення за допомогою комплексу антитіло-антиген є показником активності BoNT/A.

22. Спосіб виявлення активності BoNT/A, де спосіб включає стадії:

а) обробки клітини із стабільної клітинної лінії зразком, що містить BoNT/A, де клітина із стабільної клітинної лінії може захоплювати BoNT/A;

б) виділення з обробленої клітини компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

в) фіксації компоненту SNAP-25 на твердофазному носії;

г) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α-SNAP-25, де антитіло α-SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25; і

д) виявлення присутності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α-SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25; де виявлення за допомогою комплексу антиген-антитіло є показником активності BoNT/A.

23. Спосіб визначення імунорезистентності до BoNT/A у ссавця, що включає стадії: а) додавання BoNT/A до тестованого зразка, одержаного у ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл α-BoNT/A;

б) обробки клітини із стабільної клітинної лінії тестованим зразком, де клітина із стабільної клітинної лінії чутлива до інтоксикації BoNT/A;

в) виділення з оброблених клітин компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

г) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α-SNAP-25, де антитіло α-SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту

розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25;

д) виявлення наявності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25;

5 е) повторення стадій б-д з негативним контрольним зразком замість тестованого зразка, де негативний контрольний зразок містить BoNT/A і сироватку крові, про яку відомо, що вона не містить α -BoNT/A нейтралізуючих антитіл; і

ж) порівняння кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії д, з кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленим на стадії е, де виявлення меншої кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії д, щодо кількості комплексу антитіло-антиген, 10 виявленого на стадії е, є показником присутності нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A.

24. Спосіб визначення імунорезистентності до BoNT/A у ссавця, що включає стадії: а) додавання BoNT/A до тестованого зразка, одержаного у ссавця, тестованого на наявність або відсутність α -BoNT/A нейтралізуючих антитіл;

15 б) обробки клітини із стабільної клітинної лінії тестованим зразком, де клітина із стабільної клітинної лінії чутлива до інтоксикації BoNT/A;

в) виділення з оброблених клітин компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

г) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, пов'язаним з 20 твердофазним носієм, де антитіло α -SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25;

д) виявлення наявності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25;

25 е) повторення стадій б-д з негативним контрольним зразком замість тестованого зразка, де негативний контрольний зразок містить BoNT/A і сироватку крові, про яку відомо, що вона не містить α -BoNT/A нейтралізуючих антитіл; і ж) порівняння кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії д, з кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії е, де виявлення меншої кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії д, в порівнянні з 30 кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії е, є показником присутності α -BoNT/A нейтралізуючих антитіл.

25. Спосіб визначення імунорезистентності до BoNT/A у ссавця, що включає стадії: а) додавання BoNT/A до тестованого зразка, одержаного у ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A;

35 б) обробки клітини із стабільної клітинної лінії тестованим зразком, де клітина із стабільної клітинної лінії чутлива до інтоксикації BoNT/A;

в) виділення з оброблених клітин компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

40 г) фіксації компоненту SNAP-25 на твердофазному носії;

д) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, де антитіло α -SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25;

45 е) виявлення присутності комплексу α -BoNT/A, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25;

ж) повторення стадій б-е з негативним контрольним зразком замість тестованого зразка, де негативний контрольний зразок містить BoNT/A і сироватку крові, про яку відомо, що вона не містить нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A; і з) порівняння кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії е з кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії ж, де виявлення меншої кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії е, в порівнянні з 50 кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії ж, є показником присутності нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A.

26. Спосіб визначення імунорезистентності до BoNT/A у ссавця, що включає стадії:

55 а) додавання BoNT/A до тестованого зразка, одержаного у ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A;

б) обробки клітини із стабільної клітинної лінії тестованим зразком, де клітина із стабільної клітинної лінії може захоплювати BoNT/A;

60 в) виділення з оброблених клітин компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

г) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, де антитіло α -SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25;

5 д) виявлення наявності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25;

е) повторення стадій б-д з негативним контрольним зразком замість тестованого зразка, де негативний контрольний зразок містить BoNT/A і сироватку крові, про яку відомо, що вона не містить нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A; і

10 ж) порівняння кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії д, з кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії е, де виявлення меншої кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії д, в порівнянні з кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленим на стадії е, є показником присутності нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A.

27. Спосіб визначення імунорезистентності до BoNT/A у ссавця, що включає стадії:

15 а) додавання BoNT/A до тестованого зразка, одержаного у ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A;

б) обробки клітини із стабільної клітинної лінії тестованим зразком, де клітина із стабільної клітинної лінії може захоплювати BoNT/A;

20 в) виділення з оброблених клітин компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25 С-кінець, що має, на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

г) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, пов'язаним з твердофазним носієм, де антитіло α -SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25;

25 д) виявлення наявності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25;

е) повторення стадій б-д з негативним контрольним зразком замість тестованого зразка, де негативний контрольний зразок містить BoNT/A і сироватку крові, про яку відомо, що вона не містить нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A; і

30 ж) порівняння кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії д, з кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії е, де виявлення меншої кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії д в порівнянні з кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленим на стадії е, є показником присутності нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A.

28. Спосіб визначення імунорезистентності до BoNT/A у ссавця, що включає стадії:

35 а) додавання BoNT/A до тестованого зразка, одержаного у ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A;

б) обробки клітини із стабільної клітинної лінії тестованим зразком, де клітина із стабільної клітинної лінії може захоплювати BoNT/A;

40 в) виділення з оброблених клітин компоненту SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

г) фіксації компоненту SNAP-25 на твердофазному носії;

45 д) приведення в контакт компоненту SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, де антитіло α -SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25;

е) виявлення наявності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25;

50 ж) повторення стадій б-е з негативним контрольним зразком замість тестованого зразка, де негативний контрольний зразок містить BoNT/A і сироватку крові, про яку відомо, що вона не містить нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A; і

с) порівняння кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії е, з кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії ж, де виявлення меншої кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії е, в порівнянні з кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії ж, є показником присутності нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A.

55 29. Спосіб за пп. 17-22 і 23-25, де клітина чутлива до інтоксикації BoNT/A в концентрації, приблизно 500 пМ або менше, приблизно 400 пМ або менше, приблизно 300 пМ або менше, приблизно 200 пМ або менше, приблизно 100 пМ або менше BoNT/A.

60 30. Спосіб за пп. 20-22 і 26-28, де клітина може захоплювати, приблизно 500 пМ або менше, приблизно 400 пМ або менше, приблизно 300 пМ або менше, приблизно 200 пМ або менше, приблизно 100 пМ або менше BoNT/A.

31. Спосіб за пп. 17-22, де зразок містить, приблизно 100 нг або менше, приблизно 10 нг або менше, приблизно 1 нг або менше, 100 фг або менше, 10 фг або менше або 1 фг або менше BoNT/A.

5 32. Спосіб за пп. 17-22, де зразок містить, приблизно 100 нМ або менше, приблизно 10 нМ або менше, приблизно 1 нМ або менше, приблизно 100 пМ або менше, приблизно 10 пМ або менше, приблизно 1 пМ або менше, приблизно 100 фМ або менше, приблизно 10 фМ або менше, або приблизно 1 фМ або менше BoNT/A.

33. Спосіб за пп. 17-28, де антитіло α -SNAP-25 є виділеним антитілом α -SNAP-25 за пп. 5-16.

10 34. Спосіб за пп. 17-28, де присутність комплексу антиген-антитіло виявляють за допомогою аналізу шляхом імуноблоттингу, аналізу шляхом імунопреципітації, ІФА або сендвіч ІФА

35. Спосіб за пп. 17-28, де імунологічний спосіб має відношення сигналу до шуму для нижньої асимптоти, щонайменше 3:1, щонайменше 5:1, щонайменше 10:1, щонайменше 20:1, щонайменше 50:1 або щонайменше 100:1.

15 36. Спосіб за пп. 17-28, де імунологічний спосіб має відношення сигналу до шуму для верхньої асимптоти, щонайменше 10:1, щонайменше 20:1, щонайменше 50:1, щонайменше 100:1, щонайменше 200:1, щонайменше 300:1, щонайменше 400:1, щонайменше 500:1 або, щонайменше 600:1.

20 37. Спосіб за пп. 17-28, де імунологічний спосіб може виявляти EC50 для активності, наприклад, щонайменше 100 нг, щонайменше 50 нг, щонайменше 10 нг, щонайменше 5 нг, щонайменше 100 пг, щонайменше 50 пг, щонайменше 10 пг, щонайменше 5 пг, щонайменше 100 фг, щонайменше 50 фг, щонайменше 10 фг або, щонайменше 5 фг.

25 38. Спосіб за пп. 17-28, де імунологічний спосіб може виявляти EC50 для активності, наприклад, щонайменше 10 нМ, щонайменше 5 нМ, щонайменше 100 пМ, щонайменше 50 пМ, щонайменше 10 пМ, щонайменше 5 пМ, щонайменше 100 фМ, щонайменше 50 фМ, щонайменше 10 фМ, щонайменше 5 фМ або, щонайменше 1 фМ.

39. Спосіб за пп. 17-28, де імунологічний спосіб має LOD (межа виявлення), наприклад 10 пг або менше, 9 пг або менше, 8 пг або менше, 7 пг або менше, 6 пг або менше, 5 пг або менше, 4 пг або менше, 3 пг або менше, 2 пг або менше, 1 пг або менше BoNT/A.

30 40. Спосіб за пп. 17-28, де імунологічний спосіб має LOD, наприклад 100 фМ або менше, 90 фМ або менше, 80 фМ або менше, 70 фМ або менше, 60 фМ або менше, 50 фМ або менше, 40 фМ або менше, 30 фМ або менше, 20 фМ або менше, або 10 фМ або менше BoNT/A.

41. Спосіб за пп. 17-28, де імунологічний спосіб має LOQ (межа чутливості), наприклад 10 пг або менше, 9 пг або менше, 8 пг або менше, 7 пг або менше, 6 пг або менше, 5 пг або менше, 4 пг або менше, 3 пг або менше, 2 пг або менше, 1 пг або менше BoNT/A.

35 42. Спосіб за пп. 17-28, де імунологічний спосіб має LOQ, наприклад, 100 фМ або менше, 90 фМ або менше, 80 фМ або менше, 70 фМ або менше, 60 фМ або менше, 50 фМ або менше, 40 фМ або менше, 30 фМ або менше, 20 фМ або менше, або 10 фМ або менше BoNT/A.

40 43. Спосіб за пп. 17-28, де імунологічний спосіб може розрізняти повністю активний BoNT/A від частково-активного BoNT/A, що має 70 % або менше, 60 % або менше, 50 % або менше, 40 % або менше, 30 % або менше, 20 % або менше, або 10 % або менше активності в порівнянні з повністю активним BoNT/A.

Приклади

Приклад I

Скринінг клітинних ліній-кандидатів

45 У наступному прикладі проілюстроване те, як ідентифікувати стійкі клітинні лінії, чутливі до інтоксикації BoNT/A, або що мають здатність захоплювати BoNT/A, потрібну для способу виявлення активності BoNT/A, розкритому в даному описі.

1. Зростання початкової культури клітинних ліній-кандидатів.

50 Для вирощування клітинних ліній, відповідну щільність клітин з тестованої клітинної лінії висівали в колбу для культури тканин площею 162 см², що містить 30 мл відповідного ростового середовища (дивися Таблицю 1), і вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % або 10 % діоксиду вуглецю до тих пір, поки клітини не досягнуть бажаної щільності.

Таблиця 1

Середовища, використовувані в скринінгу клітинної лінії

Клітинна лінія	Композиція сироваткових ростових середовищ
Kelly SiMa	RPMI 1640, 10 % фетальна теляча сироватка, 1 % пеніцилін-стрептоміцин, 2 мМ L-глутамін
NB69	RPMI 1640, 15 % фетальна теляча сироватка, 1 % пеніцилін-стрептоміцин
CHP-126	RPMI 1640, 20 % фетальна теляча сироватка, 1 % пеніцилін-стрептоміцин
N4TG3	RPMI 1640, 10 % фетальна теляча сироватка, 1 % пеніцилін-стрептоміцин, 100 мкМ 6-тіогуанін
MHN-NB-11	RPMI 1640, 10 % фетальна теляча сироватка, 1 % пеніцилін-стрептоміцин, 2 мМ L-глутамін, 0,1 мМ замінимі амінокислоти
PC12	RPMI 1640, 5 % інактивована теплом фетальна теляча сироватка, 10 % кінська сироватка крові, 2 мМ GlutaMAX™, 10 мМ NEPES, 1 мМ піруват натрію, 1 % пеніцилін-стрептоміцин
N18TG2	DMEM (11885-084, Gibco), 10 % фетальна теляча сироватка, 1 % пеніцилін-стрептоміцин, 100 мкМ 6-тіогуанін
N1E-115 N18 ND8/34 NG108-15 NG115-401L NS20Y SK-N-SH	90 % DMEM (середовище Голка, модифікована Дульбекко), 10 % інактивована теплом фетальна теляча сироватка, 2 мМ Глутамін, 2 мМ глюкоза
SK-N-DZ SK-N-F1	90 % DMEM, 10 % інактивована теплом фетальна теляча сироватка, 4 мМ Глутамін, 4 мМ глюкоза, 0,1 мМ замінимі амінокислоти, 1,5 г/л NaHCO ₃
BE(2) -C BE(2)-M17 CHP-212 LA-1-55n LA-N ⁻¹ MC ⁻¹ XC SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM(11090-081, Gibco), Ham's F12 (11765-054, Gibco), 10 % інактивована теплом фетальна теляча сироватка, 2 мМ Глутамін, 0,1 мМ замінимі амінокислоти
NB4 1A3	Ham's F10 (12471-017, Gibco), 2,5 % інактивована теплом фетальна теляча сироватка, 15 % інактивована теплом кінська сироватка крові, 2 мМ Глутамін
Neuro-2a	EMEM, 10 % інактивована теплом фетальна теляча сироватка, 2 мМ Глутамін, 0,1 мМ замінимі амінокислоти, 1,5 г/л NaHCO ₃ , 1 мМ піруват натрію

2. Однодозовий скринінг клітинних ліній-кандидатів з використанням 1 нМ BoNT/A.

- Один з параметрів, тестований для поліпшення чутливості клітинного аналізу, полягав в ідентифікації відповідних клітинних ліній, які демонструють хорошу здатність захоплювати кластридальний нейротоксин і прикріплюватися до поверхні субстрату. Початково, клітинні лінії тестували відносно їх здатності захоплювати 1 нМ BoNT/A і їх здібності прикріплюватися до поверхні. Для визначення того, чи здатна клітинна лінія захоплювати 1 нМ BoNT/A, відповідну щільність клітин з початкової культури тестованої клітинної лінії висівали в лунки 24-лункових планшетів для культури тканин, що містять 1 мл відповідного сироваткового ростового середовища (Таблиця 1). Клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до тих пір, поки клітини не досягали бажаної щільності (приблизно 18-24 години). Ростові середовища відсипали з кожної лунки і заміщали 1) свіжими ростовими середовищами, що не містять токсин (не оброблені клітинні лінії) або 2) свіжими ростовими середовищами, що містять 1 нМ комплекс BoNT/A (оброблені клітинні лінії). Після інкубації протягом ночі клітини промивали шляхом відсмоктування ростових середовищ і промивання кожної лунки 200 мкл 1 x PBS (фізіологічний розчин, забуферений фосфатом). Для збору клітин 1 x PBS відсипали, клітини лізували шляхом додавання 50 мкл 2 x буфера для нанесення з SDS (додецилсульфат натрію), лізат переносили в прозору тестовану пробірку і зразок нагрівали до 95 °C протягом 5 хвилин.

Для виявлення присутності нерозщепленого субстрату SNAP-25 і розщеплених продуктів

SNAP-25, аліквоту з кожного зібраного зразка аналізували шляхом вестерн-блоттингу. У цьому аналізі 12 мкл аліквоту зібраного зразка розділяли за допомогою MOPS електрофорезу в поліакриламідному гелі з використанням NuPAGE® Novex 12 % Bis-Tris заздалегідь залитих поліакриламідних гелів (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) в денатуруючих поновлюючих умовах.

5 Розділені пептиди переносили з гелю на полівініліденфторидні (PVDF) мембрани (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) шляхом вестерн-блоттингу з використанням апарату для напівсухого електрофоретичного перенесення Trans-Blot® SD (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). PVDF мембрани блокували шляхом інкубації при кімнатній температурі протягом 2 годин в розчині, що містить Tris-забуферений, фізіологічний розчин (TBS) (25 мМ 2-аміно-2-гідроксиметил-1,3-пропандіолу сіль гідрохлорид (Tris-HCl)(pH 7,4), 137 мМ хлорид натрію, 2,7 мМ хлорид калію), 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат), 2 % бичачий сироватковий Альбумін (BSA), 5 % нежирне сухе молоко. Блоковані мембрани інкубували при 4 °C протягом 10 ночі в TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат), 2 % BSA і 5 % нежирне сухе молоко, що містить 1) розведення 1:5000 мишачого моноклонального антитіла α -SNAP-25 як первинне антитіло (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD); або 2) 15 розведення 1:5000 кролячої поліклональної антисироватки S9684 α -SNAP-25 як первинне антитіло (Sigma, St. Louis, MO). Як α -SNAP-25 мишачі моноклональні, так і кролячі поліклональні антитіла можуть виявляти нерозщеплений субстрат SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25, даючи можливість для вимірювання загальної експресії SNAP-25 в кожній клітинній лінії і 20 відсоток розщепленого SNAP-25 після обробки BoNT/A як параметр для оцінки величини захоплення BoNT/A. Блоти, зондовані первинним антитілом тричі промивали по 15 хвилин кожен проміжок часу в TBS, TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Відмиті мембрани інкубували при кімнатній температурі протягом 2 годин в TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат), 2 % BSA, і 5 % нежирне сухе молоко, що містить 1) а 25 розведення 1:10000 козиних поліклональних антитіл проти мишачого імуноглобуліну G, важкий і легкий ланцюги (IGG, H+L) антитіла конъюгували з пероксидазою хрину (Zymed, South San Francisco, CA) як вторинне антитіло; або 2) розведення 1:10000 козиних поліклональних антитіл проти кролячого імуноглобуліну G, важкий і легкий ланцюги (IGG, H+L) антитіла конъюгували з пероксидазою хрину (Zymed, South San Francisco, CA) як вторинне антитіло. Блоти, що 30 зондуються вторинним антитілом, промивали тричі по 15 хвилин в TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Сигнал, що виявляється для мічених продуктів SNAP-25, візуалізували з використанням системи виявлення шляхом вестерн-блоттингу ECL Plus™ (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) і мембрану візуалізували і відсоток розщеплювання кількісно визначали з використанням Typhoon 9410 Variable Mode 35 Imager і програми для аналізу зображення (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Вибір розміру пікселя (100-200 пікселів) і установки напруги PMT (350-600, нормально 400) залежали від індивідуального блоту. У Таблиці 2 вказані клітинні лінії, де продукт розщеплювання SNAP-25 виявляли при обробці 1 нМ BoNT/A. Наступні клітинні лінії демонстрували захоплення 1 нМ BoNT/A і відповідне прикріплення до поверхні субстрату: 40 BE(2)-M17, IMR-32, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa і SK-N-BE(2) -C.

Для визначення того, чи здатна клітинна лінія прикріплятися до поверхні, відповідну щільність клітин з початкової культури тестованої клітинної лінії висівали в лунки 24-лункових планшетів для культури тканин, що містять 1 мл відповідних ростових середовищ (Таблиця 1). 45 Клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до тих пір, поки клітини не досягали бажаної щільності (приблизно 18-24 години). Прикріплення клітин вимірювали як відсоток клітин, які прикріплялися до поверхні дна лунки планшета для тканин, щодо загальної кількості засіяних клітин. Клітинні лінії CHP-126, IMR-32, LA-N-1, MC-IXC, NG115-401L, SK-N-BE(2) -C, SK-N-F1 і SK-N-MC не підходили, оскільки кожна клітинна лінія 50 демонструвала менше ніж 50 % прикріплення (Таблиця 2). Всі інші протестовані клітинні лінії продемонстрували відповідні характеристики прикріплення клітин (Таблиця 2).

Таблиця 2

Однодозовий скринінг клітинних ліній-кандидатів з використанням 1 нМ BoNT/A.

Клітинні лінії	Опис	Source	1 нМ BoNT/A Захоплення	Прикріплення
BE(2) -C	Людська нейробластома	ATCC CRL-2268	немає	>60 %
BE(2)-M17	Людська нейробластома	ATCC CRL-2267	так	>60 %
CHP-126	Людська нейробластома	DSMZ ACC 304	немає	<50 %
CHP-212	Людська нейробластома	ATCC CRL-2273	немає	>60 %
HCN-1a	Нейрони кори головного мозку	ATCC CRL-10442	немає	>60 %
HCN-2	Нейрони кори головного мозку	ATCC CRL-10742	немає	>60 %
IMR-32	Людська нейробластома	ATCC CRL-127	так	<50 %
Kelly	Людська нейробластома	ECACC 92110411	так	>60 %
Kelly	Людська нейробластома	DSMZ ACC 355	так	>60 %
LA1-55n	Людська нейробластома	ECACC 06041203	так	>60 %
LA-N-1	Людська нейробластома	ECACC 06041201	α	<25 %
MC-IXC	Людська нейроепітеліома	ATCC CRL-2270	α	<25 %
MHN-NB-11	Людська нейробластома	DSMZ ACC 157	немає	>60 %
N1E-115	Мишача нейробластома	ATCC CCL-2263	так	>60 %
N4TG3	Мишача нейробластома	DSMZ ACC 101	немає	>60 %
N18TG2	Мишача нейробластома	DSMZ ACC 103	немає	>60 %
NB4 1A3	Мишача нейробластома	ECACC 89121405	немає	>60 %
ND3	Мишача нейробластома/початковий неонатальний щурячий гібрид DRG	ECACC 92090901	немає	>60 %
ND7/23	Мишача нейробластома/початковий неонатальний щурячий гібрид DRG	ECACC 92090903	немає	>60 %
ND8	Мишача нейробластома/початковий неонатальний щурячий гібрид DRG	ATCC	немає	>60 %
ND8/34	Мишача нейробластома	ECACC 92090904	немає	>60 %
ND15	Мишача нейробластома/початковий неонатальний щурячий гібрид DRG	ECACC 92090907	немає	>60 %
ND27	Гібрид DRG мишача нейробластома/початкові щурячі	ECACC 92090912	немає	>60 %
NB69	Людська нейробластома	ECACC 99072802	немає	>60 %
NDC	Мишача нейробластома/початковий неонатальний щурячий гібрид DRG	ECACC 92090913	немає	>60 %
Neuro-2a	Мишача нейробластома	ATCC CCL-131	так	>60 %
NG108-15	Мишача нейробластома/ гібридна щуряча гліома	ECACC 88112302	так	>60 %

NG115-401L	Мишача нейробластома/ гібридна щуряча гліома	ECACC 87032003	немає	<50 %
NS20Y	Мишача нейробластома	DSMZ ACC 94	немає	>60 %
PC12	Щуряча феохромоцитома	ATCC CRL-1721	так	>60 %
SH-SY5Y	Людська нейробластома	ATCC CRL-2266	так	>60 %
SiMa	Людська нейробластома	DSMZ ACC 164	так	>60 %
SK-N-BE(2) - C	Людська нейробластома	ATCC CRL-2271	так	<50 %
SK-N-AS	Людська нейробластома	ATCC CRL-2137	немає	>60 %
SK-N-DZ	Людська нейробластома	ATCC CRL-2149	немає	>60 %
SK-N-F1	Людська нейробластома	ATCC CRL-2142	немає	<50 %
SK-N-MC	Людська нейробластома	ATCC HTB-10	α	<25 %
SK-N-SH	Людська нейробластома	ECACC 86012802	немає	>60 %
TE 189.T	Спинний мозок	ATCC CRL-7947	немає	>60 %

Приклад II

Оцінка умов зростання на захоплення нейротоксину в клітинних лініях-кандидатах

У наступному прикладі проілюстроване те, як визначати умови зростання для стійких клітинних ліній, мають максимальну чутливість до BoNT/A інтоксикації або що мають здатність захоплювати BoNT/A.

1. Дія клітинного диференціювання на захоплення нейротоксину клітинними лініями-кандидатами

Для визначення того, чи покращує клітинне диференціювання захоплення нейротоксину, клітинні лінії, що демонструють захоплення 1 нМ BoNT/A, переносили в безсироваткове середовище для індукції диференціювання. Відповідну щільність клітин з початкової культури тестованої клітинної лінії висівали в лунки 24-лункових планшетів для культури тканин, що містять 1 мл безсироваткового середовища, що містить мінімальне необхідне середовище з 2 mM GlutaMAX™ I з солями Ерла, 0,1 mM замінимі амінокислоти, 10 mM HEPES (ХЕПЕС), 1 mM піруват натрію, 100 Е/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Ці клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до диференціювання клітин, що оцінювали за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, таких як припинення зростання і подовження нейриту (приблизно 2-3 діб). Як контроль відповідну щільність клітин з початкової культури тестованої клітинної лінії висівали в лунки 24-лункових планшетів для культури тканин, що містять 1 мл відповідного ростового середовища (Таблиця 1). Ці недиференційовані контрольні клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до тих пір, поки клітини не досягали бажаної щільності (приблизно 18-24 години). Середовища з диференційованих і недиференційованих контрольних клітинних культур відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими середовищами, що містять 0 (не оброблений зразок), 0,1 нМ, 0,3 нМ або 1 нМ комплексу BoNT/A. Після інкубації протягом ночі клітини промивали і збирали, як описано в Прикладі I.

Для виявлення присутності розщеплених продуктів SNAP-25 аліквоту з кожного зібраного зразка аналізували шляхом вестерн-блоттингу, як описано в Прикладі I, за винятком того, що зібрані зразки розділяють за допомогою SDS-PAGE з використанням 12 % 26-лункових гелів Criterion (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), і кролячу сироватку поліклональних антитіл α-SNAP-25197 використовували як первинне антитіло (дивися Приклад IV). Таблиця 3 указує на клітинні лінії, які продемонстрували продукт розщеплювання SNAP-25 при обробці 0,1 нМ BoNT/A. З числа протестованих клітинних ліній тільки клітинні лінії SiMa і Neuro-2a продемонстрували захоплення 0,1 нМ BoNT/A в диференційованому стані. Проте, окрім SiMa і Neuro-2a, всі клітинні лінії N18, LA1-55n, PC12 і SH-SY5Y продемонстрували захоплення 0,1 нМ BoNT/A в диференційованому стані.

Таблиця 3

Дія клітинного диференціювання на захоплення нейротоксину
клітинними лініями-кандидатами

Клітинні лінії	Опис	Джерело	Захоплення 0,1 нМ BoNT/A	
			Не диференційована	Диференційована
BE(2)-M17	Людська нейробластома	ATCC CRL-2267	немає	немає
Kelly	Людська нейробластома	DSMZ ACC 355	немає	немає
LA1-55n	Людська нейробластома	ECACC 06041203	немає	так
N1E-115	Мишача нейробластома	ATCC CCL-2263	немає	Не тестували
N4TG3	Мишача нейробластома	DSMZ ACC 101	немає	Не тестували
N18	Мишача нейробластома/гібрид щурячої глиоми	ECACC 88112301	немає	так
Neuro-2a	Мишача нейробластома	ATCC CCL-131	так	так
NG108-15	Мишача нейробластома/гібрид щурячої глиоми	ECACC 88112302	немає	Не тестували
PC12	Щуряча феохромоцитома	ATCC CRL-1721	немає	так
SH-SY5Y	Людська нейробластома	ATCC CRL-2266	немає	так
SiMa	Людська нейробластома	DSMZ ACC 164	так	так
SK-N-BE(2) C	Людська нейробластома	ATCC CRL-2271	немає	Не тестували

2. Дії обробки гангліозидом на захоплення нейротоксину диференційованими клітинними лініями-кандидатами.

- 5 Для визначення того, чи можуть обробки, поліпшуючі низькоафінне скріплення нейротоксину, поліпшити захоплення нейротоксину, диференційовані клітинні лінії, що демонструють захоплення 1 нМ BoNT/A, обробляли гангліозидом GT1b. Відповідну щільність клітин з початкової культури тестованої клітинної лінії висівали в лунки 24-лункових планшетів для культури тканин, що містять безсироваткове середовище, описане вище, з або без 25 мкг/мл GT1b (Alexis Biochemicals, San Diego, CA). Ці клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до тих пір, поки клітини не диференціювалися, оцінювані за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, як описано вище. Середовища відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими безсироватковими середовищами, що містять 0 (не оброблений зразок), 1,9 пМ, 3,7 пМ, 7,4 пМ, 14,8 пМ, 29,7 пМ, 59,4 пМ, 118,8 пМ, 237,5 пМ, 574 пМ, 950 пМ і 1900 пМ комплексу BoNT/A. Клітинні лінії інкубували протягом двох проміжків часу, що відрізняються: 24 години і 48 годин. Після інкубації з токсином клітини промивали і збирали, як описано в Прикладі I.

- 20 Для виявлення присутності розщеплених продуктів SNAP-25 аліквоту з кожного зібраного зразка аналізували шляхом вестерн-блоттингу, як описано в Прикладі I, за винятком того, що зібрані зразки розділяють за допомогою SDS-PAGE з використанням 12 % 26-лункових гелів Criterion (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), і кролячу сироватку поліклональних антитіл α -SNAP-25197 використовували як первинне антитіло (дивися Приклад IV). Д таблиці 4 показані дії обробки гангліозидами на здатність диференційованих клітинних ліній захоплювати BoNT/A. Ці результати указують на найменшу концентрацію BoNT/A, яка приводить до смуги продукту розщеплювання SNAP-25, що виявляється, на вестерн-блоттингу.

Таблиця 4

Дії обробки гангліозидами на захоплення нейротоксину клітинними лініями-кандидатами.

Клітинна лінія	Опис	Джерело	Захоплення BoNT/A Uptake	
			Інкубація протягом 24 годин	Інкубація протягом 48 годин
BE(2)-M17	Людська нейробластома	ATCC CRL-2267	237,5 пМ	118,8 пМ
Kelly	Людська нейробластома	DSMZ ACC 355	Не тестували	Не тестували
LA1-55n	Людська нейробластома	ECACC 06041203	15 пМ	7,4 пМ
N1E-115	Мишача нейробластома	ATCC CCL-2263	Не тестували	Не тестували
N4TG3	Мишача нейробластома	DSMZ ACC 101	Не тестували	Не тестували
N18	Мишача нейробластома/гібрид щурячої гліоми	ECACC 88112301	14,8 пМ	7,4 пМ
Neuro-2a	Мишача нейробластома	ATCC CCL-131	7,4 пМ	7,4 пМ
NG108-15	Мишача нейробластома/гібрид щурячої гліоми	ECACC 88112302	Не тестували	Не тестували
PC12	Щуряча феохромоцитома	ATCC CRL-1721	7.4 пМ	7.4 пМ
SH-SY5Y	Людська нейробластома	ATCC CRL-2266	Не тестували	Не тестували
SiMa	Людська нейробластома	DSMZ ACC 164	1.9 пМ	1.9 пМ
SK-N-BE(2) -C	Людська нейробластома	ATCC CRL-2271	Не тестували	Не тестували

3. Розробка безсироваткового середовища, що має властивості, сприяючі диференціюванню клітин, яке підсилює захоплення нейротоксину клітинними лініями-кандидатами.

- Для визначення того, чи можуть сприятливі ефекти обробки, що викликають клітинне диференціювання, поліпшити захоплення нейротоксину, клітинні лінії SiMa, Neuro-2a і PC12 вирощували в різних безсироваткових середовищах для індукції диференціювання. Відповідну щільність клітин з початкової культури тестованої клітинної лінії висівали в лунки 24-лункових планшетів для культури тканин, що містять 1 мл різних тестованих безсироваткових середовищ. Тестовані параметри були 1) дія різні базальних середовищ на захоплення BoNT/A (MEM і RPMI 1649); 2) ефект присутності або відсутності нейротрофічних чинників на захоплення BoNT/A (добавка N2 і добавка B27); 3) ефект присутності або відсутності чинників диференціювання на захоплення BoNT/A (ретинова кислота і чинник зростання нервів); і 4) ефект присутності або відсутності сироватки крові на захоплення BoNT/A (безсироваткові середовища і середовища із зменшеним вмістом сироватки крові). Як контроль відповідну щільність клітин з початкової культури тестованої клітинної лінії висівали в лунки 24-лункових планшетів для культури тканин, що містять 1 мл контрольного безсироваткового середовища (мінімальне необхідне середовище, 2 mM GlutaMAX™ I з солями Ерла, 0,1 mM заміними амінокислоти, 10 mM NEPES (ХЕПЕС), 1 mM піруват натрію, 100 Е/мл Пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину). Ці клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до диференціювання клітин, що оцінювали за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, таких як припинення зростання і подовження нейриту (приблизно 2-3 діб). Середовища відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими безсироватковими середовищами, що містять 0 (не

- оброблений зразок), 0,005 пМ, 0,015 пМ, 0,05 пМ, 0,14 пМ, 0,42 пМ, 1,2 пМ, 3,7 пМ, 11 пМ, 33 пМ, 100 пМ і 300 пМ комплексу BoNT/A. Додатково, диференційовані клітини обробляли BoNT/A протягом 24 годин, потім середовища міняли і протягом 48 годин інкубували в свіжих середовищах без токсину для забезпечення накопичення продукту розщеплювання SNAP-25.
- 5 Клітини потім промивали і збирали, як описано в Прикладі I.

Таблиця 5

Безсироваткові середовища, використовувані для диференціювання клітинних ліній

Клітинні лінії	Композиції тестованих безсироваткових середовищ
LA1-55n	мінімальне необхідне середовище з 2 мМ GlutaMAX™ I з солями Ерла, 0,1 мМ замінимі амінокислоти, 10 мМ HEPES (ХЕПЕС), 1х N2 добавка, і 1 х B27 добавка
Neuro-2a	мінімальне необхідне середовище, 2 мМ GlutaMAX™ I з солями Ерла, 1 х B27 добавка, 1 х N2 добавка, 0,1 мМ замінимі амінокислоти, 10 мМ HEPES
PC12	RPMI 1640, 2 мМ GlutaMAX™, 1 х B27 добавка, 1 х N2 добавка, 10 мМ HEPES, 1 мМ піруват натрію, 1 % пеніцилін-стрептоміцин і 50 нг/мл чинник зростання нервів
SiMa	мінімальне необхідне середовище, 2 мМ GlutaMAX™ I з солями Ерла, 1 х B27 добавка, 1 х N2 добавка, 0,1 мМ замінимі амінокислоти, 10 мМ HEPES

- Для виявлення присутності продукту розщеплювання SNAP-25 аліквоту кожного зібраного зразка аналізували шляхом вестерн-блоттингу, як описано в Прикладі I за винятком того, що
- 10 зібрані зразки розділяли за допомогою SDS-PAGE з використанням 12 % 26-лункових гелів Criterion (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) і сироваток кролячих поліклональних антитіл α -SNAP-25 (дивися Приклад IV). Найбільш оптимізовані середовища, визначені для кожної клітинної лінії, представлені в Таблиці 5. Таблиця 6 указує на найменшу виявлену кількість продукту розщеплювання SNAP-25, коли клітинні лінії вирощували в цьому оптимізованому
- 15 безсироватковому середовищі. Застосування оптимізованого безсироваткового середовища приводило в результаті до виявлення сигналів активності BoNT/A з прийнятними стосунками сигналу до шуму в клітинних лініях LA1-55n, Neuro-2a, PC-12 і SiMa (Фіг. 2). Наприклад, оптимізовані умови диференціювання приводили в результаті до 5-кратного збільшення виявлення продукту розщеплювання SNAP-25 в порівнянні з контрольними безсироватковими
- 20 середовищами для клітин Neuro-2a і PC12, і майже в 50 разів для клітин SiMa. Додатково, мінімальне відношення сигналу до шуму 3:1 для нижньої асимптоти і 10:1 для верхньої асимптоти потрібний для розробки робастного аналізу, прийнятного для валідації. За винятком LA-1-55n всі оптимізовані клітинні лінії забезпечували відношення сигналу до шуму для нижньої асимптоти щонайменше 3:1, коли сигнал виявляли з дози 1,2 пМ в порівнянні з фоновим
- 25 сигналом 0 пМ BoNT/A (Фіг. 2). Додатково, всі оптимізовані клітинні лінії забезпечували відношення сигналу до шуму для верхньої асимптоти, щонайменше 100:1, коли сигнал одержували з дози 300 пМ в порівнянні з фоновим сигналом 0 пМ BoNT/A (Фіг. 2). Ці результати свідчать про те, що будь-яка з цих клітинних ліній може бути використана для розвитку імунологічного способу виявлення активності BoNT/A, як розкрито в даному описі, оскільки в
- 30 аналізі виявлялася присутність пМ кількостей BoNT/A.

Таблиця 6

Дії оптимізованих безсироваткових середовищ на захоплення нейротоксину клітинними лініями-кандидатами

Клітинні лінії	Опис	Джерело	Захоплення BoNT/A	
			Контрольні безсироваткові середовища	Оптимізовані безсироваткові середовища
BE(2)-M17	Людська нейробластома	ATCC CRL-2267	Не тестували	Не тестували
Kelly	Людська нейробластома	DSMZ ACC 355	Не тестували	Не тестували
LA1-55n	Людська нейробластома	ECACC 06041203	7,4 пМ	3,7 пМ
N1E-115	Мишача нейробластома	ATCC CCL-2263	Не тестували	Не тестували
N4TG3	Мишача нейробластома	DSMZ ACC 101	Не тестували	Не тестували
N18	Мишача нейробластома/гібридна щуряча гліома	ECACC 88112301	Не тестували	Не тестували
Neuro-2a	Мишача нейробластома	ATCC CCL-131	3,7 пМ	0,8 пМ
NG108-15	Мишача нейробластома/гібридна щуряча гліома	ECACC 88112302	Не тестували	Не тестували
PC12	Щуряча феохромоцитома	ATCC CRL-1721	2,0 пМ	0,42 пМ
SH-SY5Y	Людська нейробластома	ATCC CRL-2266	Не тестували	Не тестували
SiMa	Людська нейробластома	DSMZ ACC 164	0,23 пМ	0,005 пМ
SK-N-BE(2) -C	Людська нейробластома	ATCC CRL-2271	Не тестували	Не тестували

Приклад III

Розробка моноклональних антитіл α -SNAP-25, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, що має вільний С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A

У наступному прикладі проілюстроване те, як одержувати моноклональні антитіла α -SNAP-25, які можуть вибірково зв'язуватися з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A.

1. Утворення моноклональних антитіл α -SNAP-25.

Для розробки моноклональних антитіл α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, пептид з 13 залишків CDSNKTRIDEANQCOOH (SEQ ID NO: 38) розробили як продукт розщеплювання антигену SNAP-25. Цей пептид містить гнучку лінкерну область і N-кінцевий залишок цистеїну для кон'югації з KLH, і амінокислоти 186-197 людського SNAP-25 (SEQ ID NO: 5) з карбоксильованим С-кінцевим глутаміном (SEQ ID NO: 38). Утворення моноклональних антитіл до ретельно відібраних унікальних пептидних послідовностей забезпечує контроль над специфічністю епітопу, даючи можливість для ідентифікації конкретної субпопуляції білка серед близькоспоріднених ізоформ. Пошуки в базі Blast виявили, що цей пептид має високу гомологію тільки з SNAP-25 і майже відсутність

можливої перехресної реактивності з іншими білками в нейрональних клітинах. Послідовність також ретельно досліджували шляхом використання комп'ютерних алгоритмів для визначення індексу гідрофобності, вірогідності білкової поверхні, областей гнучкості і сприятливої вторинної структури після правильної орієнтації і презентації вибраної пептидної послідовності. Пептид синтезували і конъюгували з гемоціанином лімфи равлика (KLH) для збільшення імуногенності. Шість мишей Balb/c імунізували цим пептидом, і після трьох іммобілізацій протягом приблизних восьми тижнів у мишей для тестування відбирали кров. Кров залишали згущуватися шляхом інкубації при 4 °C протягом 60 хвилин. Кров, що згорнулася, центрифугували при 10000 x g при 4 °C протягом 10 хвилин для осадження клітинного дебрису. Зразок сироватки крові диспенсували, що утворюється в результаті, на аліквоти 50 мкл і зберігали при -20 °C до застосування.

Аналогічну стратегію, засновану на інших антигенах SNAP-25, розкриту в даному описі, використовують для розробки моноклональних антитіл α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P₁ продукту розщеплювання SNAP-25 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. Наприклад антиген SNAP-25 з SEQ ID NO: 45 може бути конъюгований з KLH замість антигена SNAP-25 з SEQ ID NO: 38. Як ще один приклад амінокислоти 186-197 людського SNAP-25 з антигена SNAP-25 з SEQ ID NO: 38 можуть бути замінені на SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 або SEQ ID NO: 44.

2. Скринінг наявності моноклональних антитіл α -SNAP-25

Для визначення наявності моноклонального антитіла α -SNAP-25, яке може вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, здійснювали порівняльні ІФА і клітинний аналіз розщеплювання з використанням екстрагованої мишачої сироватки крові. Для порівняльного ІФА два сконструювали два злиті білки: BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ з SEQ ID NO: 48 і BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ з SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ містив природним чином біотинільований пептид BIRA з 16 амінокислот з SEQ ID NO: 50, зв'язаний по N-кінці з пептидом SNAP-25, що містить амінокислоти 134-197 з SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ містив природним чином біотинільований пептид BIRA з 16 амінокислот з SEQ ID NO: 50, зв'язаний по N-кінці з пептидом SNAP-25, що містить амінокислоти 134-206 з SEQ ID NO: 5. Ці два субстрати суспендували в 1 x PBS в концентрації 10 мкг/мл BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ і BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆. BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ і BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ наносили на окремі планшети шляхом додавання приблизно 100 мкл відповідного розчину субстрату і інкубації планшетів при кімнатній температурі протягом однієї години. Промиті планшети інкубували при 37 °C протягом однієї години в 0,5 % BSA в 1 x TBS, що містить 1:10-1:100 розведення сироватки крові, відібраної у однієї з шести імунізованих мишей, що містять антитіло (миша 1, миша 2, миша 3, миша 4, миша 5 і миша 6). Планшети, оброблені первинними антитілами-зондами, промивали чотири рази протягом 5 хвилин кожен проміжок часу 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Промиті планшети інкубували при 37 °C протягом 1 години в 1 x TBS, що містить розведення 1:10000 козиного антитіла (поліклонального IGG), конъюгованого з пероксидазою хрину (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) як вторинне антитіло. Планшети з вторинним антитілом промивали чотири рази в 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Хромогенне виявлення мічених продуктів SNAP-25, візуалізованих шляхом хромогенного виявлення з використанням набору субстрату. Розвиток жовтого фарбування в планшетах, покритих BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇, але не в планшетах, покритих BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆, указувало на те, що антитіло α -SNAP-25 переважно розпізнає продукт розщеплювання SNAP-25₁₉₇. Результати указують на те, що миші, використовувані для імунізації протягом 3-х разів (миша 2, миша 3 і миша 4) мали вищі титри і велику специфічність відносно антигена SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A.

Ці результати підтверджували з використанням аналізу ІФА активності легкого ланцюга. Готували 96-лункові покриті Reacti-Bind Streptavidin планшети (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) шляхом додавання приблизно 100 мкл наступного розчину субстрату: лінії А-С покривали 100 мкл BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ в дванадцяти різних концентраціях; лінії D-H покривали 100 мкл BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ в концентрації 10 мкг/мл. Планшети промивали шляхом відсмоктування розчину субстрату і промивання кожної лунки тричі 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Розведення BoNT/A заздалегідь відновлювали при 37 °C протягом 20 хвилин в буфері для інкубації BoNT/A (50 мМ HEPES, pH 7,4, 1 % фетальна теляча сироватка, 10 мМ ZnCl₂, 10 мМ дитіотриетол), і 100 мкл заздалегідь відновлених BoNT/A додавали в планшети, покриті субстратом, і інкубували при 37 °C протягом

90 хвилин. Планшети, оброблені BoNT/A, промивали шляхом відсмоктування буфера для інкубації BoNT/A і промивання кожного планшета тричі 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксietiлен (20) сорбітанмонолаурат). Промиті планшети інкубували при 37 °C протягом однієї години в 0,5 % BSA в 1 x TBS, що містить 1:10-1:100 розведення тестованої сироватки крові, що містить антитіло. Планшети, оброблені первинним антитілом, промивали чотири рази протягом 5 хвилин кожен проміжок часу 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксietiлен (20) сорбітанмонолаурат). Промиті планшети інкубували при 37 °C протягом 1 години в 1 x TBS, що містить розведення 1:10000 козиного поліклонального антитіла проти мишачого IGG, кон'югованого з пероксидазою хрину (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) як вторинне антитіло. Планшети з вторинним антитілом промивали чотири рази в 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксietiлен (20) сорбітанмонолаурат). Хромогенне виявлення мічених продуктів SNAP-25, візуалізованих шляхом хромогенного виявлення з використанням набору субстрата ImmunoPure TMB (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Розвиток жовтого фарбування, яке корелює з присутністю продукту розщеплювання SNAP-25₁₉₇, що виявляється в зразках, оброблених BoNT/A, але не в оброблених контролях, з використанням сироватки крові, одержаної у всіх шести імунізованих мишей, що містить антитіла (миша 1, миша 2, миша 3, миша 4, миша 5 і миша 6). Таким чином, порівняльні аналізи ELISA указують на те, що з мишей, використовуваних для імунізації, три миші (миша 2, миша 3 і миша 4) мали вищі титри і велику специфічність відносно антигена SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A.

Для клітинного аналізу розщеплювання відповідну щільність клітин PC12 висівали в планшети для культури тканин площею 60 мм², що містять 3 мл відповідного сироваткового середовища (Таблиця 1). Клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до досягнення клітинами відповідної щільності. Готували 500 мкл розчину для перенесення шляхом додавання 250 мкл середовища із зменшеним вмістом сироватки крові OPTI-MEM, що містить 15 мкл ліпофектаміну 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA), що інкубується при кімнатній температурі протягом 5 хвилин, до 250 мкл середовища із зменшеним вмістом сироватки крові OPTI-MEM, що містить 10 мкг експресуючої конструкції pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (SEQ ID NO: 51). Експресуюча конструкція pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC містить експресуючий вектор pQBI-25 (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA), промоторні елементи якого функціонально пов'язані з полінуклеотидом, кодуєчий GFP-легкий ланцюг BoNT/A з SEQ ID NO: 52. Цю суміш для трансфекції інкубували при кімнатній температурі протягом приблизного 20 хвилин. Середовища заміщали свіжими не доповненими середовищами, і 500 мкл розчину для трансфекції додавали до клітин. Клітини потім інкубували при 37 °C в інкубаторі в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю впродовж, приблизно 6-18 годин. Клітини промивали і збирали, як описано в Прикладі II. Для виявлення присутності розщеплюваного продукту SNAP-25₁₉₇ аліквоту з кожного зібраного зразка аналізували шляхом вестерн-блоттингу, як описано в Прикладі II за винятком того, що використовували первинним антитілом було розведення 1:1000 сироватки крові, що містить антитіло, а використовуване вторинне антитіло було 1:20000 мишачої пероксидази хрину миші α-IgG (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Одиначну смугу, відповідну продукту розщеплювання SNAP-25₁₉₇, виявляли в зразках, оброблених BoNT/A, але не в оброблених контролях з використанням сироватки крові, що містить антитіло, що походить з трьох мишей (миша 3 і миша 4). Таким чином, клітинний аналіз розщеплювання указує на те, що з числа мишей, використовуваних для імунізації, три миші (миша 2, миша 3, і миша 4) мали вищі титри і велику специфічність відносно антигена SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A.

3. Одержання гібридом

Для одержання гібридом, що продукують моноклональні антитіла α-SNAP-25, які можуть вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, селезінку Миші 2 відбирали через три доби після остаточної "бустерної" імунізації, і клітини селезінки зливали з клітинами мієломи P3-X63 Ag8.653 з використанням стандартних гібридомних протоколів. Ці клітини висівали в п'ять 96-лункових планшетів і гібриди відбирали з використанням середовища HAT. Протягом 8-14 діб після злиття здійснювали перший скринінг приблизно 480 батьківських клонів з використанням порівняльного ELISA з пептидами BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ і BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆, нанесеними на два окремі планшети. Порівняльна ELISA є швидким способом скринінгу для ідентифікації гібридом, що продукують антитіла, специфічні для розщепленого SNAP-25₁₉₇. Верхні 18 клонів піддавали додатковому скринінгу з використанням описаного вище клітинного аналізу розщеплювання і імунозафарбовування трансфікованих клітин LC/A (Таблиця 7).

Таблиця 7

Аналіз супернатантів, що містять моноклональні антитіла α -SNAP-25

Клон	Порівняльний ІФА				Клітинний аналіз	
	OD SNAP-25 ₁₉₇	OD SNAP-25 ₂₀₆	Ratio197/206	Ratio206/197	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
1D3	1,805	0,225	8,02	0,13	+++	—
1F12	0,365	0,093	3,92	0,25	—	—
1G10	0,590	0,137	4,31	0,23	++	—
1H1	0,335	0,121	2,77	0,36	—	—
1H8	0,310	0,302	1,03	0,97	+	—
2C9	0,139	0,274	0,51	1,97	—	—
2E2	0,892	0,036	24,78	0,04	++	—
2E4	0,228	0,069	3,30	0,30	+	—
2F11	1,095	1,781	0,61	1,63	—	—
3C1	1,268	0,053	23,92	0,04	++	—
3C3	0,809	0,052	15,56	0,06	++	—
3E1	0,086	0,155	0,55	1,80	0	—
3E8	2,048	0,053	38,64	0,03	+++	—
3G2	0,053	0,158	0,34	2,98	—	—
4D1	0,106	0,218	0,49	2,06	—	—
4G6	0,061	0,159	0,38	2,61	—	—
5A5	0,251	0,106	2,37	0,42	+	—
5F11	0,243	0,061	3,98	0,25	—	—

Клони 1D3, 1G10, 2E2, 3C1, 3C3, і 3E8 додатково клонували за допомогою лімітуючого розведення, оскільки кондиціоновані середовища, що продукуються цими клонами містили антитіло α -SNAP-25, що має переважну зв'язуючу специфічність, що має відношення 197/206, щонайменше 4:1 для продукту розщеплювання SNAP-25₁₉₇ щодо нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆, і виявляли продукт розщеплювання SNAP-25₁₉₇ з використанням клітинного аналізу розщеплювання і імунозафарбовування клітин PC12, трансфікованих GFP-LC/A. Аналогічно, клони 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 і 4G6 додатково клонували за допомогою лімітуючого розведення, оскільки кондиціоновані середовища, що продукуються цими клонами, містили антитіло α -SNAP-25, що має переважно зв'язуючу специфічність, що має відношення 206/197, щонайменше 1,5:1 для нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆ щодо продукту розщеплювання SNAP-25₁₉₇, і виявляли нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆ з використанням клітинного аналізу розщеплювання. Ці одержані з однієї клітини клони знов піддавали скринінгу з використанням порівняльного ELISA, клітинного розщеплювання і імунозафарбовування для підтвердження їх аффіності і специфічності, і антитіла ізолювали з використанням стандартних способів. Асцити одержували з клонів 1D3B8 (IGM.k), 1G10A12 (IgG3.k), 2C9B10 (IgG3.k), 2E2A6 (IgG3.k), 2F11B6 (IGM.k), 3C1A5 (IgG2a.k) і 3C3E2 (IgG2a.k). Клон 3E8 припинив продукувати антитіла під час клонування і додатково не міг бути оцінений.

4. Оцінка зв'язуючої специфічності моноклональних антитіл α -SNAP-25

Для оцінки зв'язуючої специфічності моноклонального антитіла α -SNAP-25, яке може вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, асцити з клонів 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5 і 3C3E2 використовували для виявлення продукту розщеплювання SNAP-25 з використанням клітинного аналізу активності, імуноцитохімії і імунопреципітації.

Для клітинного аналізу активності зв'язуючу специфічність визначали шляхом аналізу здатності асцитів, що містять антитіло α -SNAP-25, виявляти нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆ і розщеплений продукт SNAP-25₁₉₇ за допомогою аналізу шляхом вестерн-блоттингу. Відповідну щільність клітин PC12 клітин висівали в планшети для культури тканини діаметром 60 мм², що містять 3 мл відповідного сироваткового середовища, вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до досягнення відповідної щільності клітин, і переносили з розчином для трансфекції, позбавленим експресуючої конструкції pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (нетрансфіковані клітини), або розчином для трансфекції, що містить експресуючу конструкцію pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (трансфіковані клітини), як описано вище. Клітини промивали і збирали, як описано в Прикладі I. Для виявлення присутності нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆ і розщепленого продукту SNAP-25₁₉₇ аліквоту з кожного зібраного зразка

аналізували шляхом вестерн-блоттингу, як описано в Прикладі I за винятком того, що використовуваним первинним антитілом було розведення 1:100 асцитів, що містить моноклональне антитіло α -SNAP-25, а використовуваним вторинним антитілом було розведення 1:20000 α -мишачі IGG, кон'югованих з пероксидазою хрину (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Додатково, тестували три наявні в продажі мишачі моноклональні антитіла α -SNAP-25. Антитіло α -SNAP-25 SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), для якого виробник указує, що воно виявляє нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆ і розщеплений продукт SNAP-25₁₉₇, використовували в розведенні 15000 відповідно до рекомендацій виробника. Антитіло α -SNAP-25 MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), для якого виробник указує, що воно виявляє нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆, і розщеплений продукт SNAP-25₁₉₇ використовували в розведенні 1:100 відповідно до рекомендацій виробника. Антитіло α -SNAP-25 MC-6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), для якого виробник указує, що воно виявляє тільки розщеплений продукт SNAP-25₁₉₇, використовували в розведенні 1:100 відповідно до рекомендацій виробника.

У Таблиці 8 вказані асцити, що містять антитіло α -SNAP-25, які виявляють тільки продукт розщеплювання SNAP-25₁₉₇. Клітинний аналіз розщеплювання указує на те, що асцити, одержані з клонів 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 і 3C3E2, синтезують моноклональне антитіло α -SNAP-25, що має високу зв'язуючу специфічність відносно продукту розщеплювання SNAP-25₁₉₇, що дає можливість для виборчого розпізнавання цього продукту розщеплювання щодо нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆. Наявне в продажі антитіло SMI-81 виявляє нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆, і лише погано розпізнає продукт розщеплювання SNAP-25₁₉₇ (Таблиця 8). Несподівано, наявне в продажі антитіло MC-6050 виявляє тільки нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆, і не розпізнає продукт розщеплювання SNAP-25₁₉₇ (Таблиця 8). Ще більш несподівано, наявне в продажі антитіло MC-6050 тільки виявляє нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆ і не розпізнає продукт розщеплювання SNAP-25₁₉₇, навіть хоча виробник анонсує, що це антитіло вибірково виявляє продукт розщеплювання SNAP-25₁₉₇ (Таблиця 8). Таким чином, цей аналіз указує на те, що тоді як 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 і 3C3E2 демонструють відповідну вибірковість відносно продукту розщеплювання SNAP-25₁₉₇, 1G10A12 і 2F11B6 не демонструють. Додатково, все з наявних в продажі антитіл SMI-81, MC-6050 і MC-6053 не підходять для імунологічних способів, розкритих в даній заявці на винахід, оскільки все не можуть вибірково виявляти продукт розщеплювання SNAP-25₁₉₇.

Для імуноцитохімічного аналізу зв'язуючу специфічність визначали шляхом аналізу здатності асцитів, що містять антитіло α -SNAP-25, виявляти нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆ і розщеплений продукт SNAP-25₁₉₇ шляхом імунозафарбовування. Дивися, наприклад Ester Fernandez-Salas et al., Plasma Membrane Localization Signals in the Light Chain of Botulinum Neurotoxin, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 101(9): 3208-3213 (2004). Відповідну щільність клітин PC12 висівали, вирощували і трансфікували трансфікуючим розчином, що не містить експресуючу конструкцію rQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (нетрансфіковані клітини) або трансфікуючим розчином, що містить експресуючу конструкцію rQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (трансфіковані клітини), як описано вище. Клітини промивали в 1 x PBS і фіксували в 5 мл PAF при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Фіксовані клітини промивали у фізіологічному розчині, забуференому фосфатом, інкубували в 5 мл 0,5 % Triton® X-100 (поліетиленгліколь оксилфенольний ефір) в 1 x PBS, промивали в 1 x PBS і пермеабілізували в 5 мл метанолу при -20 °C протягом шести хвилин. Пермеабілізовані клітини блокували в 5 мл 100 мМ гліцину при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, промивали в 1 x PBS, і блокували в 5 мл 0,5 % BSA в 1 x PBS при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Блоковані клітини промивали в 1 x PBS і інкубували при кімнатній температурі протягом двох годин в 0,5 % BSA в 1 x PBS, що містить розведення 1:10 асцитів з тестованої клітинної лінії клональної гібридами. Оброблені первинним антитілом клітини тричі промивали протягом 5 хвилин кожного разу в 1 x PBS. Промиті клітини інкубували при кімнатній температурі протягом 2 годин в 1 x PBS, що містить розведення 1:200 кози́них поліклональних антитіл проти мишачого імуноглобуліну G, важкого і легкого ланцюгів (IGG, H+L), кон'югованих з ALEXA® FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) як вторинне антитіло. Оброблені вторинним антитілом клітини тричі промивали протягом 5 хвилин кожного разу в 1 x PBS. Промиті клітини готували для мікроскопічного дослідження шляхом занурення в середовища VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Burlingame, CA) і покривали покривним склом. Картини виявленого сигналу одержували за допомогою конфокального мікроскопа Leica з використанням відповідних лазерних налаштувань. У Таблиці 8 вказані асцити, що містять антитіло α -SNAP-25, які специфічно виявляють продукт розщеплювання SNAP-25₁₉₇. Імуноцитохімічний аналіз указує на те, що асцити, продуктовані з клонів 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 і 3C3E2, синтезують моноклональне антитіло α -SNAP-25,

що має високу зв'язуючу специфічність відносно продукту розщеплювання SNAP-25₁₉₇, який дає можливість для переважного розпізнавання цього продукту розщеплювання щодо нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆.

Для аналізу імунопреципітації зв'язуючу специфічність визначали шляхом аналізу здатності білка A (HiTrap™ Protein A HP Columns, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ), очищених моноклональних антитіл α-SNAP-25 осаджувати нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆ і розщеплений продукт SNAP-25₁₉₇. Дивися, наприклад Chapter 8 Storing and Purifying Antibodies, pp. 309-311, Harlow & Lane, вище, 1998a. Відповідну щільність клітин PC12 висівали, вирощували і трансфікували трансфікуючим розчином, що містить експресуючу конструкцію rQBI-25/GFP (контрольні клітини; SEQ ID NO: 53), або трансфікуючим розчином, що містить експресуючу конструкцію rQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (експериментальні клітини), як описано вище. Експресуюча конструкція rQBI-25/GFP містить вектор, що експресується промоторні елементи якого функціонально пов'язані з полінуклеотидом, кодуючим GFP з SEQ ID NO: 54. Після інкубації протягом ночі клітини промивали шляхом відсмоктування ростових середовищ і промивання кожної лунки 200 мкл 1 x PBS. Для збору клітин PBS відсипали, клітини лізують шляхом додавання буфера для імунопреципітації, що лізуює, містить 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGDT, 10 % гліцерин, 1 % Triton® X-100 (поліетиленгліколя октилфенольний ефір) і 1 x коктейль інгібіторів протеаз COMPLETE™ (Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN) і інкубації при 4 °C протягом однієї години. Лізуюванні клітини центрифугували при 3000 x g при 4 °C протягом 10 хвилин для видалення клітинного дебрису, і супернатант переносили в прозору пробірку і розбавляли до концентрації білка приблизно 1 мг/мл. Приблизно 5 мкг очищеного моноклонального антитіла додавали до 0,5 мл розведеного супернатанту і інкубували при 4 °C протягом двох годин. Після інкубації з первинним антитілом до розведеного супернатанту додавали приблизно 50 мкл іммобілізованого білка G (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) і інкубували при 4 °C протягом однієї години. Інкубований супернатант тричі промивали протягом 30 хвилин кожного разу шляхом додавання 0,5 мл лізуючого буфера для імунопреципітації, центрифугування при 300 x g при 4 °C протягом однієї хвилини для осадження іммобілізованого білка G, і відбору супернатанту. Після промивання осідань ресуспендували в 30 мкл 1 x буфера для нанесення з SDS, і зразок нагрівали до 95 °C протягом 5 хвилин. Для виявлення присутності нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆ і продукту розщеплювання SNAP-25₁₉₇ аліквоту з кожного зібраного зразка аналізували шляхом вестерн-блоттингу, як описано в Прикладі I, за винятком того, що використовуваним початковим нтитілом було розведення 1:1000 сироваток поліклонального антитіла α-SNAP-25 (дивися Приклад IV), а вторинним використовуваним антитілом було розведення 1:20000 кролячого α-IgG з пероксидазою хрину (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). У Таблиці 8 вказані асцити, що містять антитіло α-SNAP-25, які специфічно осаджують продукт розщеплювання SNAP-25₁₉₇ в аналізі шляхом імунопреципітації. Аналіз шляхом імунопреципітації свідчив про те, що асцити, продукуювані з клонів 2E2A6 і 3C1A5, синтезували моноклональне антитіло α-SNAP-25, що має високу зв'язуючу специфічність відносно продукту розщеплювання SNAP-25₁₉₇, що дає можливість для переважного розпізнавання цього продукту розщеплювання щодо нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆.

Таблиця 8

Аналіз асцитів клонів, що містять моноклональні антитіла α-SNAP-25

Клон	Клітинний аналіз		Імуноцитохімії		Імунопреципітація	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
1D3B8	++	—	++	-	Не тестували	Не тестували
1G10A12	++	++	Не тестували	Не тестували	Не тестували	Не тестували
2C9B10	++	—	++	-	Не тестували	Не тестували
2E2A6	++	—	++	-	++	—
2F11B6	+	+	+	+	Не тестували	Не тестували
3C1A5	++	—	++	—	++	—
3C3E2	+	—	Не тестували	Не тестували	Не тестували	Не тестували
MC-6050	—	+	Не тестували	Не тестували	Не тестували	Не тестували
MC-6053	—	+	Не тестували	Не тестували	Не тестували	Не тестували
SMI-81	-/+	++	Не тестували	Не тестували	Не тестували	Не тестували

5. Оцінка афінності скріплення моноклональних антитіл α-SNAP-25

Для визначення афінності скріплення моноклонального антитіла α -SNAP-25, що демонструє високу зв'язуючу специфічність відносно продукту розщеплювання SNAP-25₁₉₇ або нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆, здійснювали аналізи афінності скріплення на приладі BIAcore 3000 з використанням карбоксиметилдекстранових (CM5) сенсорних чіпів (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Аналізи проводили при 25 °C з буфером HBS-EP, що містить 10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM хлорид натрію, 3 mM EDTA, 0,005 % (о./об.) поверхнево-активна речовина P20 при швидкості потоку 10 мкл/хв. Пептиди SNAP-25, що містять амінокислоти 134-197 SEQ ID NO: 5 (SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇) або амінокислоти 134-206 SEQ ID NO: 5 (SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆), ковалентно приєднували до поверхні сенсорних чіпів CM5 з використанням стандартного амінопоеднання. Коротко, чіпи CM5 активували шляхом інжекції протягом 7 хвилин суміші 0,2 M 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодийміду і 0,05 M N-гідроксисукциніміда; пептиди SNAP-25 потім інжектировали в 10 mM ацетаті натрію (pH 4,0) протягом 20 хв при швидкості потоку 10 мкл/хв; і сукцимідні ефіри, що не прореагували, блокували за допомогою 7 хвилинної інжекції 1M етаноламінгідрохлориду, pH 8,5. Імобілізованна на чіпі кількість SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ або SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ виражається у вигляді 100-150 кратного збільшення одиниць відповіді (приблизно 0,10-0,15 нг/мм²). Зразки антитіла, що містять асцити або очищені моноклональні антитіла, продукуювані з клонів 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 і 3C3E2, а також, наявне в продажі антитіло α -SNAP-25 пропускали через поверхню чіпів CM5, даючи можливість для досягнення часу асоціації 10 хв і часу дисоціації 20 хв. Поверхні регенерували між аналізами шляхом інжекції протягом 1 хвилини 10 mM гліцин-HCl (pH 2,5) при швидкості потоку 15 мкл/хв. Криві сенсограм підганяли до моделі 1:1 кінетичного скріплення за допомогою програмного забезпечення BIAevaluation 3.0.

Результати свідчать про те, що 2E2A6 і 3C1A5 високоспецифічні відносно розщепленого продукту SNAP-25₁₉₇ в порівнянні з нерозщепленим субстратом SNAP-25 (Таблиця 9). При порівнянні афінностей скріплення для MC-6050 і MC-6053, 1D3B6 мало приблизно в 10 разів вищу рівноважну константну дисоціацію для продукту розщеплювання SNAP-25 щодо цих наявних в продажі антитіл (Таблиця 9). Цікаво те, що 2E2A6 мало лише злегка меншу рівноважну константу дисоціації відносно продукту розщеплювання SNAP-25 щодо цих наявних в продажі антитіл (0,405 нМ в порівнянні з 0,497 і 0,508) (Таблиця 9). Оскільки жодне з цих наявних в продажі антитіл α -SNAP-25 вибірково не розпізнавало продукт розщеплювання SNAP-25 (Таблиця 8), то рівноважна константа дисоціації менше ніж приблизно 0,5 нМ, частково, є критичною для досягнення такої вибіркової. Аналогічно, при порівнянні з афінностями скріплення MC-6050 і MC-6053, 2E2A6 мало приблизно щонайменше одноразово меншу швидкість дисоціації/константою дисоціації ($6,74 \times 10^{-5}$ в порівнянні з $8,82 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ і $1,18 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$) (Таблиця 9). Останнє додатково свідчить про те, що швидкість дисоціації/константа дисоціації менша ніж, приблизно $8,82 \times 10^{-4}$, частково, є критичною для досягнення виборчого скріплення продукту розщеплювання SNAP-25. Цей результат узгоджується з 1D3B8, який має швидкість дисоціації/константу дисоціації $5,78 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ (Таблиця 9).

Таблиця 9

Аналіз афінності скріплення моноклональних антитіл α -SNAP-25

Параметр SPR	1D3B8		2E2A6*	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^a	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^b
Ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	$1,06 \times 10^6$	—	$1,70 \times 10^6$ ($1,66 \times 10^5$)	— (—)
Kd (c ⁻¹)	$5,78 \times 10^{-5}$	—	$1,53 \times 10^{-4}$ ($6,74 \times 10^{-5}$)	— (—)
KD (нМ)	0,050	—	0,090 (0,405)	— (—)
Параметр SPR	3C1A5		2C9B10	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^c	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^d
Ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	$2,17 \times 10^5$	—	$1,15 \times 10^4$	—
Kd (c-1)	$2,88 \times 10^{-4}$	—	$3,11 \times 10^{-4}$	—
KD (нМ)	1,33	—	27,1	—
SPR Параметр	MC-6050		MC-6053	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
Ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	$1,78 \times 10^6$	$3,06 \times 10^2$	$2,32 \times 10^6$	$1,06 \times 10^2$

Kd (c ⁻¹)	$8,82 \times 10^{-4}$	$6,07 \times 10^{-3}$	$1,18 \times 10^{-3}$	$2,56 \times 10^{-5}$
KD (нМ)	0,497	19,800	0,508	240

* Два незалежні аналізи проводили для цього антитіла з двома різними чіпами.

a - виявлена відсутність скріплення при пропусканні 125 нМ моноклонального антитіла α -SNAP-25 1D3B8 через поверхню сенсорного чіпа CM5 після 10 хвилинної асоціації.

b - виявлена відсутність скріплення при пропусканні до 10 мкМ моноклонального антитіла α -SNAP-25 2E2A6 через поверхню сенсорного чіпа CM5 після 10 хвилинної асоціації.

c - виявлена відсутність скріплення при пропусканні до 100 нМ моноклонального антитіла α -SNAP-25 3C1A5 через поверхню сенсорного чіпа CM5 після 10 хвилинної асоціації

d - виявлена відсутність скріплення при пропусканні до 100 нМ моноклонального антитіла α -SNAP-25 2C9B10 через поверхню сенсорного чіпа CM5 після 10 хвилинної асоціації

6. Секвенування епітопа з виділених моноклональних антитіл α -SNAP-25.

Для визначення епітопа з виділеного моноклонального антитіла α -SNAP-25, яке може вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, молекулу полінуклеотиду, кодуєчу варіабільний важкий (VH) і варіабільний легкий (VL) ланцюг моноклонального антитіла α -SNAP-25, продукованого гібридомами 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 і 3C3E2, секвенували. Екстрагували мРНК і очищали з кожної гібридоми з використанням стандартних протоколів і зворотної транскрипції кДНК з використанням оліго dT антисмислового праймера або генспецифічного (мишачий IgG1 СН і каппа CL) антисмислового праймера. Специфічні праймери мишачого і людського константного домена використовували для ампліфікації кДНК за допомогою PCR (полімеразної ланцюгової реакції) після продукції кДНК для визначення ізо типу антитіла. Вироджені праймери VH і VL використовували для ампліфікації варіабільних доменів з кДНК. Для 5'RACE, гомополімерну dCTP хвостову послідовність додавали до 3' кінця кДНК. Важкий і легкий ланцюги потім ампліфікували з оліго dG смисловим праймером і генспецифічним (CH/KC) антисмисловим праймером. Продукти PCR включали сигнальну пептидну послідовність, варіабільні домени і константні домени до антисмислового праймера. Продукти PCR очищали на гелі для видалення невеликих фрагментів, і клонували у векторі з тупими кінцями або векторі ТА для секвенування. П'ять незалежних клонів для кожного ланцюга секвенували, і визначали збіги для VH і VL ланцюгів і консенсусні послідовності (Таблиця 10). Способи, використовувані для визначення амінокислотних послідовностей VH і VL, описані, наприклад в Roger A. Sabbadini, et al., Novel Bioactive Lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same, U.S. Patent Publication 2007/0281320; and Peter Amersdorfer, et al., Molecular Characterization of Murine Humoral Immune Response to Botulinum Neurotoxin Type A Binding Domain as Assessed by Using Phage Antibody Libraries, 65(9) Infect. Immun. 3743-3752, кожна з яких включена тут шляхом посилання. Додатково, існують комерційні сервіси для секвенування варіабільним важким (VH) і варіабільним легким (VL) ланцюгом антитіла і ідентифікації областей CDR, дивися, наприклад Fusion Antibodies Ltd., Northern Ireland.

Полінуклеотидна послідовність, VH, що містить, і VL ланцюг моноклонального антитіла α -SNAP-25, продукованого гібридомами, розкритими в даному описі, є наступною: 1D3B8 VH (SEQ ID NO: 71), 2C9B10 VH (SEQ ID NO: 73), 2E2A6 VH (SEQ ID NO: 75), 3C1A5 VH варіант 1 (SEQ ID NO: 77), 3C1A5 VH варіант 2 (SEQ ID NO: 79), 3C3E2 VH (SEQ ID NO: 81); 1D3B8 VL (SEQ ID NO: 83), 2C9B10 VL (SEQ ID NO: 85), 2E2A6 VL (SEQ ID NO: 87), 3C1A5 VL (SEQ ID NO: 89), і 3C3E2 VL (SEQ ID NO: 91). Амінокислотна послідовність, VH, що містить, і VL ланцюг моноклонального антитіла α -SNAP-25, продукованого гібридомами, розкритими в даному описі, є наступною: 1D3B8 VH (SEQ ID NO: 72), 2C9B10 VH (SEQ ID NO: 74), 2E2A6 VH (SEQ ID NO: 76), 3C1A5 VH варіант 1 (SEQ ID NO: 78), 3C1A5 VH варіант 2 (SEQ ID NO: 80), 3C3E2 VH (SEQ ID NO: 82); 1D3B8 VL (SEQ ID NO: 84), 2C9B10 VL (SEQ ID NO: 86), 2E2A6 VL (SEQ ID NO: 88), 3C1A5 VL (SEQ ID NO: 90) і 3C3E2 VL (SEQ ID NO: 92). Амінокислотні послідовності, VH, що містять, і VL CDR домени моноклонального антитіла α -SNAP-25, продукованого гібридомами 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 і 3C3E2 приведені в Таблиці 10.

Таблиця 10

Послідовності CDR доменів VH і VL моноклональних антитіл α -SNAP-25

CDR	Послідовність	Ідентифікована в	SEQ ID NO:
VH CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5 варіант 2	93
VH CDR 1	TFTNYVIH	3C1A5 варіант 1 3C3E2	94
VH CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95
VH CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
VH CDR 2	YLFPNGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5 варіант 2	97
VH CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C1A5 варіант 1 3C3E2	98
VH CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
VH CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5 варіант 2	100
VH CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
VH CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C1A5 варіант 1 3C3E2	102
VL CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
VL CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
VL CDR 1	RASKSVSTSGYSYMH	2E2A6	105
VL CDR 1	KASQDIKSYLS	3C1A5	106
VL CDR 1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
VL CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
VL CDR 2	NAKSLAE	2C9B10	109
VL CDR 2	LVSNNLES	2E2A6	110
VL CDR 2	YATSLAD	3C1A5	111
VL CDR 2	YASQSIG	3C3E2	112
VL CDR 3	FQGSHVPPT	1D3B8	113
VL CDR 3	QHGYGTPYT	2C9B10	114
VL CDR 3	QHIRELTRS	2E2A6	115
VL CDR 3	LQHGESPFT	3C1A5	116
VL CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

5 Приклади амінокислотних послідовностей, що не обмежують об'єм винаходу, що містять варіанти VH CDR домена моноклонального антитіла α -SNAP-25, продукowanego гібридомами, розкритими в даному описі, включають VH CDR1 варіант SEQ ID NO: 118 для 1D3B8; VH CDR1 варіант SEQ ID NO: 119 для 2C9B10, 2E2A6 і 3C1A5 VH варіант 2; VH CDR1 варіант SEQ ID NO: 120 для 3C1A5 VH варіант 1 і 3C3E2; VH CDR2 варіант SEQ ID NO: 121 для 1D3B8 і 2E2A6; VH CDR2 варіант SEQ ID NO: 122 для 2C9B10 і 3C1A5 VH варіант 2; VH CDR2 варіант SEQ ID NO: 123 для 3C1A5 VH варіант 1, і 3C3E2; VH CDR3 варіант MDY для 1D3B8 і 2C9B10; VH CDR3 варіант MGY для 2E2A6 і 3C1A5 VH варіант 2; і VH CDR3 варіант SEQ ID NO: 124 для 3C1A5 VH варіант 1 і 3C3E2.

10 Приклади амінокислотних послідовностей, що не обмежують об'єм винаходу, що містять варіанти VL CDR домена моноклонального антитіла α -SNAP-25, продукowanego гібридомами, розкритими в даному описі, включають VL CDR1 варіант SEQ ID NO: 125 для 1D3B8; VL CDR1 варіант SEQ ID NO: 126 для 2C9B10; VL CDR1 варіант SEQ ID NO: 127 для

2E2A6; VL CDR1 варіант SEQ ID NO: 128 для 3C1A5; VL CDR1 варіант SEQ ID NO: 129 для 3C3E2; VL CDR2 варіант KVS для 1D3B8; VL CDR2 варіант NAK для 2C9B10; VL CDR2 варіант LVS для 2E2A6; VL CDR2 варіант YAT для 3C1A5; і VL CDR2 варіант YAS для 3C3E2.

Приклад IV

Розробка поліклональних антитіл α -SNAP-25, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, що має вільний С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A

У наступному прикладі проілюстроване те, як одержують поліклональне антитіло α -SNAP-25, яке може вибірково зв'язуватися з епітопом SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A.

Для розробки поліклональних антитіл α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25 конструювали пептид з 10 залишків CGGGRIDEANQ (SEQ ID NO: 46) як продукт розщеплювання антигена SNAP-25. Цей пептид містить N-кінцевий залишок цистеїну для кон'югації з KLH, гнучку G-связку (GGG), пов'язану з амінокислотами 191-197 людського SNAP-25 (SEQ ID NO: 5), і має карбоксильований С-кінцевий глутамін. Пошук в базі даних Blast виявив, що цей пептид має високу гомологію тільки з SNAP-25 і майже ніякої можливої перехресної реактивності з іншими білками в нейрональних клітинах. Послідовність також ретельно досліджували шляхом використання комп'ютерних алгоритмів для визначення індексу гідрофобності, вірогідності білкової поверхні, областей гнучкості і відповідної вторинної структури після правильної орієнтації і презентації вибраної пептидної послідовності. Пептид синтезували і кон'югували з гемоціаніном лімфи равлика (KLH) для збільшення імуногенності. Перед імунізацією тваринних нативних кроликів спочатку піддавали скринінгу проти клітинних лізатів клітинних ліній-кандидатів у вестерн-блоттингу для ідентифікації тварин, які не мали імунореактивності відносно білків, представлених в клітинних лізату. Два заздалегідь підданих скринінгу кролика імунізували цим пептидом, і після трьох іммобілізацій протягом приблизних восьми тижнів у кроликів для тестування відбирали кров. Кров залишали згущуватися інкубуючи при 4 °C протягом 60 хвилин. Кров, що згорнулася, центрифугували при 10000 x g при 4 °C протягом 10 хвилин для осадження клітинного дебрису. Зразок сироватки крові, що утворюється в результаті диспенсували, на аліквоти 50 мкл і зберігали при -20 °C до застосування.

Аналогічну стратегію, засновану на інших антигенах SNAP-25, розкритих в даному описі, використовують для розробки поліклональних антитіл α -SNAP-25, які зв'язуються з епітопом, що містить С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25. Наприклад, антиген SNAP-25 в SEQ ID NO: 47 може бути кон'югований з KLH замість антигену SNAP-25 в SEQ ID NO: 46. Як ще один приклад амінокислоти 191-197 людського SNAP-25 з антигену SNAP-25 °F SEQ ID NO: 38 можуть бути замінені на SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147 або SEQ ID NO: 148.

2. Скринінг присутності поліклональних антитіл α -SNAP-25

Для визначення присутності поліклональних антитіл α -SNAP-25, які можуть вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, порівняльні ІФА і клітинний аналіз розщеплювання здійснювали з використанням екстрагованої кролячої сироватки крові, як описано в Прикладі III. Сироватка крові обох кроликів містила поліклональні антитіла α -SNAP-25, які можуть вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A. α -SNAP-25 розроблений як NTP 22 і NTP 23.

3. Очищення поліклональних антитіл α -SNAP-25.

Для очищення поліклональних антитіл α -SNAP-25, які можуть вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, антитіла NTP 22 і NTP 23 з сироватки крові кроликів очищали з використанням афінних колонок, що містять антиген SNAP-25 з SEQ ID NO: 46.

4. Оцінка зв'язуючої специфічності поліклональних антитіл α -SNAP-25

Для оцінки зв'язуючої специфічності поліклональних антитіл α -SNAP-25, які можуть вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, що має С-кінець на залишку P_1 розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, очищені поліклональні антитіла α -SNAP-25 NTP 22 і NTP 23 використовували для виявлення продукту розщеплювання з використанням клітинного аналізу активності, імуноцитохімії і імунопреципітації, як описано в Прикладі III. Все з клітинного аналізу розщеплювання, аналіз імуноцитохімії і аналіз шляхом імунопреципітації указували на те, що поліклональні антитіла α -SNAP-25 NTP 22 і NTP 23 не демонстрували перехресну реакцію з нерозщепленим SNAP-25. Таким чином, NTP 22 і NTP 23 мають високу

зв'язуючою специфічністю відносно продукту розщеплювання SNAP-25₁₉₇, яка дає можливість для переважного розпізнавання цього продукту розщеплювання щодо нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆. Аффінність для антигенів може бути визначена з використанням SPR в BiAcore, як описано в Прикладі III.

5 Приклад V

Підготовка компонентів і умов для сендвіч ІФА

У наступному прикладі проілюстроване те, як ідентифікувати і готувати компоненти і умови, необхідні для здійснення сендвіч ІФА, корисного для здійснення імунологічних способів виявлення активності BoNT/A шляхом виявлення продукту розщеплювання SNAP-25 з використанням моноклонального антитіла α -SNAP-25, специфічного відносно SNAP-25, що має С-кінець на залишку Р₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A.

1. Приготування клітинних лізатів з клітин, оброблених BoNT/A.

Для одержання обробленого BoNT/A клітинного лізату для аналізу відповідну щільність клітин з початкової культури Neuro-2a висівали в колбу Т175, що містить 50 мл безсироваткового середовища, що містить мінімальне необхідне середовище, 2 mM GlutaMAX™ I з солями Ерла, 1 x B27 добавку, 1 x N2 добавку, 0,1 mM замінимі амінокислоти, 10 mM HEPES (ХЕПЕС). Ці клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до диференціювання, що оцінювали за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, таких як припинення зростання і подовження нейриту (приблизно 2-3 діб). Як контроль відповідну щільність клітин з початкової культури Neuro-2a висівали в колбу Т175, що містить 50 мл відповідного ростового середовища (Таблиця 1). Ці недиференційовані контрольні клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до досягнення 50 % конфлюентності (приблизно 18 годин). Середовища з диференційованих і недиференційованих контрольних культур відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими середовищами, що містять 0 (не оброблений зразок) або 10 нМ комплексу BoNT/A. Після інкубації протягом ночі клітини промивали і збирали шляхом лізису в свіжоприготованому буфері Triton X-100 (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100), що лізировав, при 4 °C протягом 30 хвилин при постійному струшуванні. Лізировавши клітини центрифугували при 4000 об./хв протягом 20 хв при 4 °C для видалення дебрису з використанням настільної центрифуги. Концентрації білка в клітинних лізатах вимірювали з використанням аналізу по Бредфорду.

2. Приготування і ідентифікація компонентів сендвіч ELISA.

Для ідентифікації відповідної пари захоплююче антитіло, що знаходить антитіло проводили ECL сендвіч ELISA на двадцяти шести різних комбінаціях пар захоплюючого і виявляючого антитіла, що містять одинадцять різних захоплюючих антитіл α -SNAP-25 і сім різних виявляючих антитіл α -SNAP-25 (Таблиця 12). Використовувані антитіла α -SNAP-25 були мишачими моноклональними антитілами α -SNAP-25 2E2A6 і 3C1A5, розкриті в даному описі, мишачі моноклональні антитіла α -SNAP-25 SMI-81, MC-6050 і MC-6053, розкриті в даному описі, кролячі поліклональні антитіла α -SNAP-25 NTP 23, розкриті в даному описі, кролячі поліклональні антитіла α -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO), кролячі поліклональні антитіла α -SNAP-25 H-50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), козині поліклональні антитіла α -SNAP-25 C-18 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), козині поліклональні антитіла α -SNAP-25 N-19 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) і мишачі поліклональні антитіла α -SNAP-25 SP12 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

Для приготування розчину захоплюючого антитіла моноклональні антитіла α -SNAP-25, що містяться в асцитах гібридом клітинних ліній 2E2A6 і 3C1A5, а також моноклональні антитіла α -SNAP-25 MC-6050 і MC-6053, очищали з використанням стандартного протоколу очищення з білком А. Всі інші антитіла α -SNAP-25 були придбані у вигляді очищених антитіл.

Для приготування розчину виявляючих антитіл відповідне антитіло α -SNAP-25 кон'югували з реагентом, що містить, рутеній(II) -трис-біпіридин-(4-метилсульфонатним) NHS складним ефіром (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) відповідно до вказівок виробника (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Реакцію кон'югації здійснювали шляхом додавання 30 мкл розведеного у дистильованій воді MSD SULFO-TAG™, концентрованого розчину до 200 мкл 2 мг/мл поліклональних антитіл α -SNAP-25 і інкубації реакційної суміші при кімнатній температурі протягом 2 годин в темноті. Мічені антитіла очищали з використанням стандартного протоколу очищення на центрифужних колонках і концентрацію білка визначали з використанням стандартного колориметричного білкового аналізу. Абсорбцію кон'югату антитіло α -SNAP-25/MSD SULFO-TAG™ вимірювали при 455 нм з використанням спектрофотометра для визначення концентрації в моль на літр. Розчин виявляючого антитіла зберігали при 4 °C до застосування.

Для приготування твердофазного носія, що містить захоплююче антитіло, яке є

специфічним відносно продукту розщеплювання SNAP-25, приблизно 5 мкл відповідного розчину моноклонального антитіла α -SNAP-25 (20 мкг/мл в 1 х PBS) додають в кожну лунку 96-лункового планшета MSD High Bind, і розчин залишали для сушки на повітрі в кабінеті біологічної безпеки на 2-3 години для випаровування розчину. Лунки, з якими пов'язано захоплює антитіло, потім блокували шляхом додавання 150 мкл блокуючого буфера, що містить 2 % блокуючий реагент Amersham (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) і 10 % козину сироватку крові (VWR, West Chester, PA) при кімнатній температурі протягом 2 годин. Блоковані планшети закривали і зберігали при 4 °C до застосування.

Для виявлення присутності розщепленого продукту розщеплювання SNAP-25 за допомогою аналізу шляхом ECL сендвіч ІФА блокуючий буфер з планшетів відсипали з лунок, в кожну лунку додавали по 25 мкл лізату клітин, оброблених BoNT/A, як описано вище, і планшети інкубували при 4 °C протягом ночі. Лунки планшетів тричі промивали шляхом відсмоктування клітинного лізату і промивання кожної лунки 200 мкл 1 х PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 25 мкл 5 мкг/мл розчину виявляючого антитіла, що містить 2 % блокуючий реагент Amersham в 1 х PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат) додавали в кожну лунку, планшет закривали, і закритий планшет інкубували при кімнатній температурі при протягом 1 години із струшуванням. Після проведення інкубації антитіла лунки тричі промивали 200 мкл 1 х PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 150 мкл 1 х буфера для прочитування (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) додавали в кожну лунку і планшети прочитували з використанням рідера SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Відношення розраховували шляхом ділення сигналу, одержаного в дозі 10 нМ для кожної пари антитіл на сигнал, одержаний в дозі 0 нМ для кожної пари антитіл (Таблиця 12). Ці результати указують на те, що з двадцяти шести різних комбінацій тестованих пар антитіл, тільки три пари антитіл мали відношення сигналу до шуму вище 10:1 для тестування вищої дози: Пара № 1 (2E2A6 мишаче mAb і S9684 кроляче pAb), Пара № 4 (3C1A5 мишаче mAb і S9684 кроляче pAb), і Пара № 18 (S9684 кроляче pAb і 2E2A6 мишаче mAb). Пара антитіл № 1 вибрана для додаткового поліпшення аналізу.

Таблиця 12

Скринінг антитіла α -SNAP-25 Combinations

Пара антитіл №	Захоплює антитіло	Виявляє антитіло	Виявлення продукту розщеплювання SNAP-25	Виявлення нерозщепленого субстрата SNAP-25	Відношення сигнал/шум (10 нМ/0 нМ)
1	2E2A6 мишаче mAb	S9684 кроляче pAb	так	немає	26,6:1
2	2E2A6 мишаче mAb	N-19 goat pAb	так	немає	7,3:1
3	2E2A6 мишаче mAb	H-50 кроляче pAb	так	немає	0,9:1
4	3C1A5 мишаче mAb	S9684 кроляче pAb	так	немає	12,1:1
5	3C1A5 мишаче mAb	N-19 козине pAb	так	немає	1,9:1
6	3C1A5 мишаче mAb	H-50 кроляче pAb	так	немає	0,9:1
7	C-18 козине pAb	S9684 кроляче pAb	немає	немає	0,8:1
8	C-18 козине pAb	N-19 козине pAb	немає	немає	0,9:1
9	C-18 козине pAb	H-50 кроляче pAb	немає	немає	0,9:1
10	H-50 кроляче pAb	2E2A6 мишаче mAb	так	немає	0,9:1
11	H-50 кроляче pAb	C-18 козине pAb	немає	немає	1,0:1
12	N-19 козине pAb	2E2A6 мишаче mAb	так	немає	0,9:1
13	N-19 козине pAb	C-18 козине pAb	немає	немає	1,1:1
14	NTP 23 кроляче pAb	N-19 козине pAb	так	немає	1,2:1
15	NTP 23 кроляче	C-18 козине pAb	немає	немає	1,1:1

	pAb				
16	NTP 23 кроляче pAb	SP12 мишаче pAb	так	немає	1,3:1
17	NTP 23 кроляче pAb	H-50 кроляче pAb	так	немає	1,1:1
18	S9684 кроляче pAb	2E2A6 мишаче mAb	так	немає	21,3:1
19	S9684 кроляче pAb	C-18 козине pAb	немає	немає	0,7:1
20	S9684 кроляче pAb	SMI-81мишиное mAb	так	так	1,2:1
21	SMI-81 мишаче mAb	S9684 кроляче pAb	так	так	1,1:1
22	SMI-81 мишаче mAb	N-19 козине pAb	так	так	1,0:1
23	SMI-81 мишаче mAb	C-18 козине pAb	немає	немає	0,8:1
24	SP12 мишаче pAb	C-18 козине pAb	немає	немає	1,0:1
25	MC-6050 мишаче mAb	S9684 кроляче pAb	так	так	5,0:1
26	MC-6053 мишаче mAb	S9684 кроляче pAb	так	так	7,1:1

3. Оптимізація умов клітинного диференціювання

Для визначення оптимальних умов диференціювання для клітинних ліній, що містять клітини, чутливі до інтоксикації BoNT/A, при використанні сендвіч ІФА тестували систему виявлення, різних середовищ для культури клітин і тривалість часу диференціювання.

Для визначення оптимального середовища для диференціювання відповідну щільність клітин з клітинної лінії SiMa висівали в лунки покритих колагеном IV 24-лункових планшетів для культури клітин, що містять 1 мл однієї з наступної середи і добавок для диференціювання: 1) RPMI 1640, 10 % фетальна теляча сироватка, 1 % Пеніцилін-стрептоміцин, 2 мМ L-глутамін, і 25 мкг/мл GT1b; 2) RPMI-1640, 1 x B27 добавка, 1 x N2 добавка і 25 мкг/мл GT1b; 3) мінімальне необхідне середовище, 1 x B27 добавка, 1 x N2 добавка і 25 мкг/мл GT1b; і 4) RPMI-1640, 10 % БСА, 1 x N2 добавка, 1 x NGF добавка і 25 мкг/мл GT1b. Клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до диференціювання клітин, що оцінювали за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, таких як припинення зростання і подовження нейриту (приблизно 3 діб). Середовища відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими середовищами, що містять 0 (не оброблений зразок), 0,2 пМ, 2 пМ або 20 пМ комплексу BoNT/A. Після обробки протягом ночі клітини промивали, інкубували протягом ще двох діб без токсину для того, щоб дати можливість для розщеплювання субстрату SNAP-25, і збирали, як описано вище, в Розділі 1. Концентрації белків в клітинних лізату вимірювали за допомогою аналізу по Бредфорду. Виявлення присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою ECL сендвіч ІФА здійснювали, як описано вище з використанням пари антитіл №1. Як обговорювалося в Прикладі I, недиференційовані клітини не захоплюють токсин сіль же ефективно, як диференційовані клітини. Найбільш ефектне середовище для диференціювання, що збільшує захоплення BoNT/A і отже розщеплювання SNAP-25, є середовище 3 (MEM+N2+B27), потім середовище 2 (RPMI-1640+N2+B27) і середовище 4 (RPMI-1640+N2+NGF+BSA) (Фіг. 3). Клітини, що вирощуються в середовищі 2, в результаті приводили до більшого розщеплювання SNAP-25 в порівнянні з іншими середовищами.

Для визначення оптимального часу диференціювання відповідну щільність клітин з клітинної лінії SiMa висівали в покриті поля-D-лізином лунки 96-лункового планшету для культури клітин, таких, що містять 100 мкл безсироваткового середовища, що містить мінімальне необхідне середовище, 2 мМ GlutaMAX™ I з солями Ерла, 1 x B27 добавка, 1 x N2 добавка, 0,1 мМ замінимі амінокислоти, 10 мМ HEPES і 25 мкг/мл GT1b. Клітини висівали протягом чотирьох різних діб для забезпечення тестування з часом через 6 год., 24 год., 48 год. і 72 год., і інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю. Середовища відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими середовищами, що містять 0 (не оброблений зразок), 0,1 пМ, 0,2 пМ, 0,4 пМ, 0,8 пМ, 1,6 пМ, 3,1 пМ, 6,25 пМ, 12,5 пМ або 25 пМ комплексу BoNT/A. Після обробки протягом ночі клітини промивали, інкубували протягом ще двох діб без токсину для того, щоб дати можливість для розщеплювання субстрату SNAP-25, і збирали, як описано вище, в Розділі 1. Після збору здійснювали визначення концентрації білка в клітинних лізату і виявлення присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою ECL сендвіч ІФА, як описано вище. Необроблені дані, одержані з апарату для візуалізації ECL, потім переносили в

SigmaPlot v. 9.0 і 4-параметричну логарифмічну підгонку використовували для визначення кривих залежності відповідні від дози. Були відсутні які-небудь обмеження, використовувані для 4-параметричної логарифмічної функції при вибудовуванні даних. Графічні звіти генерували з використанням наступного аналізу: R_2 (коефіцієнт кореляції), (Мах для набору даних), b (нахил Хілла), і $X0 \pm SE$ (значення $EC50 \pm$ стандартне відхилення). Результати указують на те, що значення $EC50$ менше ніж 2 пМ можуть бути досягнуті для клітин, диференційованих протягом 48-72 год. (Фіг. 4). Виявлення того, що диференційовані клітини можуть бути використані між 48 год. і 72 год. диференціюваннями за відсутності істотних змін в ефективності клітин, підкреслює робостність аналізу. Хоча час диференціювання менший ніж 48 год., може не підходити для пікомолярного тестування виготовленого продукту, даний менший час диференціювання є достатньо чутливими для того, щоб тестувати лікарську речовину в партії.

4. Оптимізація часу обробки BoNT/A

Для визначення оптимальної тривалості за часом для клітин з клітинної лінії, яку необхідно обробляти BoNT/A, тестували різну тривалість обробки BoNT/A. Відповідну щільність клітин з клітинної лінії SiMa висівали в покриті полі-D-лізином лунки 96-лункового планшету для культури клітин, таких, що містять 100 мкл безсироваткові середовища, що містить мінімальне необхідне середовище, 2 mM GlutaMAX™ I з солями Ерла, 1 x B27 добавка, 1 x N2 добавка, 0,1 mM замінимі амінокислоти, 10 mM HEPES і 25 мкг/мл GT1b. Клітини висівали і інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до диференціювання, що оцінювали за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, таких як припинення зростання і подовження нейриту (приблизно 3 діб). Середовища відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими середовищами, що містять 0 (не оброблений зразок), 0,1 пМ, 0,2 пМ, 0,4 пМ, 0,8 пМ, 1,6 пМ, 3,1 пМ, 6,3 пМ, 12,5 пМ або 25 пМ комплексу BoNT/A в середовищі для зростання RPMI 1640 в трьох паралелях для побудови повної залежності відповіді від дози. Здійснювали п'ять різних схем з тривалістю обробки BoNT/A: 1) 6 год. обробка BoNT/A, видалення і промивання клітин, інкубація клітин протягом 18 год. без BoNT/A, і збір клітин, як описано вище в Розділі 1; 2) 24 год. обробка BoNT/A, видалення і промивання клітин, і збір клітин, як описано вище в Розділі 1; 3) 24 год. обробка BoNT/A, видалення і промивання клітин, інкубація клітин протягом 24 год. без BoNT/A, і збір клітин, як описано вище в Розділі 1; 4) 24 год. інкубація BoNT/A, видалення і промивання клітин, інкубація клітин протягом 48 год. без BoNT/A, і збір клітин, як описано вище в Розділі 1; 5) 24 год. інкубація BoNT/A, видалення і промивання клітин, інкубація клітин протягом 72 год. без BoNT/A, і збір клітин, як описано вище в Розділі 1. Після збору здійснювали визначення концентрації білка в клітинних лізату і виявлення присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою ECL сендвіч ELISA, і $EC50$ розраховували, як описано вище. Результати вказують на те, що значення $EC50$ менше ніж 2 пМ можуть бути досягнуті з будь-якою з тестованих схем обробки BoNT/A (Фіг. 5). Цікаво те, що схеми обробки BoNT/A 24 год. + 24 год., 24 год. + 48 год. і 24 год. + 73 год. приводили по суті до одних і тих же значень $EC50$, 1,0 пМ, 1,1 пМ і 0,9 пМ, відповідно. Значення $EC50$, одержані для схем обробки BoNT/A 6 год. + 18 год. і 24 год. + 0 год., складали 1,7 пМ і 1,6 пМ, відповідно. Хоча величина одержаного сигналу мала, ці результати указують на те, що схеми обробки BoNT/A між 6 год. і 24 год. плюс від однієї доби до трьох діб інкубації після обробки можуть бути використані результати $EC50$, що є адекватною для знаходження активності BoNT/A, і забезпечує гнучкість для здійснення всього курсу аналізу.

5. Чутливість імунологічного способу виявлення активності BoNT/A

Для оцінки чутливість імунологічних способів виявлення активності BoNT/A, розкритих в даному описі, визначали момент захоплення BoNT/A клітинами, чутливими до інтоксикації BoNT/A. Відповідну щільність клітин з клітинної лінії SiMa висівали в покриті полі-D-лізину лунки 96-лункового планшету для культури клітин, таких, що містять 100 мкл безсироваткового середовища, що містить мінімальне необхідне середовище, 2 mM GlutaMAX™ I з солями Ерла, 1 x B27 добавку, 1 x N2 добавку, 0,1 mM замінимі амінокислоти, 10 mM HEPES і 20 мкг/мл GT1b. Клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до диференціювання, що оцінювали за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, таких як припинення зростання і подовження нейриту (приблизно 3 діб). Середовища відсипали з кожної лунки, замінювали свіжими середовищами, що містять 1 нМ комплексу BoNT/A, і оброблені клітини BoNT/A інкубували протягом шести різних моментів часу 0 хв (додавали нейротоксин і потім негайно видаляли), 5 хв, 10 хв, 20 хв, 30 хв і 60 хв. Як негативний контроль використовували середовища без BoNT/A (0 нМ). Після інкубації клітини промивали і збирали, як описано вище в Розділі 1. Після збору здійснювали визначення концентрації білка в клітинних лізатах і виявлення присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою ECL сендвіч ІФА, і $EC50$ розраховували, як описано вище. Результати указують на те, що

захоплення BoNT/A клітинами займає менше ніж одну хвилину до продукції значних кількостей продукту розщеплювання SNAP-25 в порівнянні з фоном (Фіг. 6).

6. Специфічність імунологічного способу виявлення активності BoNT/A.

Для оцінки специфічності імунологічних способів виявлення активності BoNT/A, розкритих в даному описі, визначали здатність клітин, чутливих до інтоксикації BoNT/A правильно відрізнати BoNT/A з виключенням частково інактивованого BoNT/A. Відповідну щільність клітин з клітинної лінії SiMa висівали в покриті полі-D-лізину лунки 96-лункового планшету для культури клітин, таких, що містять 100 мкл безсироваткового середовища, що містить мінімальне необхідне середовище, 2 mM GlutaMAX™ I з солями Ерла, 1 x B27 добавку, 1 x N2 добавку, 0,1 mM замінимі амінокислоти, 10 mM HEPES і 25 мкг/мл GT1b. Клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до диференціювання, що оцінювали за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, таких як припинення зростання і подовження нейриту (приблизно 3 діб). Середовища відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими середовищами, що містять 1) 0 (не оброблений зразок), 0,03 пМ, 0,1 пМ, 0,31 пМ, 0,93 пМ, 2,78 пМ, 8,33 пМ і 25 пМ комплексу BoNT/A; 2) 0, 0,14 нМ, 0,41 нМ, 1,23 нМ, 3,7 нМ, 11,11 нМ, 33,33 нМ і 100 нМ інактивованого BoNT/A (iBoNT/A); або 3) 0, 0,14 нМ, 0,41 нМ, 1,23 нМ, 3,7 нМ, 11,11 нМ, 33,33 нМ і 100 нМ фрагменту LHN/A фрагмент. iBoNT/A містить мутацію в домені зв'язуючого цинку легкого ланцюга, який повністю інактивує металлопротеазну активність нейротоксину, наприклад Liqing Zhou, et al., Expression and Purification of the Light Chain of Botulinum Neurotoxin A: A Single Mutation Abolishes its Cleavage of SNAP-25 and Neurotoxicity after Reconstitution with the Heavy Chain, Biochemistry 34: 15175-15181 (1995), що включена тут шляхом посилання. Фрагмент LHN/A не містить зв'язуючого домена, але містить інтактний домен транслокації і легкий ланцюг, дивися, наприклад Clifford C. Shone, et al., Recombinant Toxin Fragments, патент США 6461617, який включений тут шляхом посилання. Після 24 год. обробки клітини промивали, інкубували протягом ще двох діб без токсину для того, щоб дати можливість для розщеплювання субстрату SNAP-25, і збирали, як описано вище в Розділі 1. Після збору здійснювали визначення концентрації білка в клітинних лізату і виявлення присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою ECL сендвіч ІФА, і EC50 розраховували, як описано вище. Результати свідчать про те, що аффіність пов'язання клітин з iBoNT/A і LHN/A (EC50 > 100 нМ), щонайменше, в 60000 разів нижча, ніж аффіність пов'язання з BoNT/A (EC50=1,6 пМ) (Фіг. 7). Відсутність продукту розщеплювання SNAP-25 виявляли в клітинах, оброблених iBoNT/A при всіх тестованих концентраціях. Хоча низьку кількість продукту розщеплювання SNAP-25 виявляли в клітинах, оброблених самою високою дозою фрагменту LHN/A, ця активність є наслідком неспецифічного захоплення цього фрагменту внаслідок активності домена транслокації. Таким чином, результати свідчать про те, що імунологічні способи виявлення активності BoNT/A, розкриті в даному описі, можуть вимірювати всі стадії, залучені в процес інтоксикації, за допомогою якого BoNT/A протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25, і охоплює пов'язання BoNT/A з рецептором BoNT/A, інтералізацію комплексу нейротоксин/рецептор, транслокацію легкого ланцюга BoNT/A з внутріклітинної везикули в цитоплазму і протеолітичне розщеплювання SNAP-25.

Приклад VI

Імунологічний спосіб виявлення активності BoNT/A з використанням ECL сендвіч ІФА

У наступному прикладі проілюстровані імунологічні способи виявлення активності BoNT/A шляхом виявлення продукту розщеплювання SNAP-25 з використанням моноклонального антитіла α -SNAP-25, специфічного відносно продукту розщеплювання SNAP-25, що має C-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A з використанням ECL сендвіч ІФА.

Для приготування лізату клітин, оброблених BoNT/A, відповідну щільність клітин із стабільної клітинної лінії висівали в лунки 96-лункового планшету для культури тканини, такої, що містять 100 мкл безсироваткового середовища, що містить мінімальне необхідне середовище, 2 mM GlutaMAX™ I з солями Ерла, 1 x B27 добавка, 1 x N2 добавка, 0,1 mM замінимі амінокислоти, 10 mM HEPES і 25 мкг/мл GT1b (дивися Приклади I і II). Ці клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до диференціювання, що оцінювали за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, таких як припинення зростання і подовження нейриту (приблизно 3 діб). Середовища, в яких знаходяться диференційовані клітини, відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими середовищами, що містять 0 (не оброблений зразок), 0,03 пМ, 0,1 пМ, 0,3 пМ, 0,9 пМ, 2,8 пМ, 8,3 пМ і 25 пМ комплексу BoNT/A. Після обробки протягом 24 год. клітини промивали і інкубували протягом ще двох діб без токсину. Клітини збирали, як описано в Прикладі V.

Для приготування розчину захоплюючого антитіла α -SNAP-25 моноклональне антитіло α -

SNAP-25, що міститься в асцитах гібридами клітинної лінії 2E2A6, очищали з використанням стандартного протоколу очищення з білком А. Для приготування розчину виявляючого антитіла α -SNAP-25 кроляче поліклональне антитіло α -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) кон'югували з реагентом, що містить, рутеній(II) -тріс-біпіридин-(4-метилсульфонат) NHS

5 складним ефіром (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) відповідно до вказівок виробника (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Реакцію кон'югації, очищення міченого антитіла α -SNAP-25, визначення концентрації і зберігання здійснювали, як описано в Прикладі V.

Для приготування твердофазного носія, що містить захоплює антитіло, яке є специфічним відносно продукту розщеплювання SNAP-25, приблизно 5 мкл розчину моноклонального антитіла α -SNAP-25 2E2A6 (20 мкг/мл в 1 x PBS) додавали в кожну лунку 96-лункового планшета MSD High Bind, і розчин залишали для сушки на повітрі в кабінеті біологічної безпеки на 2-3 години для випаровування розчину. Лунки, з якими пов'язано захоплює антитіло, потім блокували і використовували безпосередньо для виявлення активності BoNT/A.

15 Для виявлення присутності продукту розщеплювання SNAP-25 за допомогою аналізу шляхом ECL сендвіч ІФА блокуючий буфер з планшетів відсипали з лунок, в кожну лунку додавали по 25 мкл лізату клітин, оброблених BoNT/A, і планшети інкубували при 4 °C протягом ночі. Лунки планшетів тричі промивали шляхом відсмоктування клітинного лізату і промивання кожної лунки тричі по 200 мкл 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20)

20 сорбітанмонолаурат). Після промивання 25 мкл розчину 5 мкг/мл виявляючого антитіла, що містить 2 % блокуючий реагент Amersham в 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат) додавали в кожну лунку, планшет закривали, і закритий планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години із струшуванням. Після інкубації з виявляючим антитілом лунки тричі промивали 200 мкл 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20®

25 (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 150 мкл 1 x буфера для прочитування (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) додавали в кожну лунку, і планшети прочитували з використанням апарату для візуалізації SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Зібрані дані аналізували, і EC50 розраховували, як описано в Прикладі V. Типовий результат представлений на Фіг. 8. Ці результати свідчать про те, що в середньому 1,0 nM BoNT/A при EC50 (діапазон приблизно від 0,3 nM до приблизно 2,0 nM), що виявляється, при відношенні сигналу до шуму для нижньої асимптоти від, приблизно 15:1 до, приблизно 20:1, і відношенні сигналу до шуму для верхньої асимптоти від, приблизно 20:1 до, приблизно 500:1.

Приклад VII

35 Імунологічний спосіб виявлення активності BoNT/A з використанням CL сендвіч ІФА

У наступному прикладі проілюстровані імунологічні способи виявлення активності BoNT/A шляхом виявлення продукту розщеплювання SNAP-25 з використанням моноклонального антитіла α -SNAP-25, специфічного відносно SNAP-25, що має С-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, за допомогою CL сендвіч ІФА.

40 Лізат клітин, оброблених BoNT/A, і розчин захоплюючого антитіла α -SNAP-25 готували, як описано в Прикладі VI.

Для приготування розчину виявляючого антитіла α -SNAP-25 поліклональне антитіло α -SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) кон'югували з пероксидазою хрину (HRP) відповідно до вказівок виробника (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). Реакцію кон'югації здійснювали шляхом додавання 500 мкл 1 мг/мл поліклональних антитіл α -SNAP-25 у флакон, що містить ліофілізовану активовану пероксидазу, змішування компонентів і потім додавання 10 мкл ціаноборгідриду натрію. Дану реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години у витяжній шафі. Після гасіння реакції мічені антитіла очищали з використанням стандартного протоколу очищення на центрифужних колонках, і концентрацію білка визначали з використанням стандартного колориметричного білкового аналізу. Абсорбцію поліклонального антитіла α -SNAP-25/пероксидаза кон'югат (HRP-horse radish peroxidase-пероксидаза кореня хрину) вимірювали при 455 нм з використанням спектрофотометра для визначення концентрації в моль на літр. Розчин виявляючого антитіла α -SNAP-25 зберігали при 4 °C до застосування.

Для приготування твердофазного носія, що містить захоплює антитіло α -SNAP-25, яке є специфічним відносно продукту розщеплювання SNAP-25, приблизно 100 мкл розчину моноклонального антитіла α -SNAP-25 2E2A6 (1 мг/мл в 1 x PBS) додавали в кожну лунку 96-лункового білого планшета Greiner, і планшети інкубували при 4 °C протягом ночі, і потім будь-який надлишок розчину антитіла відбирали. Лунки, з якими пов'язано захоплює антитіло, потім блокували шляхом додавання при кімнатній температурі протягом 1 години 150 мкл блокуючого буфера, що містить 2 % блокуючий реагент Amersham (GE Life Sciences,

Piscataway, NJ) і 10 % козину сироватку крові (VWR, West Chester, PA). Блокуючий буфер видаляли, і лунки промокали паперовим рушником шляхом перевертання і постукування. Лунки, з якими пов'язано захоплює антитіло, потім блокували і використовували безпосередньо для виявлення активності BoNT/A.

- 5 Для виявлення наявності продукту розщеплювання SNAP-25 за допомогою аналізу шляхом CL сендвіч ІФА 50 мкл лізату клітин, оброблених BoNT/A, додавали в кожну лунку, планшет закривали, і закритий планшет інкубували в шейкері, що обертається при 500 об./хв при 4 °C в продовж від 2-4 годин до нічної інкубації. Лунки планшетів тричі промивали шляхом відсмоктування клітинного лізату і промивання кожної лунки тричі 200 мкл 1 x PBS, 0,05 %
- 10 TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 100 мкл 1 мг/мл розчину виявляючого антитіла поліклональне антитіло α -SNAP-25/пероксидаза, що містить 2 % блокуючий реагент Amersham в 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат) додавали в кожну лунку, планшет закривали, і закритий планшет інкубували в шейкері, що обертається при 650 об./хв при кімнатній температурі протягом 1
- 15 години. Після інкубації з виявляючим антитілом лунки тричі промивали 200 мкл 1 x PBS, 0,05 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 100 мкл суміші 1:1 SuperSignal ELISA Pico 1:1 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) додавали в кожну лунку, і планшети прочитували з використанням люмінометра (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) при 395 нм. Зібрані дані аналізували, і EC50 розраховували, як описано в Прикладі V. Ці результати
- 20 указують на те, що в середньому 1,0 nM BoNT/A при EC50 (діапазон від, приблизно 0,3 nM до, приблизно 2,0 nM), що виявляється, при відношенні сигналу до шуму для нижньої асимптоти від, приблизно 15:1 до, приблизно 20:1, і відношенні сигналу до шуму для верхньої асимптоти від, приблизно 20:1 до, приблизно 500:1.

Приклад VIII

- 25 Імунологічний спосіб виявлення активності BoNT/A з використанням мультиплексного ECL сендвіч ІФА

У наступному прикладі проілюстровані мультиплексні імунологічні способи виявлення активності BoNT/A шляхом виявлення продукту розщеплювання SNAP-25 з використанням пари моноклонального антитіла α -SNAP-25, специфічного відносно продукту розщеплювання SNAP-25, і вторинного антитіла для різних білків.

- 30 1. Приготування і ідентифікація пари захоплює антитіло, що знаходить антитіло для другого білка

Для одержання не обробленого клітинного лізату для аналізу відповідну щільність клітин з початкової культури клітин SiMa висівали в колбу T175, що містить 40 мл ростового середовища, що містить 1X RPMI 1640, 10 % FBS (fetal bovine serum-фетальна бичача сироватка), 0,1 mM замінимі амінокислоти, 10 mM HEPES, 1 mM піруват натрію, і 100 E/100 мкг пеніциліну-стрептоміцину. Ці клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до досягнення клітинами приблизно 70-90 % конфлюентності. Клітини промивали і збирали шляхом лізису в свіжоприготованому буфері Triton X-100 (20 mM Tris pH 7,5, 150 mM

40 хлорид натрію, 0,001M EDTA, 1 mM EGTA і 1 % Triton-X-100), що лізував, при 4 °C впродовж приблизно 30 хвилин при постійному струшуванні. Клітини, що лізували центрифугували при приблизно 3300-3330 x g протягом 40 хвилин при 8 °C для видалення дебрису з використанням настільної центрифуги.

Для ідентифікації відповідної пари захоплює антитіло, що знаходить антитіло для другого білка здійснювали ECL сендвіч ELISA аналіз на 21 різних комбінації пар захоплюючого і виявляючого антитіла, що містять п'ять різних білків (Таблиця 13). Використовуваним антитілом було мишаче моноклональне антитіло α -синтаксин 1A-HPC S0664 (Sigma, St. Louis, MO), мишаче моноклональне антитіло α -GAPDH MAB374 (Chemicon, Temecula, CA), кролячі поліклональні антитіла α -синтаксин 1 S1172-1 (Sigma, St. Louis, MO), кролячі поліклональні антитіла α -GAPDH 2275-PC-1 (R & D Systems, Minneapolis, MN), кролячі поліклональні антитіла α -синтаксин 2 S5687 (Sigma, St. Louis, MO), мишаче моноклональне антитіло α -людський синтаксин 2 MAB2936 (R & D Systems, Minneapolis, MN), козине поліклональне антитіло α -мишачий синтаксин 2 AF2568 (Sigma, St. Louis, MO), кролячі поліклональні антитіла α -синтаксин 2 AB5596 (Sigma, St. Louis, MO), кролячі поліклональні антитіла α -синтаксин 1 S1172-2 (Sigma, St. Louis, MO), овече поліклональні антитіло α -h, m, r актин AF4000 (R & D Systems, Minneapolis, MN), мишаче моноклональне антитіло α -бета-актин A1978 (Sigma, St. Louis, MO), мишаче поліклональне антитіло α -бета-актин A2228 (Sigma, St. Louis, MO), мишаче моноклональне антитіло мишачий α -GAPDH G8795 (Sigma, St. Louis, MO), кролячі поліклональні антитіла α -GAPDH G9595 (Sigma, St. Louis, MO).

- 60 Для приготування розчину захоплюючого антитіла з вторинним білком моноклональних

антитіл набували у вигляді очищених антитіл. Для приготування розчину виявляючого антитіла з вторинним білком відповідне антитіло кон'югували з реагентом, що містить, рутеній(II) -тріс-біпіридин-(4-метилсульфонат) NHS складним ефіром (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) відповідно до вказівок виробника (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Реакцію кон'югації здійснювали шляхом додавання 30 мкл розведеного у дистильованій воді, концентрованого розчину MSD SULFO-TAG™ до 200 мкл 2 мг/мл поліклональних антитіл і інкубації реакційної суміші при кімнатній температурі протягом 2 годин в темноті. Мічені антитіла очищали з використанням стандартного протоколу очищення на центрифужних колонках, і концентрацію білка визначали з використанням стандартного колориметричного білкового аналізу. Абсорбцію кон'югату антитіло/MSD SULFO-TAG™ вимірювали при 455 нм з використанням спектрофотометра для визначення концентрації в моль на літр. Розчин виявляючого антитіла зберігали при 4 °C до застосування.

Для приготування твердофазного носія, що містить захоплююче антитіло, яке є специфічним відносно продукту розщеплювання SNAP-25, приблизно 5 мкл розчину моноклонального антитіла α -SNAP-25 2E2A6 (20 мкг/мл в 1 x PBS) додавали в кожну лунку 96-лункового планшету MSD High Bind, і розчин залишали для сушки на повітрі в кабінеті біологічної безпеки на 2-3 години для випаровування розчину, і потім планшети закривали і зберігали при 4 °C до застосування. Висушені лунки, з якими пов'язано захоплююче антитіло, потім блокували шляхом додавання 150 мкл блокуючого буфера, що містить 3 % BSA (Pierce, Rockford, IL), 10 % козину сироватку крові (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA), і Difco 1 % знежирене молоко (BD BioSciences Franklin Lakes, NJ) в 0,05 % Tween-20 PBS при кімнатній температурі протягом 1-2 годин.

Для виявлення присутності білка за допомогою аналізу ECL сендвіч ІФА блокуючий буфер з планшет відсипали з лунок, 25 мкл лізату клітин, оброблених BoNT/A, як описано вище, додавали в кожну лунку і планшети інкубували при 4 °C протягом ночі. Лунки планшетів тричі промивали шляхом відсмоктування клітинного лізату і промивання кожної лунки тричі по 200 мкл 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 25 мкл 5 мкг/мл розчину відповідного виявляючого антитіла з другим білком, ресуспендованого в блокуючому буфері, як описано вище, додавали в кожну лунку, планшет закривали, і закритий планшет інкубували при кімнатній температурі продовж, приблизно 1 години при струшуванні. Після інкубації з виявляючим антитілом лунки тричі промивали 250 мкл 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 150 мкл 1 x буфера для прочитування (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) додавали в кожну лунку, і планшети прочитували з використанням апарату для візуалізації SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Відношення розраховували шляхом ділення сигналу, одержаного на не оброблених клітинних лізатах для кожної пари антитіл на сигнал, одержаний для лізуючого буфера, як контроль (доза 0 нМ) для кожної пари антитіл (Таблиця 13). Ці результати свідчать про те, що серед двадцяти однієї різних комбінацій тестованих пар антитіл тільки дві пари антитіл мають відношення сигналу до шуму вище 10:1 для вищої тестованої дози: Пара №. 16 мишаче моноклональне антитіло α -GAPDH MAB374 і кролячі поліклональні антитіла α -GAPDH RDS2275-PC-1; і Пара № 21: мишаче моноклональне антитіло α -GAPDH MAB374 і кролячі поліклональні антитіла α -GAPDH G9545. Пара мишаче моноклональне антитіло α -GAPDH MAB374 і кролячі поліклональні антитіла α -GAPDH G9545 вибрана як пара захоплююче антитіло, що знаходить антитіло з другим білком для мультиплексного ECL сендвіч ІФА.

Таблиця 13

Скринінг комбінацій антитіл з другим білком

Пара антитіл №	Захоплююче антитіло	Виявляюче антитіло	Виявлення білка	Відношення сигнал/шум (лізат/буфер)
1	α-синтаксин 2 S5687 pAb	α-синтаксин 2 MAB2936 mAb	немає	0,92
2	α-синтаксин 2 AF2568 pAb	α-синтаксин 2 AB5596 pAb	немає	1,1
3	α-синтаксин 2 AF2568	α-синтаксин 2 S5687 pAb	немає	1,11
4	α-синтаксин 2 AF2936 pAb	α-синтаксин 2 AB5596 pAb	так	1,63
5	α-синтаксин 2 AF2936 pAb	α-синтаксин 2 S5687 pAb	так	1,6
6	α-синтаксин 2 AB5596 pAb	α-синтаксин 2 S5687 pAb	немає	0,82
7	α-синтаксин 2 AB5596 pAb	α-синтаксин 2 MAB2936 mAb	немає	0,87
8	α-синтаксин 2 MAB2936 mAb	α-синтаксин 2 AB5596 pAb	так	1,2
9	α-синтаксин 2 MAB2936 mAb	α-синтаксин 2 S5687 pAb	немає	1,07
10	α-синтаксин S0664 mAb	α-синтаксин 1 S1172-1 pAb	так	4,23
11	α-синтаксин S0664 mAb	α-синтаксин 1 S1172-2 pAb	немає	1,21
12	α-синтаксин 1 S1172-1 pAb	α-синтаксин S0664 mAb	так	5,5
13	α-синтаксин 1 S1172-2 pAb	α-синтаксин S0664 mAb	так	2,5
14	α-h, m,r actin AF4000 pAb	α-beta actin A1978 mAb	немає	1,04
15	α-h, m,r actin AF4000 pAb	α-beta actin A2228 mAb	немає	1,08
16	α-GAPDH MAB374 mAb	α-GAPDH 2275-PC-1 pAb	так	20,04
17	α-GAPDH MAB374 mAb	α-GAPDH G8795 mAb	немає	0,89
18	α-GAPDH 2275-PC-1 pAb	α-GAPDH MAB374 mAb	немає	1,08
19	α-GAPDH 2275-PC-1 pAb	α-GAPDH G8795 mAb	так	1,27
20	α-GAPDH G8795 mAb	α-GAPDH 2275-PC-1 pAb	так	2,74
21	α-GAPDH MAB374 mAb	α-GAPDH G9545 pAb	так	α100

2. Імунологічний спосіб виявлення активності BoNT/A з використанням мультиплексного ECL сендвіч ІФА.

- 5 Для одержання обробленого BoNT/A клітинного лізату для аналізу відповідну щільність клітин з початкової культури клітинної лінії SiMa висівали в покритий полі-D-лізином 96-лунковий планшет, що містить безсироваткове середовище, що містить мінімальне необхідне середовище, 2 mM GlutaMAX™ I з солями Ерла, 1 x B27 добавку, 1 x N2 добавку, 0,1 mM замінимі амінокислоти, 10 mM HEPES. Ці клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері
- 10 5 % діоксиду вуглецю до диференціювання, що оцінювали за допомогою стандартних і рутинних

морфологічних критеріїв, таких як припинення зростання і подовження нейриту (приблизно 3 діб). Середовища відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими середовищами, що містять 0 (не оброблений зразок), 0,67 Е/мл, 2,35 Е/мл, 8,23 Е/мл, 28,82 Е/мл, 101 Е/мл, 353 Е/мл комплексу BoNT/A. Після обробки протягом 24 год. клітини промивали, інкубували протягом ще

двох діб без токсину. Клітини промивали, збирали і обробляли, як описано вище в Розділі 1. Розчин захоплюючого антитіла α -SNAP-25 і розчин виявляючого антитіла α -SNAP-25 готували, як описано в Прикладі VII. Для приготування розчину захоплюючого антитіла α -GAPDH мишаче моноклональне антитіло α -GAPDH MAB374 (Chemicon, Temecula, CA) одержували, як описано в Розділі 1 вище. Для приготування розчину виявляючого антитіла α -GAPDH кролячі поліклональні антитіла α -GAPDH G9545 (Sigma, St. Louis, MO) конъюгували з реагентом, що містить, рутеній(II) -трис-біпіридин-(4-метилсульфонат) NHS складним ефіром (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) відповідно до вказівок виробника (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Реакцію конъюгації, очищення міченого антитіла α -SNAP-25, концентрація, визначення і зберігання здійснювали, як описано в Розділі 1 вище.

Для приготування твердофазного носія, що містить захоплююче антитіло α -SNAP-25 і захоплююче антитіло α -GAPDH, приблизно 2,5 нл розчину захоплюючого антитіла α -SNAP-25 (45 мкг/мл в 1 x PBS) і 2,5 нл розчину захоплюючого антитіла α -GAPDH (120 мкг/мл в 1 x PBS) додавали в кожну лунку 96-лункового планшета MSD High Bind в мультиплексному форматі з використанням роботизованої системи. Розчин залишали для сушки на повітрі в кабінеті біологічної безпеки в продовж, щонайменше 2-3 годин для випаровування розчину. Лунки, з якими пов'язано захоплююче антитіло, потім блокували і використовували безпосередньо для виявлення активності BoNT/A і білка GAPDH.

Для виявлення присутності продукту розщеплювання SNAP-25 за допомогою мультиплексного аналізу ECL сендвіч ІФА блокуючий буфер відсипали з лунок планшета, 25 мкл лізату клітин, оброблених BoNT/A, як описано вище, додавали в кожну лунку, і планшети інкубували при 4 °C протягом ночі. Лунки планшетів тричі промивали шляхом відсмоктування клітинного лізату і промивання кожної лунки тричі по 200 мкл 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 25 мкл 5 мкг/мл розчину виявляючого антитіла α -SNAP-25 і 25 мкл 5 мкг/мл розчину виявляючого антитіла α -GAPDH, як описано вище, додавали в кожну лунку, планшет закривали, і закритий планшет інкубували при кімнатній температурі протягом приблизного 1 години при струшуванні. Після інкубації з виявляючим антитілом лунки тричі промивали 250 мкл 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 150 мкл 1 x Буфера для прочитування (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) додавали в кожну лунку, і планшети прочитували з використанням апарату для візуалізації SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Зібрані дані аналізували, і відносні сили з нормалізованих даних розраховували, як описано в Прикладі V, за винятком того, що використовували програмне забезпечення PLA 2.0 (Stegmann Systems, GMBH, Germany).

Для порівняння виявлення продукту розщеплювання SNAP-25 також здійснювали з використанням моноплексного ECL сендвіч ІФА, як описано в Прикладі VI.

Результати свідчать про те, що дані для SNAP-25, одержані на основі моноплексного ECL сендвіч ІФА, або на основі не нормалізованих даних для SNAP-25, одержаних на основі мультиплексного ECL сендвіч ІФА, виявили одну дозу зразка, що відрізняється від останніх, що не укладається в криву залежності відповіді від дози. Проте, нормалізація даних SNAP-25 проти даних GAPDH дала кращу підгонку кривої, і активність була ближча до очікуваного значення.

Приклад IX

Імунологічний спосіб виявлення активності BoNT/A з використанням мультиплексного ЕС сендвіч ІФА

У наступному прикладі проілюстровані мультиплексні імунологічні способи виявлення активності BoNT/A шляхом виявлення продукту розщеплювання SNAP-25 з використанням пари моноклонального антитіла α -SNAP-25, специфічного відносно продукту розщеплювання SNAP-25, і другої пари антитіл для білка, що відрізняється.

Лізат клітин, оброблених а BoNT/A, готували, як описано в Прикладі VI. Розчин захоплюючого антитіла α -SNAP-25, розчин виявляючого антитіла α -SNAP-25 і твердофазний носій α -SNAP-25 готували, як описано в Прикладі VII.

Для приготування розчину захоплюючого антитіла α -GAPDH моноклональне антитіло α -GAPDH MAB374 (Millipore, Billerica, MA) придбали у вигляді очищеного антитіла. Для приготування розчину виявляючого антитіла α -GAPDH поліклональне антитіло α -GAPDH G9545 (Sigma, St. Louis, MO) конъюгували з пероксидазою хрину (HRP) відповідно до вказівок виробника (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). Реакцію конъюгації, визначення концентрації

і зберігання здійснювали, як описано в Прикладі VII.

Для приготування твердофазного носія, що містить друге захоплююче антитіло, специфічне відносно другого білка, приблизно 100 мкл розчину моноклонального антитіла, що містить 1 мкг/мл моноклонального антитіла α -GAPDH MAB374 додавали в кожну лунку 96-лункового білого планшета Greiner, і планшети інкубували при 4 °C протягом ночі, і потім будь-який надлишок розчину антитіла відбирали. Лунки, з якими пов'язано захоплююче антитіло α -GAPDH, потім блокували при кімнатній температурі протягом 1 години шляхом додавання 150 мкл блокуючого буфера, що містить 2 % блокуючий реагент Amersham (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) і 10 % козину сироватки крові (VWR, West Chester, PA). Блокуючий буфер видаляли і вміст промокали паперовими серветками шляхом перевертання і постукування. Лунки, з якими пов'язано захоплююче антитіло, потім блокували і використовували безпосередньо для виявлення активності BoNT/A.

Для виявлення присутності продукту розщеплювання SNAP-25 за допомогою аналізу шляхом мультиплексного CL сендвіч ELISA 50 мкл лізату клітин, оброблених BoNT/A, додавали в кожну лунку з твердофазним носієм із захоплюючим антитілом α -SNAP і твердофазним носієм із захоплюючим антитілом α -GAPDH, планшет закривали, і закритий планшет інкубували в шейкері, що обертається при 500 об./хв при 4 °C впродовж від 2-4 годин до нічної інкубації. Лунки планшетів тричі промивали шляхом відсмоктування клітинного лізату і промивання кожної лунки тричі 200 мкл 1 x PBS, 0,05 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 100 мкл розчину виявляючого антитіла, що містить 2 % блокуючий реагент Amersham в 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат) і 1 мг/мл поліклональне антитіло α -SNAP-25 /HRP, додавали в кожну лунку з твердофазним носієм із захоплюючим антитілом α -SNAP-25, планшет закривали, і закритий планшет інкубували на шейкері, що обертається при 650 об./хв при кімнатній температурі протягом 1 години. Аналогічно, 100 мкл розчину виявляючого антитіла, що містить 2 % блокуючий реагент Amersham в 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат), і 0,25 мг/мл поліклональне антитіло α -GAPDH G9545/HRP (Sigma Co., St Louis, MO) додавали в кожну лунку з твердофазним носієм із захоплюючим антитілом α -GAPDH, планшет закривали, і закритий планшет поміщали в шейкер, що обертається при 650 об./хв при кімнатній температурі протягом 1 години. Після інкубації з виявляючим антитілом лунки тричі промивали 200 мкл 1 x PBS, 0,05 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 100 мкл суміші 1:1 SuperSignal ELISA Pico (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) додавали в кожну лунку, і планшети прочитували з використанням люмінометра (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) при 395 нм. Зібрані дані аналізували, і EC50 розраховували, як описано в Прикладі V. Результати указують на те, що точки даних, зібрані для виявлених кількостей комплексу антитіло α -SNAP-25-антиген, краще підганялися після нормалізації з кількостями виявленого комплексу антитіло α -GAPDH-антиген, таким чином, забезпечуючи правильніше прочитування. Ці результати указують на те, що в середньому виявляли 1,0 pM BoNT/A при EC50 (діапазон від, приблизно 0,3 pM до, приблизно 2,0 pM) при відношенні сигналу до шуму для нижньої асимптоти від, приблизно 15:1 до, приблизно 20:1, і відношенні сигналу до шуму для верхньої асимптоти від, приблизно 20:1 до, приблизно 500:1.

Аналогічна схема може бути використана для мультиплексних імунологічних способів виявлення активності BoNT/A шляхом виявлення продукту розщеплювання SNAP-25 з використанням моноклонального антитіла α -SNAP-25, специфічного відносно продукту розщеплювання SNAP-25, що має C-кінець на залишку P₁ розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A, з використанням ECL сендвіч ІФА з тією ж самою парою антитіл α -GAPDH.

Приклад X

Імунологічний спосіб виявлення пікомолярних кількостей BoNT/A

У наступному прикладі проілюстроване те, як здійснювати імунологічні способи виявлення активності BoNT/A, які можуть виявляти пікомолярні кількості фармацевтичного продукту BoNT/A, такого як, наприклад BOTOX® DYSPOREX®/RELOXIN®, PURTOX®, XEOMIN®, NEURONOX® або BTX-A.

1. Імунологічний спосіб виявлення BoNT/A з використанням ECL сендвіч ІФА.

Для приготування лізату клітин, оброблених BoNT/A, приблизні від 50000 до 150000 клітин із стабільної клітинної лінії висівали в покриті полі-D-лізину лунки 96-лункового планшета для культури тканини, що містить 100 мкл безсироваткового середовища, що містить мінімальне необхідне середовище, 2 mM GlutaMAX™ I з солями Ерла, 1 x B27 добавку, 1 x N2 добавку, 0,1 mM замінимі амінокислоти, 10 mM HEPES і 25 мкг/мл GT1b (дивися Приклади I і II). Ці клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до диференціювання

клітин, що оцінювали за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, таких як припинення зростання і подовження нейриту (приблизно від 2 до 3 діб). Середовища, в яких знаходяться диференційовані клітини, відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими середовищами, що містять 0 (не оброблений зразок), 0,03 пМ, 0,1 пМ, 0,3 пМ, 0,9 пМ, 2,8 пМ, 8,3 пМ або 25 пМ фармацевтичного продукту BoNT/A, розведеного в розчині без хлориду натрію; або 0 (не оброблений зразок), 0,7 Е/мл, 2,1 Е/мл, 6,2 Е/мл, 18,5 Е/мл, 55,6 Е/мл, 166,7 Е/мл або 500 Е/мл фармацевтичного продукту BoNT/A, розведеного в середовищі без хлориду натрію. Оскільки фармацевтичний продукт BoNT/A містить хлорид натрію, його додавання до культурального середовища приводить в результаті до гіпертонічного середовища, яке є згубним для життєздатності клітини. Для подолання питання гіпертонічності 200 мкл середовища MEM, приготованого без хлориду натрію, використовували для розведення фармацевтичного продукту BoNT/A, забезпечуючи кінцеву концентрацію 25 пМ BoNT/A (500 Е/мл). Матрицю залишали постійною для всіх концентрацій разом з кривою залежності відповіді від дози шляхом додавання хлориду натрію в середовища, використовувани для приготування розчинів, що задовольняють кількості ексципієнтів, присутніх в найбільших використовуваних концентраціях (25 пМ або 500 Е/мл). Після 24-годинної обробки клітини промивали, і інкубували протягом ще двох діб без токсину. Для збору клітин середовище відсипали, промивали 1 x PBS, і лізували шляхом додавання 30 мкл лізуючого буфера, містить 50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 1 % Triton X-100 в кожну лунку, і планшет інкубували в шейкері, що обертається при 500 об./хв, протягом 30 хвилин при 4 °С. Планшет центрифугували при 4000 об./хв протягом 20 хвилин при 4 °С для осадження клітинного дебрису, і супернатант переносили в покритий захоплюючим антитілом 96-лунковий планшет для здійснення стадії виявлення.

Розчин захоплюючого антитіла α-SNAP-25, розчин виявляючого антитіла α-SNAP-25 і твердофазний носій, що містить захоплююче антитіло, яке є специфічним відносно продукту розщеплювання SNAP-25, готували, як описано в Приклад VI.

Для виявлення присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою аналізу шляхом ECL сендвіч ІФА блокуючий буфер з планшет відсипали, 25 мкл лізату клітин, оброблених BoNT/A, додавали в кожну лунку, і планшети інкубували при 4 °С в продовж 2 год. або 24 год. Лунки планшетів тричі промивали шляхом відсмоктування клітинного лізату і промивання кожної лунки тричі 200 мкл 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 25 мкл розчину 5 мкг/мл виявляючого антитіла α-SNAP-25, що містить 2 % блокуючий реагент Amersham в 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат) додавали в кожну лунку, планшет закривали, і закритий планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години при потрушуванні. Після інкубації з виявляючим антитілом α-SNAP-25 лунки тричі промивали 200 мкл 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання планшети обробляли, зібрані дані аналізували, і EC50 розраховували, як описано в Прикладі V. Ці результати указували на те, що в середньому виявляли 1,0 пМ BoNT/A при EC50 (діапазон від, приблизно 0,3 пМ до, приблизно 2,0 пМ) з відношенням сигналу до шуму для нижньої асимптоти від, приблизно 15:1 до, приблизно 20:1, і відношенням сигналу до шуму для верхньої асимптоти від, приблизно 20:1 до, приблизно 500:1 (Фіг. 9). Цей спосіб також може бути здійснений в мультиплексному варіанті, як описано в Прикладі VIII.

2. Імунологічний спосіб виявлення BoNT/A з використанням CL сендвіч ІФА.

Лізат клітин, оброблених BoNT/A, і розчин захоплюючого антитіла α-SNAP-25 готували, як описано в Прикладі VI. Розчин виявляючого антитіла α-SNAP-25 і твердофазний носій, що містить захоплююче антитіло, яке є специфічним відносно продукту розщеплювання SNAP-25, готують, як описано в Прикладі VII.

Для виявлення присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою аналізу шляхом CL сендвіч ІФА 25 мкл лізату клітин, оброблених BoNT/A, додавали в кожну лунку, планшет закривали, і закритий планшет інкубували в шейкері, що обертається при 500 об./хв, при 4 °С протягом 2 год. або 24 год. Лунки планшетів тричі промивали шляхом відсмоктування клітинного лізату і промивання кожної лунки тричі по 200 мкл 1 x PBS, 0,05 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 100 мкл 1 мг/мл розчину поліклональне антитіло α-SNAP-25/ виявляюче антитіло HRP, що містить 2 % блокуючий реагент Amersham в 1 x PBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат), додавали в кожну лунку, планшет закривали, і закритий планшет інкубували в шейкері, що обертається при 650 об./хв при кімнатній температурі протягом 1 години. Після інкубації з виявляючим антитілом лунки тричі промивали 200 мкл 1 x PBS, 0,05 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітанмонолаурат). Після промивання 100 мкл суміші 1:1 SuperSignal ELISA Pico (Pierce Biotechnology, Inc.,

Rockford, IL) добавляли в кожну лунку, і планшети прочитували з використанням люмінометра (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) при 395 нм. Зібрані дані аналізували, і EC50 розраховували, як описано в Прикладі V. Цей спосіб також можуть бути використаний в мультиплексному варіанті, як описано в Прикладі VIII.

5 Приклад XI

Імуннологічний спосіб виявлення нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A

У наступному прикладі проілюстроване те, як здійснювати імунологічний спосіб, який може виявляти присутність нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A.

BoNT/A в даний час використовується в широкому діапазоні медичних показань, що включають м'язову гіперактивність, офтальмологічних, шлунково-кишкових, урологічних і косметичних. При тривалому лікуванні, що повторюється, за допомогою BoNT/A у пацієнта можуть з'явитися нейтралізуючі антитіла α -BoNT/A до токсину, що приводять до імунорезистентності. Нейтралізуючі антитіла α -BoNT/A інгібують активність BoNT/A шляхом зупинки захоплення токсину в нейрональні клітини шляхом пов'язання з доменом скріплення (HC) і/або доменом транслокації (HN) BoNT/A. Деякі дослідження припустили, що до 5-10 % пацієнтів, яких повторно лікували від дистонії за допомогою препаратів BoNT/A, мають імунорезистентність унаслідок розвитку нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A. Надійний аналіз для визначення присутності нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A у крові пацієнта є мишачий аналіз (MPA). В даний час, BoNT/A інкубують з сироваткою крові пацієнтів до ін'єкції мишам. Присутність антитіл виражається в зменшеній відповіді на нейротоксин у тварини. Оскільки MPA є аналізом, заснованим *in vivo*, він може бути дорожчим вимагати більше часу в тому випадку, якщо його замінювати на клітинний аналіз.

Для виявлення присутності або відсутності нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A можуть бути використані імунологічні способи визначення активності BoNT/A, розкриті в даному описі. Один з шляхів полягає у визначенні кількості продукту розщеплювання SNAP-25, представленого після лікування різними концентраціями BoNT/A з використанням способу виявлення шляхом вестерн-блоттингу, інший шлях полягає в застосуванні способу виявлення шляхом ECL сендвіч ІФА.

Для одержання зразка, що містить нейтралізуюче антитіло α -BoNT/A, і негативний контрольний зразок, який, як відомо, не містить нейтралізуючі антитіла α -BoNT/A, сироватку крові виділяли з крові різних індивідів. Індивіди, що відмовляються від імунізацій, названі наївними індивідами. Індивіди, що приймають імунізацію, названі імунізованими індивідами. Кров відбирали в пробірку для одержання сироватки крові з активатором згортання (BD Biosciences, Bedford, MA). Сироватку крові одержували шляхом центрифугування крові при 1000xg протягом 10 хвилин при 4 °C. Одержували сироватку крові від двох донорів: одного індивіда імунізували BoNT/A, а іншого немає.

Для приготування лізату клітин, оброблених зразком, BoNT/A, що містить, клітини SiMa висівали в покритий полі-D-лізином 96-лунковий планшет і піддавали диференціюванню, як описано в Прикладі VI. Зразки сироватки крові людини піддавали серійному розведенню 1:100-1:152000 з 2,5-кратними інкрементами з використанням безсироваткового середовища. BoNT/A суспендували в 0,5 мл культурального середовища SiMa в концентрації 10 пМ. Середовища, BoNT/A, що містять, і антитіло α -BoNT/A, змішували і інкубували в продовж 15 хв або 1 год. при кімнатній температурі. Клітини обробляли BoNT/A з людською сироваткою крові протягом 2 год., а потім шляхом інкубації протягом 15 год. в свіжих ростових середовищах. Клітини також обробляли протягом 15 год. без додаткового часу інкубації.

Для виявлення присутності продукту розщеплювання SNAP-25 за допомогою аналізу шляхом вестерн-блоттингу середовища відсипали з кожної лунки, клітини суспендували в 50 мкл буфера для нанесення SDS-PAGE і потім нагрівали до 95 °C протягом 5 хвилин. Аліквоту з кожного зібраного зразка аналізували шляхом вестерн-блоттингу, як описано в Прикладі I, за винятком того, що зібрані зразки розділяли за допомогою SDS-PAGE з використанням 12 % 26-лункових гелів Criterion (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), і кролячу сироватку поліклональних антитіл α -SNAP-25₁₉₇ використовували як первинне антитіло (дивися Приклад IV). Результати указують на те, що тестовані зразки приводили в результаті до зменшеного розщеплення SNAP25 при порівнянні з негативним контрольним зразком, демонструючи те, що сироватка крові у імунізованого індивіда містила нейтралізуючі антитіла α -BoNT/A.

Для виявлення присутності продукту розщеплювання SNAP-25 за допомогою ECL сендвіч ІФА середовища видаляли з кожної лунки, і клітини лізували, як описано в Прикладі V. Розчин захоплюючого антитіла α -SNAP-25, розчин виявляючого антитіла α -SNAP-25 і твердофазний носій α -SNAP-25 готували, як описано в Прикладі VII. Супернатанти переносили на твердофазний носій α -SNAP-25 і проводили ECL сендвіч ELISA, як детально описано в

Прикладі V. Зібрані дані аналізували, і EC50 розраховували, як описано в Прикладі V, за винятком того, що EC50 є розведенням сировоти крові, необхідним для інгібування активності BoNT/A до α від максимального значення, і відношення максимального сигналу (SignalMax) до мінімального сигналу (SignalMin) одержували шляхом ділення сигналу продукту розщеплювання SNAP-25, одержаного при найбільшому розведенні сироватки крові, на сигнал, одержаний при найменшому розведенні сироватки крові.

Результати указують на те, що присутність нейтралізуючих α -BoNT/A у людській сироватці крові може бути виявлено. Активності комплексу BoNT/A, що інкубується в сироватці крові імунізованого індивіда, зменшувалися у міру зменшення розведення сироватки крові, тоді як присутність наївної сироватки крові не робила впливу на аналіз при кожному тестуванні розведення. Цей аналіз може бути здійснений з використанням виготовленого фармацевтичного продукту BoNT/A, партії комплексу BoNT/A або очищеного нейротоксину.

Приклад XII

Імунологічний спосіб виявлення активності BoNT/A з використанням сконструйованих клітин У наступному прикладі проілюстроване те, як вводити молекулу полінуклеотиду, що кодує рецептор BoNT/A, в клітини із стабільної клітинної лінії для додаткового поліпшення чутливості до інтоксикації BoNT/A або поліпшення здатності захоплювати BoNT/A.

Для введення екзогенного рецептора BoNT/A в клітини, складові стійкої клітинної лінії, експресуючої контрукцію, що містить молекулу полінуклеотиду SEQ ID NO: 130, кодує FGFR2 SEQ ID NO: 59, або молекулу полінуклеотиду SEQ ID NO: 139, кодує FGFR3 SEQ ID NO: 25, переносили в клітини із стабільної клітинної лінії за допомогою катіонного ліпідного способу. Відповідну щільність (приблизно 5×10^6 клітин) із стабільної клітинної лінії висівають в 100 мм чашку для культури тканин, що містить 5 мл повного культурального середовища, і вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до досягнення клітинами щільності, прийнятної для трансфекції. 3 мл трансфікуючого розчину готують шляхом додавання 1,5 мл OPTI-MEM зредукованого сироваткового середовища, що містить 60 мкл LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA), що інкубується при кімнатній температурі протягом 5 хвилин, до 1,5 мл OPTI-MEM зредукованого сироваткового середовища, що містить 24 мкг експресуючої конструкції, кодує FGFR2 або FGFR3, або контрольної експресуючої конструкції, що кодує зелений флуоресцентний білок (GFP). Дану трансфікуючу суміш інкубували при кімнатній температурі в продовж, приблизно 30 хвилин. Повні середовища замінювали 3 мл трансфікуючого розчину, і клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю протягом приблизного 8 годин. Трансфікуюче середовища замінювали 3 мл свіжих повних культуральних середовищ, і клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю в продовж, приблизно 24 годин. Середовища замінювали 3 мл свіжого повного культурального середовища, що містить приблизно 1 mM G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю в продовж, приблизно 1 тижня, старі середовища замінювали на свіжі повні культуральні середовища, що містять 0,5 mM G418. Після прояву антибіотикорезистентних колоній, резистентні клони повторно наносили на нових 100 мм культуральні планшети, що містять свіжі повні культуральні середовища, доповнені, приблизно 0,5 mM G418 до досягнення клітинами щільності $6-20 \times 10^5$ клітин/мл.

Для визначення того, чи покращує надекспресія рецептора BoNT/A чутливість клітини до інтоксикації BoNT/A або покращує здатність захоплювати BoNT/A будували криву залежності відповіді від дози з використанням клітин, оброблених різними дозами комплексу BoNT/A. Для приготування лізату клітин, оброблених BoNT/A, відповідну щільність клітин із стійко трансфікованої клітинної лінії висівали в лунки 96-лункового планшету для культури тканини, що містять 100 мкл відповідного безсироваткового середовища (Таблиця 5). Ці клітини інкубували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % діоксиду вуглецю до диференціювання, що оцінювали за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, таких як припинення зростання і подовження нейриту (приблизно 3 діб). Середовища, в яких знаходяться диференційовані клітини, відсипали з кожної лунки і замінювали свіжими середовищами, що містять 0 (не оброблений зразок), 0,01 nM, 0,04 nM, 0,12 nM, 0,37 nM, 1,1 nM, 3,3 nM і 10 nM комплексу BoNT/A для клітин, складових трансфіковані клітинні лінії SiMa або PC12; і 0 (не оброблений зразок), 0,14 nM, 0,40 nM, 1,2 nM, 3,7 nM, 11 nM, 33 nM і 100 nM комплексу BoNT/A для клітин, складових трансфікованої клітинної лінії Neuro-2a. Клітини обробляли середовищем, що містить BoNT/A, протягом 6 годин, а потім шляхом інкубації зі свіжими середовищами протягом 15 год., і збирали шляхом додавання 40 мкл 2 x буфера для нанесення SDS-PAGE і планшет нагрівали до 95 °C протягом 5 хв.

Для виявлення присутності продукту розщеплювання SNAP-25 аліквоту з кожного зібраного

зразка аналізували шляхом вестерн-блоттингу, як описано в Прикладі I, за винятком того, що зібрані зразки розділяли шляхом SDS-PAGE з використанням 12 % 26-лункових гелів Criterion (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), і наступні первинні антитіла використовували: розведення сироватки 1:1000 кролячих поліклональних антитіл α -SNAP-25 (Приклад IV) (AGN, поліклональне антитіло), розведення 1:500 кролячих поліклональних антитіл α -FGFR2 C-17 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) або розведення 1:500 кролячих поліклональних антитіл α -FGFR3 C-15 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Інтенсивність відповідного білка, з кожного зразка розраховували з використанням Image Quant (GE Healthcare, Piscataway, NJ) і EC50 для кожної клітинної лінії оцінювали з використанням програмного забезпечення SigmaPlot.

Результати указують на те, що клітини, трансфіковані FGFR2 або FGFR3, чутливіші до BoNT/A в порівнянні з клітинами, трансфікованими GFP, і також демонструють вищий рівень розщеплювання SNAP-25 (Таблиця 14). Значення EC50 для клітин, надекспресуючих FGFR2 або FGFR3, було нижче, ніж значення EC50, продемонстровані клітинами надекспресуючими GFP, що свідчить про те, що введення FGFR2 або FGFR3 покращувало чутливість клітини до інтоксикації BoNT/A або покращувало здатність захоплювати BoNT/A.

Таблиця 14

Ефекти введення екзогенного рецептора BoNT/As
в клітку Чутливість до інтоксикації BoNT/A або захоплення BoNT/A

Клітини	Трансфікований ген	EC50 (нМ)	Максимальний сигнал
SiMa	GFP	0,0812 \pm 0,010	22733787
SiMa	FGFR2	0,0459 \pm 0,003	26136578
SiMa	FGFR3	0,0377 \pm 0,006	24326271
PC-12	GFP	3,3362 \pm 1,881	26956063
PC-12	FGFR2	0,3429 \pm 0,059	25376114
PC-12	FGFR3	0,2634 \pm 0,026	24102459
Neuro-2a	GFP	61,80 \pm 9,710	4605974
Neuro-2a	FGFR2	31,59 \pm 8,800	23279765
Neuro-2a	FGFR3	11,55 \pm 5,240	28347413

Виявлення присутності продукту розщеплювання SNAP-25 також може бути здійснене з використанням сендвіч ІФА, як описано в Прикладах VI-X.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Фернандес-Салас, Естер

Ванг Йоан

Герей Паттон, Е.

Вонг Ліна С.

Хондгес Д., Діан

Аокі Кей Роджер

<120> Імунологічні аналізи активності ботулічного токсину серотипу А

<130> 18383 (BOT)

<150> US 61/036,723

<151> 2008-03-14

<160> 148

<170> СтійкаSEQ для Версії 4.0 Windows

<210> 1

<211> 1296

<212> PPT

<213> Клюстридій ботулінічний

<400> 1

```

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
1          5          10          15
Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
20          25          30
Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
35          40          45
Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
50          55          60
Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
65          70          75          80
Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
85          90          95
Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
100          105          110
Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
115          120          125
Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
130          135          140
Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
145          150          155          160
Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
165          170          175
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
180          185          190
Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
195          200          205
Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
210          215          220
Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
225          230          235          240
Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
245          250          255
Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
260          265          270
Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
275          280          285
Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
290          295          300

```

```

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
305          310          315          320
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
          325          330          335
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
          340          345          350
Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
          355          360          365
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr
          370          375          380
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
385          390          395          400
Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu
          405          410          415
Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
          420          425          430
Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys
          435          440          445
Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
          450          455          460
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
465          470          475          480
Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
          485          490          495
Asp Leu Ile Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
          500          505          510
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
          515          520          525
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
          530          535          540
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
545          550          555          560
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
          565          570          575
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
          580          585          590
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
          595          600          605
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
          610          615          620
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
625          630          635          640
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
          645          650          655
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
          660          665          670
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
          675          680          685
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
          690          695          700
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
705          710          715          720
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
          725          730          735
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
          740          745          750
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
          755          760          765
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
          770          775          780
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
785          790          795          800
Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys

```

														805				810				815							
Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly														
														820					825					830					
Gln	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp														
														835					840					845					
Ile	Pro	Phe	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Asp	Asn	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser														
														850					855					860					
Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	Ile	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Thr	Ser	Ile	Leu	Asn														
865															870					875					880				
Leu	Arg	Tyr	Glu	Ser	Asn	His	Leu	Ile	Asp	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ala	Ser														
														885					890					895					
Lys	Ile	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Val	Asn	Phe	Asp	Pro	Ile	Asp	Lys	Asn														
														900					905					910					
Gln	Ile	Gln	Leu	Phe	Asn	Leu	Glu	Ser	Ser	Lys	Ile	Glu	Val	Ile	Leu														
														915					920					925					
Lys	Asn	Ala	Ile	Val	Tyr	Asn	Ser	Met	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ser	Thr	Ser														
														930					935					940					
Phe	Trp	Ile	Arg	Ile	Pro	Lys	Tyr	Phe	Asn	Ser	Ile	Ser	Leu	Asn	Asn														
945															950					955					960				
Glu	Tyr	Thr	Ile	Ile	Asn	Cys	Met	Glu	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Lys	Val														
														965					970					975					
Ser	Leu	Asn	Tyr	Gly	Glu	Ile	Ile	Trp	Thr	Leu	Gln	Asp	Thr	Gln	Glu														
														980					985					990					
Ile	Lys	Gln	Arg	Val	Val	Phe	Lys	Tyr	Ser	Gln	Met	Ile	Asn	Ile	Ser														
														995					1000					1005					
Asp	Tyr	Ile	Asn	Arg	Trp	Ile	Phe	Val	Thr	Ile	Thr	Asn	Asn	Arg	Leu														
														1010					1015					1020					
Asn	Asn	Ser	Lys	Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly	Arg	Leu	Ile	Asp	Gln	Lys	Pro														
1025															1030					1035					1040				
Ile	Ser	Asn	Leu	Gly	Asn	Ile	His	Ala	Ser	Asn	Asn	Ile	Met	Phe	Lys														
														1045					1050					1055					
Leu	Asp	Gly	Cys	Arg	Asp	Thr	His	Arg	Tyr	Ile	Trp	Ile	Lys	Tyr	Phe														
														1060					1065					1070					
Asn	Leu	Phe	Asp	Lys	Glu	Leu	Asn	Glu	Lys	Glu	Ile	Lys	Asp	Leu	Tyr														
														1075					1080					1085					
Asp	Asn	Gln	Ser	Asn	Ser	Gly	Ile	Leu	Lys	Asp	Phe	Trp	Gly	Asp	Tyr														
														1090					1095					1100					
Leu	Gln	Tyr	Asp	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu	Asn	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asn														
														1105					1110					1115					
Lys	Tyr	Val	Asp	Val	Asn	Asn	Val	Gly	Ile	Arg	Gly	Tyr	Met	Tyr	Leu														
														1125					1130					1135					
Lys	Gly	Pro	Arg	Gly	Ser	Val	Met	Thr	Thr	Asn	Ile	Tyr	Leu	Asn	Ser														
														1140					1145					1150					
Ser	Leu	Tyr	Arg	Gly	Thr	Lys	Phe	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gly														
														1155					1160					1165					
Asn	Lys	Asp	Asn	Ile	Val	Arg	Asn	Asn	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	Asn	Val														
														1170					1175					1180					
Val	Val	Lys	Asn	Lys	Glu	Tyr	Arg	Leu	Ala	Thr	Asn																		

<210> 2
 <211> 1296
 <212> ПРТ
 <213> Клюстридій ботулінічний

<400> 2
 Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
 1 5 10 15
 Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
 20 25 30
 Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
 35 40 45
 Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
 50 55 60
 Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
 65 70 75 80
 Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
 85 90 95
 Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val
 100 105 110
 Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
 115 120 125
 Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
 130 135 140
 Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
 145 150 155 160
 Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Asp Val Leu Asn Leu Thr
 165 170 175
 Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
 180 185 190
 Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
 195 200 205
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
 210 215 220
 Leu Ile His Ala Glu His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
 225 230 235 240
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu
 245 250 255
 Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys
 260 265 270
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn
 275 280 285
 Lys Phe Lys Asp Val Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Ile
 290 295 300
 Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu
 325 330 335
 Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
 340 345 350
 Asn Phe Val Asn Phe Phe Lys Val Ile Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365
 Phe Asp Lys Ala Val Phe Arg Ile Asn Ile Val Pro Asp Glu Asn Tyr
 370 375 380
 Thr Ile Lys Asp Gly Phe Asn Leu Lys Gly Ala Asn Leu Ser Thr Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Ser Arg Asn Phe Thr Arg Leu
 405 410 415
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430
 Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly Tyr Asn Lys
 435 440 445
 Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe

450		455		460	
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asp Lys Val Glu Glu					
465		470		475	480
Ile Thr Ala Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu					
	485		490		495
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asp Phe Asp Asn Glu Pro					
	500		505		510
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu					
	515		520		525
Glu Pro Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu					
	530		535		540
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu					
545		550		555	560
His Gly Asp Ser Arg Ile Ile Leu Thr Asn Ser Ala Glu Glu Ala Leu					
	565		570		575
Leu Lys Pro Asn Val Ala Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Lys Tyr Val Lys					
	580		585		590
Lys Ile Asn Lys Ala Val Glu Ala Phe Met Phe Leu Asn Trp Ala Glu					
	595		600		605
Glu Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Asn Glu Val Thr Thr Met					
	610		615		620
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala					
625		630		635	640
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Ser Lys Gly Glu Phe Val Glu Ala Ile					
	645		650		655
Ile Phe Thr Gly Val Val Ala Met Leu Glu Phe Ile Pro Glu Tyr Ala					
	660		665		670
Leu Pro Val Phe Gly Thr Phe Ala Ile Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys					
	675		680		685
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asn Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu					
	690		695		700
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Thr Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys					
705		710		715	720
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Glu Lys Met Lys Lys Ala Leu					
	725		730		735
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn					
	740		745		750
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp					
	755		760		765
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Ser Ala Met Ile Asn Ile					
	770		775		780
Asn Lys Phe Leu Asp Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met					
785		790		795	800
Ile Pro Tyr Ala Val Lys Arg Leu Lys Asp Phe Asp Ala Ser Val Arg					
	805		810		815
Asp Val Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Val Leu					
	820		825		830
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Glu Val Asn Asn Thr Leu Ser Ala Asp					
	835		840		845
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Lys Lys Leu Leu Ser					
	850		855		860
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Val Asn Thr Ser Ile Leu Ser					
865		870		875	880
Ile Val Tyr Lys Lys Asp Asp Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Gly Ala					
	885		890		895
Lys Ile Asn Ile Gly Asp Arg Val Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Lys Asn					
	900		905		910
Gln Ile Lys Leu Ile Asn Leu Glu Ser Ser Thr Ile Glu Val Ile Leu					
	915		920		925
Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser					
	930		935		940
Phe Trp Ile Lys Ile Pro Lys Tyr Phe Ser Lys Ile Asn Leu Asn Asn					
945		950		955	960

Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Ile Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
 965 970 975
 Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Asn Lys Gln
 980 985 990
 Asn Ile Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Val Asn Ile Ser
 995 1000 1005
 Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu
 1010 1015 1020
 Thr Lys Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro
 1025 1030 1035 1040
 Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Lys Ile Met Phe Lys
 1045 1050 1055
 Leu Asp Gly Cys Arg Asp Pro Arg Arg Tyr Ile Met Ile Lys Tyr Phe
 1060 1065 1070
 Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr
 1075 1080 1085
 Asp Ser Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr
 1090 1095 1100
 Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Phe Asp Pro Asn
 1105 1110 1115 1120
 Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Ile Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu
 1125 1130 1135
 Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Val Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser
 1140 1145 1150
 Thr Leu Tyr Glu Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly
 1155 1160 1165
 Asn Glu Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val
 1170 1175 1180
 Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala
 1185 1190 1195 1200
 Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn
 1205 1210 1215
 Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asp Asp Gln Gly Ile Arg
 1220 1225 1230
 Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly
 1235 1240 1245
 Phe Ile Gly Phe His Leu Tyr Asp Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser
 1250 1255 1260
 Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Val Gly Lys Ala Ser Arg Thr Phe Gly Cys
 1265 1270 1275 1280
 Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Ser Ser Leu
 1285 1290 1295

<210> 3

<211> 1292

<212> ПРТ

<213> Клюстридій Ботулінічний

<400> 3

Met Pro Phe Val Asn Lys Pro Phe Asn Tyr Arg Asp Pro Gly Asn Gly
 1 5 10 15
 Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
 20 25 30
 Val Lys Ala Phe Lys Ile His Glu Gly Val Trp Val Ile Pro Glu Arg
 35 40 45
 Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
 50 55 60
 Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
 65 70 75 80
 Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Ile Lys Leu Phe Asp
 85 90 95
 Arg Ile Tyr Ser Thr Gly Leu Gly Arg Met Leu Leu Ser Phe Ile Val

Lys	Gly	Ile	Pro	Phe	Trp	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Asp	Thr	Glu	Leu	Lys	
		115					120					125				
Val	Ile	Asp	Thr	Asn	Cys	Ile	Asn	Val	Ile	Glu	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	
	130					135					140					
Arg	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Val	Ile	Thr	Gly	Pro	Ser	Ala	Asp	Ile	
	145				150					155					160	
Ile	Gln	Phe	Glu	Cys	Lys	Ser	Phe	Gly	His	Asp	Val	Phe	Asn	Leu	Thr	
				165					170					175		
Arg	Asn	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Tyr	Ile	Arg	Phe	Ser	Pro	Asp	Phe	
		180						185					190			
Thr	Phe	Gly	Phe	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Asp	Thr	Asn	Pro	Leu	Leu	
		195					200					205				
Gly	Ala	Gly	Thr	Phe	Ala	Thr	Asp	Pro	Ala	Val	Thr	Leu	Ala	His	Glu	
	210					215					220					
Leu	Ile	His	Ala	Ala	His	Arg	Leu	Tyr	Gly	Ile	Ala	Ile	Asn	Pro	Asn	
	225				230					235					240	
Arg	Val	Leu	Lys	Val	Lys	Thr	Asn	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Met	Ser	Gly	Leu	
				245					250					255		
Glu	Val	Ser	Phe	Glu	Glu	Leu	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Asn	Asp	Thr	Asn	
			260					265					270			
Phe	Ile	Asp	Ser	Leu	Trp	Gln	Lys	Lys	Phe	Ser	Arg	Asp	Ala	Tyr	Asp	
		275					280					285				
Asn	Leu	Gln	Asn	Ile	Ala	Arg	Ile	Leu	Asn	Glu	Ala	Lys	Thr	Ile	Val	
	290					295					300					
Gly	Thr	Thr	Thr	Pro	Leu	Gln	Tyr	Met	Lys	Asn	Ile	Phe	Ile	Arg	Lys	
	305				310					315					320	
Tyr	Phe	Leu	Ser	Glu	Asp	Ala	Ser	Gly	Lys	Ile	Ser	Val	Asn	Lys	Ala	
				325					330					335		
Ala	Phe	Lys	Glu	Phe	Tyr	Arg	Val	Leu	Thr	Arg	Gly	Phe	Thr	Glu	Leu	
			340					345					350			
Glu	Phe	Val	Asn	Pro	Phe	Lys	Val	Ile	Asn	Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	
		355					360					365				
Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Arg	Ile	Asn	Ile	Val	Pro	Asp	Glu	Asn	Tyr	
	370					375					380					
Thr	Ile	Asn	Glu	Gly	Phe	Asn	Leu	Glu	Gly	Ala	Asn	Ser	Asn	Gly	Gln	
	385				390					395					400	
Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	Ser	Arg	Asn	Phe	Thr	Arg	Leu	Lys	Asn	Phe	Thr	
				405					410					415		
Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu	Leu	Cys	Val	Arg	Gly	Ile	Ile	Pro	
			420					425					430			
Phe	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Gly	Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Asn	Tyr	
		435				440			</							


```

Asp Phe Thr Asp Glu Thr Asn Glu Val Thr Thr Met Asp Lys Ile Ala
610 615 620
Asp Ile Thr Ile Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly
625 630 635 640
Asn Met Val Ser Lys Gly Glu Phe Val Glu Ala Ile Leu Phe Thr Gly
645 650 655
Val Val Ala Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Tyr Ser Leu Pro Val Phe
660 665 670
Gly Thr Phe Ala Ile Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val
675 680 685
Gln Thr Ile Asn Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu
690 695 700
Val Tyr Lys Tyr Thr Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln
705 710 715 720
Ile Asp Leu Ile Arg Glu Lys Met Lys Lys Ala Leu Glu Asn Gln Ala
725 730 735
Glu Ala Thr Arg Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu
740 745 750
Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys
755 760 765
Leu Asn Arg Ser Ile Asn Arg Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu
770 775 780
Asp Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Ala
785 790 795 800
Val Lys Arg Leu Lys Asp Phe Asp Ala Ser Val Arg Asp Val Leu Leu
805 810 815
Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Leu Gln Val Asp Arg
820 825 830
Leu Lys Asp Glu Val Asn Asn Thr Leu Ser Ala Asp Ile Pro Phe Gln
835 840 845
Leu Ser Lys Tyr Val Asn Asp Lys Lys Leu Leu Ser Thr Phe Thr Glu
850 855 860
Tyr Ile Lys Asn Ile Val Asn Thr Ser Ile Leu Ser Ile Val Tyr Lys
865 870 875 880
Lys Asp Asp Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Gly Ala Lys Ile Asn Ile
885 890 895
Gly Asp Arg Val Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Lys Asn Gln Ile Lys Leu
900 905 910
Ile Asn Leu Glu Ser Ser Thr Ile Glu Val Ile Leu Lys Asn Ala Ile
915 920 925
Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser Phe Trp Ile Lys
930 935 940
Ile Pro Lys Tyr Phe Ser Lys Ile Asn Leu Asn Asn Glu Tyr Thr Ile
945 950 955 960
Ile Asn Cys Ile Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn Tyr
965 970 975
Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Asn Lys Gln Asn Ile Gln Arg
980 985 990
Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Val Asn Ile Ser Asp Tyr Ile Asn
995 1000 1005
Arg Trp Met Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Thr Lys Ser Lys
1010 1015 1020
Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro Ile Ser Asn Leu
1025 1030 1035 1040
Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Lys Ile Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys
1045 1050 1055
Arg Asp Pro Arg Arg Tyr Ile Met Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp
1060 1065 1070
Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Ser Gln Ser
1075 1080 1085
Asn Pro Gly Ile Leu Lys Asp Phe Thr Gly Asn Tyr Leu Gln Tyr Asp
1090 1095 1100
Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Phe Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp

```

```

1105          1110          1115          1120
Val Asn Asn Ile Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg
          1125          1130          1135
Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Thr Leu Tyr Met
          1140          1145          1150
Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Glu Asp Asn
          1155          1160          1165
Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn
          1170          1175          1180
Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu Lys
1185          1190          1195          1200
Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser Gln Val
          1205          1210          1215
Val Val Met Lys Ser Lys Asp Asp Gln Gly Ile Arg Asn Lys Cys Lys
          1220          1225          1230
Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly Phe Val Gly Phe
          1235          1240          1245
His Leu Tyr Asp Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser Asn Trp Tyr Asn
          1250          1255          1260
Arg Gln Val Gly Lys Ala Ser Arg Thr Phe Gly Cys Ser Trp Glu Phe
1265          1270          1275          1280
Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Ser Ser Leu
          1285          1290

```

```

<210> 4
<211> 1296
<212> ПРТ
<213> Клястридій ботулінічний

```

```

<400> 4
Met Pro Leu Val Asn Gln Gln Ile Asn Tyr Tyr Asp Pro Val Asn Gly
1      5      10      15
Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Lys Met Gln Pro
          20      25      30
Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Val Trp Val Ile Pro Glu Arg
          35      40      45
Asp Ile Phe Thr Asn Pro Glu Glu Val Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
50      55      60
Ala Lys Gln Val Pro Ile Ser Tyr Tyr Asp Ser Ala Tyr Leu Ser Thr
65      70      75      80
Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Ile Lys Leu Phe Glu
          85      90      95
Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Ile Ser Ile Val
          100     105     110
Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Gly Lys Ile Asp Thr Glu Leu Lys
          115     120     125
Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Ile Ile Gln Leu Asp Asp Ser Tyr
130     135     140
Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Ala Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asn Ile
145     150     155     160
Ile Glu Ser Gln Cys Ser Ser Phe Arg Asp Asp Val Leu Asn Leu Thr
          165     170     175
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
          180     185     190
Thr Val Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
          195     200     205
Gly Ala Gly Lys Phe Ala Gln Asp Pro Ala Val Ala Leu Ala His Glu
210     215     220
Leu Ile His Ala Glu His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Thr Asn
225     230     235     240
Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ala Gly Leu
          245     250     255

```

Glu Val Ser Leu Glu Glu Leu Ile Thr Phe Gly Gly Asn Asp Ala Lys
 260 265 270
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Lys Lys Glu Phe Ser Leu Tyr Tyr Tyr Asn
 275 280 285
 Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val
 290 295 300
 Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Ala Thr Gly Lys Phe Leu Val Asp Arg Leu
 325 330 335
 Lys Phe Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
 340 345 350
 Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365
 Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Asp Val Asn Tyr
 370 375 380
 Thr Ile His Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Gly Gln Asn Ile Glu Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu
 405 410 415
 Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 420 425 430
 Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly Tyr Asn Lys
 435 440 445
 Ala Leu Asn Glu Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
 450 455 460
 Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asp Lys Val Glu Glu
 465 470 475 480
 Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
 485 490 495
 Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Asn Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
 500 505 510
 Glu Asn Thr Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
 515 520 525
 Glu Pro Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
 530 535 540
 Leu Asn Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Lys
 545 550 555 560
 His Ser Asn Ser Arg Ile Ile Leu Thr Asn Ser Ala Lys Glu Ala Leu
 565 570 575
 Leu Lys Pro Asn Ile Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Lys Tyr Ile Lys
 580 585 590
 Ala Ile Asn Lys Ala Val Glu Ala Val Thr Phe Val Asn Trp Ile Glu
 595 600 605
 Asn Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Asn Glu Val Ser Thr Met
 610 615 620
 Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Val Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
 625 630 635 640
 Leu Asn Ile Gly Asn Met Ile Tyr Lys Gly Glu Phe Val Glu Ala Ile
 645 650 655
 Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Ile Val Pro Glu Ile Ala
 660 665 670
 Leu Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Val Ser Asn Lys
 675 680 685
 Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
 690 695 700
 Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Ile
 705 710 715 720
 Val Asn Thr Gln Ile Asn Leu Ile Arg Glu Lys Met Lys Lys Ala Leu
 725 730 735
 Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
 740 745 750
 Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp

755	760	765
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Ser Ala Met Ile Asn Ile		
770	775	780
Asn Lys Phe Leu Asp Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met		
785	790	795
Ile Pro Tyr Ala Val Lys Arg Leu Lys Asp Phe Asp Ala Ser Val Arg		800
805	810	815
Asp Val Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly		
820	825	830
Gln Val Asn Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Ala Asp		
835	840	845
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Lys Lys Leu Leu Ser		
850	855	860
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Thr Asn Ala Ser Ile Leu Ser		
865	870	875
Ile Val Tyr Lys Asp Asp Asp Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Gly Ala		
885	890	895
Glu Ile Tyr Asn Gly Asp Lys Val Tyr Tyr Asn Ser Ile Asp Lys Asn		
900	905	910
Gln Ile Arg Leu Ile Asn Leu Glu Ser Ser Thr Ile Glu Val Ile Leu		
915	920	925
Lys Lys Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser		
930	935	940
Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn		
945	950	955
Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val		
965	970	975
Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Phe Gln Asp Thr Gln Glu		
980	985	990
Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser		
995	1000	1005
Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Ile		
1010	1015	1020
Thr Lys Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro		
1025	1030	1035
Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Lys Ile Met Phe Lys		
1045	1050	1055
Leu Asp Gly Cys Arg Asp Pro His Arg Tyr Ile Val Ile Lys Tyr Phe		
1060	1065	1070
Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Ser Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr		
1075	1080	1085
Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr		
1090	1095	1100
Leu Gln Tyr Asp Lys Ser Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn		
1105	1110	1115
Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu		
1125	1130	1135
Lys Gly Pro Arg Asp Asn Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser		
1140	1145	1150
Ser Leu Tyr Met Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly		
1155	1160	1165
Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val		
1170	1175	1180
Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala		
1185	1190	1195
Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn		
1205	1210	1215
Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr		
1220	1225	1230
Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly		
1235	1240	1245
Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser		
1250	1255	1260

Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys
 1265 1270 1275 1280
 Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Arg Glu Arg Pro Leu
 1285 1290 1295

<210> 5
 <211> 206
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20 25 30
 Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
 35 40 45
 Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
 50 55 60
 Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
 65 70 75 80
 Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
 85 90 95
 Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
 100 105 110
 Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
 115 120 125
 Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
 130 135 140
 Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
 145 150 155 160
 Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
 165 170 175
 Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
 180 185 190
 Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
 195 200 205

<210> 6
 <211> 206
 <212> ПРТ
 <213> homo sapiens

<400> 6
 Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20 25 30
 Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
 35 40 45
 Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
 50 55 60
 Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
 65 70 75 80
 Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
 85 90 95
 Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
 100 105 110
 Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
 115 120 125
 Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn

```

      130              135              140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145              150              155              160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
      165              170              175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
      180              185              190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
      195              200              205

```

<210> 7
 <211> 206
 <212> ПРТ
 <213> Макак-резус

```

<400> 7
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1      5      10      15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
      20      25      30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
      35      40      45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
      50      55      60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65      70      75      80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
      85      90      95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
      100      105      110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
      115      120      125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
      130      135      140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145      150      155      160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
      165      170      175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
      180      185      190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
      195      200      205

```

<210> 8
 <211> 206
 <212> ПРТ
 <213> Пацюк коричневий

```

<400> 8
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1      5      10      15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
      20      25      30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
      35      40      45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
      50      55      60
Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
65      70      75      80
Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
      85      90      95

```

```

Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
    100                      105                      110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
    115                      120                      125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130                      135                      140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
    145                      150                      155                      160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
    165                      170                      175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
    180                      185                      190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
    195                      200                      205

```

<210> 9
 <211> 206
 <212> ПРТ
 <213> Пацюк коричневий

```

<400> 9
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
  1      5      10      15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
  20      25      30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
  35      40      45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
  50      55      60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
  65      70      75      80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
  85      90      95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
  100      105      110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
  115      120      125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
  130      135      140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
  145      150      155                      160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
  165      170      175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
  180      185      190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
  195      200      205

```

<210> 10
 <211> 206
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

```

<400> 10
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
  1      5      10      15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
  20      25      30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
  35      40      45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met

```

```

      50              55              60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65              70              75              80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
      85              90              95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
      100              105              110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
      115              120              125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
      130              135              140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145              150              155              160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
      165              170              175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
      180              185              190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
      195              200              205

```

<210> 11
 <211> 206
 <212> ПРТ
 <213> Курка домашня

```

<400> 11
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1              5              10              15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
      20              25              30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
      35              40              45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
      50              55              60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65              70              75              80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
      85              90              95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
      100              105              110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
      115              120              125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
      130              135              140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145              150              155              160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
      165              170              175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
      180              185              190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
      195              200              205

```

<210> 12
 <211> 204
 <212> ПРТ
 <213> Карась золотистый

```

<400> 12
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Ser Asp Met Gln Gln
1              5              10              15

```



```

Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
      20      25      30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
      35      40      45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
      50      55      60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn Leu Asn Asp
      65      70      75      80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys Asn Lys Met Lys
      85      90      95
Ser Gly Gly Ser Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala
      100      105      110
Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser
      115      120      125
Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met
      130      135      140
Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu Arg His
      145      150      155      160
Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile
      165      170      175
Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu
      180      185      190
Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
      195      200

```

<210> 13
 <211> 203
 <212> ПРТ
 <213> Карась золотистый

```

<400> 13
Met Ala Asp Glu Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Thr Asp Met Gln Ala
  1      5      10      15
Arg Ala Asp Gln Leu Gly Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
      20      25      30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
      35      40      45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
      50      55      60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
      65      70      75      80
Leu Gly Asn Leu Cys Gly Leu Cys Pro Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
      85      90      95
Gly Gly Gly Gln Ser Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ser Ser
      100      105      110
Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser Gly
      115      120      125
Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met Asp
      130      135      140
Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg His Met
      145      150      155      160
Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile Asp
      165      170      175
Arg Ile Met Asp Met Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala
      180      185      190
Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
      195      200

```

<210> 14
 <211> 204
 <212> ПРТ

<213> Даною періо

<400> 14

```

Met Ala Glu Asp Ser Asp Met Arg Asn Glu Leu Ala Asp Met Gln Gln
 1           5           10           15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20           25           30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
 35           40           45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
 50           55           60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn Leu Asn Asp
 65           70           75           80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys Asn Lys Met Lys
 85           90           95
Ser Gly Ala Ser Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala
100           105           110
Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser
115           120           125
Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met
130           135           140
Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu Arg His
145           150           155           160
Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile
165           170           175
Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu
180           185           190
Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195           200

```

<210> 15

<211> 203

<212> ПРТ

<213> Даною періо

<400> 15

```

Met Ala Asp Glu Ser Asp Met Arg Asn Glu Leu Asn Asp Met Gln Ala
 1           5           10           15
Arg Ala Asp Gln Leu Gly Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20           25           30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
 35           40           45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
 50           55           60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
 65           70           75           80
Leu Gly Asn Leu Cys Gly Leu Cys Pro Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
 85           90           95
Gly Gly Gly Gln Ser Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ser Ser
100           105           110
Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser Gly
115           120           125
Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met Asp
130           135           140
Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg His Met
145           150           155           160
Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile Asp
165           170           175
Arg Ile Met Asp Met Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala
180           185           190
Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195           200

```

<210> 16
 <211> 210
 <212> ПРТ
 <213> Мармуровий електричний скат

<400> 16
 Met Glu Asn Ser Val Glu Asn Ser Met Asp Pro Arg Ser Glu Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Gln Arg Cys Ala Asp Gln Ile Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser
 20 25 30
 Thr Arg Arg Met Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile
 35 40 45
 Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile
 50 55 60
 Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys
 65 70 75 80
 Asn Leu Ser Asp Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys
 85 90 95
 Asn Lys Leu Lys Asn Phe Glu Ala Gly Gly Ala Tyr Lys Lys Val Trp
 100 105 110
 Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Met
 115 120 125
 Asp Asp Arg Glu Gln Met Ala Met Ser Gly Gly Tyr Ile Arg Arg Ile
 130 135 140
 Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met Glu Glu Asn Leu Asp Gln Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Ser Asn
 165 170 175
 Glu Ile Gly Ser Gln Asn Ala Gln Ile Asp Arg Ile Val Val Lys Gly
 180 185 190
 Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys
 195 200 205
 Met Leu
 210

<210> 17
 <211> 206
 <212> ПРТ
 <213> Африканська пазуриста жаба

<400> 17
 Met Ala Asp Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20 25 30
 Leu Gln Tyr Val Glu Gly Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
 35 40 45
 Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
 50 55 60
 Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
 65 70 75 80
 Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
 85 90 95
 Ser Ser Gly Ala Tyr Asn Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
 100 105 110
 Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
 115 120 125
 Ile Ser Gly Gly Phe Val Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Thr
 130 135 140
 Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu

145 150 155 160
 Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
 165 170 175
 Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Ala Arg Ile
 180 185 190
 Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
 195 200 205

<210> 18
 <211> 206
 <212> ПРТ
 <213> Африканська пазуриста жаба

<400> 18
 Met Ala Asp Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20 25 30
 Leu Gln Tyr Val Glu Gly Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
 35 40 45
 Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
 50 55 60
 Glu Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
 65 70 75 80
 Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
 85 90 95
 Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
 100 105 110
 Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
 115 120 125
 Ile Ser Gly Gly Phe Val Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Thr
 130 135 140
 Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu
 145 150 155 160
 Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
 165 170 175
 Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Ala Arg Ile
 180 185 190
 Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
 195 200 205

<210> 19
 <211> 212
 <212> ПРТ
 <213> Фіолетовий морський їжак

<400> 19
 Met Glu Asp Gln Asn Asp Met Asn Met Arg Ser Glu Leu Glu Glu Ile
 1 5 10 15
 Gln Met Gln Ser Asn Met Gln Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg
 20 25 30
 Arg Met Leu Gln Met Ala Glu Glu Ser Gln Asp Met Gly Ile Lys Thr
 35 40 45
 Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu Glu
 50 55 60
 Gly Met Asp Gln Ile Asn Thr Asp Met Arg Glu Ala Glu Lys Asn Leu
 65 70 75 80
 Thr Gly Leu Glu Lys Cys Cys Gly Ile Cys Val Cys Pro Trp Lys Lys
 85 90 95
 Leu Gly Asn Phe Glu Lys Gly Asp Asp Tyr Lys Lys Thr Trp Lys Gly
 100 105 110

```

Asn Asp Asp Gly Lys Val Asn Ser His Gln Pro Met Arg Met Glu Asp
    115                120                125
Asp Arg Asp Gly Cys Gly Gly Asn Ala Ser Met Ile Thr Arg Ile Thr
    130                135                140
Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met Asp Glu Asn Leu Thr Gln Val Ser
    145                150                155                160
Ser Ile Val Gly Asn Leu Arg His Met Ala Ile Asp Met Gln Ser Glu
    165                170                175
Ile Gly Ala Gln Asn Ser Gln Val Gly Arg Ile Thr Ser Lys Ala Glu
    180                185                190
Ser Asn Glu Gly Arg Ile Asn Ser Ala Asp Lys Arg Ala Lys Asn Ile
    195                200                205
Leu Arg Asn Lys
    210

```

<210> 20
 <211> 212
 <212> ПРТ
 <213> Дрозофіли

```

<400> 20
Met Pro Ala Asp Pro Ser Glu Glu Val Ala Pro Gln Val Pro Lys Thr
    1          5          10          15
Glu Leu Glu Glu Leu Gln Ile Asn Ala Gln Gly Val Ala Asp Glu Ser
    20          25          30
Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ala Leu Cys Glu Glu Ser Lys Glu
    35          40          45
Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val Ala Leu Asp Asp Gln Gly Glu Gln Leu
    50          55          60
Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Ala Asp Met Arg Glu
    65          70          75          80
Ala Glu Lys Asn Leu Ser Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Ile Cys Val
    85          90          95
Leu Pro Cys Asn Lys Ser Gln Ser Phe Lys Glu Asp Asp Gly Thr Trp
    100         105         110
Lys Gly Asn Asp Asp Gly Lys Val Val Asn Asn Gln Pro Gln Arg Val
    115         120         125
Met Asp Asp Arg Asn Gly Met Met Ala Gln Ala Gly Tyr Ile Gly Arg
    130         135         140
Ile Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met Glu Glu Asn Met Gly Gln
    145         150         155         160
Val Asn Thr Met Ile Gly Asn Leu Arg Asn Met Ala Leu Asp Met Gly
    165         170         175
Ser Glu Leu Glu Asn Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Asn Arg Lys
    180         185         190
Gly Glu Ser Asn Glu Ala Arg Ile Ala Val Ala Asn Gln Arg Ala His
    195         200         205
Gln Leu Leu Lys
    210

```

<210> 21
 <211> 212
 <212> ПРТ
 <213> Лікарські п'явки

```

<400> 21
Met Ala Lys Asp Ile Lys Pro Lys Pro Ala Asn Gly Arg Asp Ser Pro
    1          5          10          15
Thr Asp Leu Gln Glu Ile Gln Leu Gln Met Asn Ala Ile Thr Asp Asp
    20          25          30
Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ala Met Cys Glu Glu Ser Lys

```

```

      35          40          45
Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln
  50          55          60
Leu Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Gln Asp Met Arg
  65          70          75          80
Asp Ala Glu Lys Asn Leu Glu Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys
      85          90          95
Ile Leu Pro Trp Lys Arg Thr Lys Asn Phe Asp Lys Gly Ala Glu Trp
  100          105          110
Asn Lys Gly Asp Glu Gly Lys Val Asn Thr Asp Gly Pro Arg Leu Val
  115          120          125
Val Gly Asp Gly Asn Met Gly Pro Ser Gly Gly Phe Ile Thr Lys Ile
  130          135          140
Thr Asn Asp Ala Arg Glu Glu Glu Met Glu Gln Asn Met Gly Glu Val
  145          150          155          160
Ser Asn Met Ile Ser Asn Leu Arg Asn Met Ala Val Asp Met Gly Ser
      165          170          175
Glu Ile Asp Ser Gln Asn Arg Gln Val Asp Arg Ile Asn Asn Lys Met
      180          185          190
Thr Ser Asn Gln Leu Arg Ile Ser Asp Ala Asn Lys Arg Ala Ser Lys
      195          200          205
Leu Leu Lys Glu
  210

```

<210> 22
 <211> 212
 <212> ПРТ
 <213> Прибережний кальмар

```

<400> 22
Met Ser Ala Asn Gly Glu Val Glu Val Pro Lys Thr Glu Leu Glu Glu
  1          5          10          15
Ile Gln Gln Gln Cys Asn Gln Val Thr Asp Asp Ser Leu Glu Ser Thr
      20          25          30
Arg Arg Met Leu Asn Met Cys Glu Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ile Arg
      35          40          45
Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu
      50          55          60
Glu Gly Leu Asp Gln Ile Asn Gln Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn
      65          70          75          80
Leu Glu Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys Val Leu Pro Trp Lys
      85          90          95
Arg Gly Lys Ser Phe Glu Lys Ser Gly Asp Tyr Ala Asn Thr Trp Lys
      100          105          110
Lys Asp Asp Asp Gly Pro Thr Asn Thr Asn Gly Pro Arg Val Thr Val
      115          120          125
Gly Asp Gln Asn Gly Met Gly Pro Ser Ser Gly Tyr Val Thr Arg Ile
      130          135          140
Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Asp Met Glu Asn Asn Met Lys Glu Val
      145          150          155          160
Ser Ser Met Ile Gly Asn Leu Arg Asn Met Ala Ile Asp Met Gly Asn
      165          170          175
Glu Ile Gly Ser Gln Asn Arg Gln Val Asp Arg Ile Gln Gln Lys Ala
      180          185          190
Glu Ser Asn Glu Ser Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys Lys Ala Thr Lys
      195          200          205
Leu Leu Lys Asn
  210

```

<210> 23
 <211> 220

<212> ПРТ

<213> Ставковик

<400> 23

```

Met Thr Thr Asn Gly Glu Ile Leu Pro Val Gly Glu Glu Glu Glu Glu
 1      5      10      15
Glu Leu Gly Glu Asp Ala Leu Leu Arg Lys Gln Ile Asp Cys Asn Thr
      20      25      30
Asn Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ser Leu Cys Glu Glu
      35      40      45
Ser Lys Glu Ala Gly Ile Lys Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly
      50      55      60
Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Gly Gln Ile Asn Gln Asp
      65      70      75      80
Met Arg Asp Ala Glu Lys Asn Leu Glu Gly Leu Glu Lys Cys Cys Gly
      85      90      95
Leu Cys Val Leu Pro Trp Lys Arg Ser Lys Asn Phe Glu Lys Gly Ser
      100      105      110
Asp Tyr Asn Lys Thr Trp Lys Ala Ser Glu Asp Gly Lys Ile Asn Thr
      115      120      125
Asn Gly Pro Arg Leu Val Val Asp Gln Gly Asn Gly Ser Gly Pro Thr
      130      135      140
Gly Gly Tyr Ile Thr Arg Ile Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met
      145      150      155      160
Glu Gln Asn Ile Gly Glu Val Ala Gly Met Val Ser Asn Leu Arg Asn
      165      170      175
Met Ala Val Asp Met Gly Asn Glu Ile Glu Ser Gln Asn Lys Gln Leu
      180      185      190
Asp Arg Ile Asn Gln Lys Gly Gly Ser Leu Asn Val Arg Val Asp Glu
      195      200      205
Ala Asn Lys Arg Ala Asn Arg Ile Leu Arg Lys Gln
      210      215      220

```

<210> 24

<211> 207

<212> ПРТ

<213> Круглый червяк

<400> 24

```

Met Ser Gly Asp Asp Asp Ile Pro Glu Gly Leu Glu Ala Ile Asn Leu
 1      5      10      15
Lys Met Asn Ala Thr Thr Asp Asp Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
      20      25      30
Leu Ala Leu Cys Glu Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ile Lys Thr Leu Val
      35      40      45
Met Leu Asp Asp Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Cys Glu Gly Ala Leu
      50      55      60
Asp Thr Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Asp His Leu Lys Gly
      65      70      75      80
Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys Val Leu Pro Trp Asn Lys Thr Asp
      85      90      95
Asp Phe Glu Lys Thr Glu Phe Ala Lys Ala Trp Lys Lys Asp Asp Asp
      100      105      110
Gly Gly Val Ile Ser Asp Gln Pro Arg Ile Thr Val Gly Asp Ser Ser
      115      120      125
Met Gly Pro Gln Gly Gly Tyr Ile Thr Lys Ile Thr Asn Asp Ala Arg
      130      135      140
Glu Asp Glu Met Asp Glu Asn Val Gln Gln Val Ser Thr Met Val Gly
      145      150      155      160
Asn Leu Arg Asn Met Ala Ile Asp Met Ser Thr Glu Val Ser Asn Gln
      165      170      175
Asn Arg Gln Leu Asp Arg Ile His Asp Lys Ala Gln Ser Asn Glu Val

```

Arg Val Glu Ser Ala Asn Lys Arg Ala Lys Asn Leu Ile Thr Lys
180 185 190
195 200 205

<210> 25
<211> 808
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 25
Met Gly Ala Pro Ala Cys Ala Leu Ala Leu Cys Val Ala Val Ala Ile
1 5 10 15
Val Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val
20 25 30
Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln
35 40 45
Leu Val Phe Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro
50 55 60
Gly Gly Gly Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly
65 70 75 80
Leu Val Pro Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val
85 90 95
Leu Asn Ala Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg
100 105 110
Leu Thr Gln Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala
115 120 125
Pro Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr
130 135 140
Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp
145 150 155 160
Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys
165 170 175
Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly
180 185 190
Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His
195 200 205
Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly
210 215 220
Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr
225 230 235 240
Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
245 250 255
Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu
260 265 270
Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
275 280 285
Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro
290 295 300
Tyr Val Thr Val Leu Lys Ser Trp Ile Ser Glu Ser Val Glu Ala Asp
305 310 315 320
Val Arg Leu Arg Leu Ala Asn Val Ser Glu Arg Asp Gly Gly Glu Tyr
325 330 335
Leu Cys Arg Ala Thr Asn Phe Ile Gly Val Ala Glu Lys Ala Phe Trp
340 345 350
Leu Ser Val His Gly Pro Arg Ala Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala
355 360 365
Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Ile Leu Ser Tyr Gly Val Gly
370 375 380
Phe Phe Leu Phe Ile Leu Val Val Ala Ala Val Thr Leu Cys Arg Leu
385 390 395 400
Arg Ser Pro Pro Lys Lys Gly Leu Gly Ser Pro Thr Val His Lys Ile
405 410 415


```

Ser Arg Phe Pro Leu Lys Arg Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser
420 425 430
Met Ser Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly
435 440 445
Glu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp
450 455 460
Pro Lys Trp Glu Leu Ser Arg Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu
465 470 475 480
Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile
485 490 495
Asp Lys Asp Arg Ala Ala Lys Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu
500 505 510
Lys Asp Asp Ala Thr Asp Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met
515 520 525
Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu
530 535 540
Gly Ala Cys Thr Gln Gly Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala
545 550 555 560
Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly
565 570 575
Leu Asp Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr
580 585 590
Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu
595 600 605
Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
610 615 620
Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu
625 630 635 640
Ala Arg Asp Val His Asn Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly
645 650 655
Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val
660 665 670
Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu
675 680 685
Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu
690 695 700
Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn
705 710 715 720
Cys Thr His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala
725 730 735
Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg
740 745 750
Val Leu Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Pro
755 760 765
Phe Glu Gln Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser Ser Ser Ser
770 775 780
Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro Pro Ala Pro
785 790 795 800
Pro Ser Ser Gly Gly Ser Arg Thr
805

```

<210> 26
 <211> 806
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

```

<400> 26
Met Gly Ala Pro Ala Cys Ala Leu Ala Leu Cys Val Ala Val Ala Ile
1 5 10 15
Val Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val
20 25 30
Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln

```

			35						40						45					
Leu	Val	Phe	Gly	Ser	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	Cys	Pro	Pro	Pro					
	50					55					60									
Gly	Gly	Gly	Pro	Met	Gly	Pro	Thr	Val	Trp	Val	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly					
65					70					75					80					
Leu	Val	Pro	Ser	Glu	Arg	Val	Leu	Val	Gly	Pro	Gln	Arg	Leu	Gln	Val					
				85					90					95						
Leu	Asn	Ala	Ser	His	Glu	Asp	Ser	Gly	Ala	Tyr	Ser	Cys	Arg	Gln	Arg					
			100					105					110							
Leu	Thr	Gln	Arg	Val	Leu	Cys	His	Phe	Ser	Val	Arg	Val	Thr	Asp	Ala					
		115					120					125								
Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Asp	Thr					
	130					135					140									
Gly	Val	Asp	Thr	Gly	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Arg	Pro	Glu	Arg	Met	Asp					
145				150						155					160					
Lys	Lys	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Phe	Arg	Cys					
				165					170					175						
Pro	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly					
			180					185					190							
Arg	Glu	Phe	Arg	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His					
		195					200					205								
Gln	Gln	Trp	Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly					
	210				215						220									
Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Lys	Phe	Gly	Ser	Ile	Arg	Gln	Thr					
225				230					235						240					
Tyr	Thr	Leu	Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln					
			245						250					255						
Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Asp	Val	Glu					
			260					265					270							
Phe	His	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu					
	275						280					285								
Lys	His	Val	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Thr	Pro					
	290					295					300									
Tyr	Val	Thr	Val	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Ala	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu					
305				310						315					320					
Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Leu	His	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu					
				325					330					335						
Tyr	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Ser	His	His	Ser	Ala					
		340						345					350							
Trp	Leu	Val	Val	Leu	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Val	Glu	Ala	Asp	Glu					
	355						360					365								
Ala	Gly	Ser	Val	Tyr	Ala	Gly	Ile	Leu	Ser	Tyr	Gly	Val	Gly	Phe	Phe					
	370					375					380									
Leu																				

```

Cys Thr Gln Gly Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys
545          550          555          560
Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp
          565          570          575
Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys
          580          585          590
Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu
          595          600          605
Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu
          610          615          620
Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg
625          630          635
Asp Val His Asn Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu
          645          650          655
Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr
          660          665          670
His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe
          675          680          685
Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe
          690          695          700
Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr
705          710          715
His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser
          725          730          735
Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Val Leu
          740          745          750
Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Pro Phe Glu
          755          760          765
Gln Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser Ser Ser Ser Gly
          770          775          780
Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro Pro Ala Pro Pro Ser
785          790          795          800
Ser Gly Gly Ser Arg Thr
          805

```

```

<210> 27
<211> 694
<212> ПРТ
<213> Хомо сапиенс

```

```

<400> 27
Met Gly Ala Pro Ala Cys Ala Leu Ala Leu Cys Val Ala Val Ala Ile
1          5          10          15
Val Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val
          20          25          30
Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu
          35          40          45
Leu Val Phe Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro
          50          55          60
Gly Gly Gly Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly
65          70          75          80
Leu Val Pro Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val
          85          90          95
Leu Asn Ala Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg
          100          105          110
Leu Thr Gln Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala
          115          120          125
Pro Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr
          130          135          140
Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp
145          150          155          160
Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys

```

```

      165      170      175
Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly
      180      185      190
Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His
      195      200      205
Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly
      210      215      220
Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr
      225      230      235
Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
      245      250      255
Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu
      260      265      270
Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
      275      280      285
Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro
      290      295      300
Tyr Val Thr Val Leu Lys Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser Met Ser
      305      310      315
Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly
      325      330      335
Pro Thr Leu Ala Asn Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys
      340      345      350
Trp Glu Leu Ser Arg Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu
      355      360      365
Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys
      370      375      380
Asp Arg Ala Ala Lys Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp
      385      390      395
Asp Ala Thr Asp Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met
      405      410      415
Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala
      420      425      430
Cys Thr Gln Gly Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys
      435      440      445
Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu Asp
      450      455      460
Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys
      465      470      475
Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu
      485      490      495
Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu
      500      505      510
Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg
      515      520      525
Asp Val His Asn Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu
      530      535      540
Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr
      545      550      555
His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe
      565      570      575
Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe
      580      585      590
Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr
      595      600      605
His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser
      610      615      620
Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Val Leu
      625      630      635
Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Pro Phe Glu
      645      650      655
Gln Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser Ser Ser Ser Ser Gly
      660      665      670

```

Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro Pro Ala Pro Pro Ser
 675 680 685
 Ser Gly Gly Ser Arg Thr
 690

<210> 28
 <211> 604
 <212> HPT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Ala Gln Arg Arg Lys Glu Arg Glu Glu Leu Ala Gln Gln Tyr Glu Ala
 1 5 10 15
 Ile Leu Arg Glu Cys Gly His Gly Arg Phe Gln Trp Thr Leu Tyr Phe
 20 25 30
 Val Leu Gly Leu Ala Leu Met Ala Asp Gly Val Glu Val Phe Val Val
 35 40 45
 Gly Phe Val Leu Pro Ser Ala Glu Lys Asp Met Cys Leu Ser Asp Ser
 50 55 60
 Asn Lys Gly Met Leu Gly Leu Ile Val Tyr Leu Gly Met Met Val Gly
 65 70 75 80
 Ala Phe Leu Trp Gly Gly Leu Ala Asp Arg Leu Gly Arg Arg Gln Cys
 85 90 95
 Leu Leu Ile Ser Leu Ser Val Asn Ser Val Phe Ala Phe Phe Ser Ser
 100 105 110
 Phe Val Gln Gly Tyr Gly Thr Phe Leu Phe Cys Arg Leu Leu Ser Gly
 115 120 125
 Val Gly Ile Gly Gly Ser Ile Pro Ile Val Phe Ser Tyr Phe Ser Glu
 130 135 140
 Phe Leu Ala Gln Glu Lys Arg Gly Glu His Leu Ser Trp Leu Cys Met
 145 150 155 160
 Phe Trp Met Ile Gly Gly Val Tyr Ala Ala Met Ala Trp Ala Ile
 165 170 175
 Ile Pro His Tyr Gly Trp Ser Phe Gln Met Gly Ser Ala Tyr Gln Phe
 180 185 190
 His Ser Trp Arg Val Phe Val Leu Val Cys Ala Phe Pro Ser Val Phe
 195 200 205
 Ala Ile Gly Ala Leu Thr Thr Gln Pro Glu Ser Pro Arg Phe Phe Leu
 210 215 220
 Glu Asn Gly Lys His Asp Glu Ala Trp Met Val Leu Lys Gln Val His
 225 230 235 240
 Asp Thr Asn Met Arg Ala Lys Gly His Pro Glu Arg Val Phe Ser Val
 245 250 255
 Thr His Ile Lys Thr Ile His Gln Glu Asp Glu Leu Ile Glu Ile Gln
 260 265 270
 Ser Asp Thr Gly Thr Trp Tyr Gln Arg Trp Gly Val Arg Ala Leu Ser
 275 280 285
 Leu Gly Gly Gln Val Trp Gly Asn Phe Leu Ser Cys Phe Gly Pro Glu
 290 295 300
 Tyr Arg Arg Ile Thr Leu Met Met Gly Val Trp Phe Thr Met Ser
 305 310 315 320
 Phe Ser Tyr Tyr Gly Leu Thr Val Trp Phe Pro Asp Met Ile Arg His
 325 330 335
 Leu Gln Ala Val Asp Tyr Ala Ser Arg Thr Lys Val Phe Pro Gly Glu
 340 345 350
 Arg Val Glu His Val Thr Phe Asn Phe Thr Leu Glu Asn Gln Ile His
 355 360 365
 Arg Gly Gly Gln Tyr Phe Asn Asp Lys Phe Ile Gly Leu Arg Leu Lys
 370 375 380
 Ser Val Ser Phe Glu Asp Ser Leu Phe Glu Glu Cys Tyr Phe Glu Asp
 385 390 395 400
 Val Thr Ser Ser Asn Thr Phe Phe Arg Asn Cys Thr Phe Ile Asn Thr

```

          405          410          415
Val Phe Tyr Asn Thr Asp Leu Phe Glu Tyr Lys Phe Val Asn Ser Arg
          420          425          430
Leu Ile Asn Ser Thr Phe Leu His Asn Lys Glu Gly Cys Pro Leu Asp
          435          440          445
Val Thr Gly Thr Gly Glu Gly Ala Tyr Met Val Tyr Phe Val Ser Phe
          450          455          460
Leu Gly Thr Leu Ala Val Leu Pro Gly Asn Ile Val Ser Ala Leu Leu
          465          470          475          480
Met Asp Lys Ile Gly Arg Leu Arg Met Leu Ala Gly Ser Ser Val Met
          485          490          495
Ser Cys Val Ser Cys Phe Phe Leu Ser Phe Gly Asn Ser Glu Ser Ala
          500          505          510
Met Ile Ala Leu Leu Cys Leu Phe Gly Gly Val Ser Ile Ala Ser Trp
          515          520          525
Asn Ala Leu Asp Val Leu Thr Val Glu Leu Tyr Pro Ser Asp Lys Arg
          530          535          540
Thr Thr Ala Phe Gly Phe Leu Asn Ala Leu Cys Lys Leu Ala Ala Val
          545          550          555          560
Leu Gly Ile Ser Ile Phe Thr Ser Phe Val Gly Ile Thr Lys Ala Ala
          565          570          575
Pro Ile Leu Phe Ala Ser Ala Ala Leu Ala Leu Gly Ser Ser Leu Ala
          580          585          590
Leu Lys Leu Pro Glu Thr Arg Gly Gln Val Leu Gln
          595          600

```

<210> 29
 <211> 683
 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens

```

<400> 29
Met Asp Asp Tyr Lys Tyr Gln Asp Asn Tyr Gly Gly Tyr Ala Pro Ser
  1          5          10          15
Asp Gly Tyr Tyr Arg Gly Asn Glu Ser Asn Pro Glu Glu Asp Ala Gln
          20          25          30
Ser Asp Val Thr Glu Gly His Asp Glu Glu Asp Glu Ile Tyr Glu Gly
          35          40          45
Glu Tyr Gln Gly Ile Pro His Pro Asp Asp Val Lys Ala Lys Gln Ala
          50          55          60
Lys Met Ala Pro Ser Arg Met Asp Ser Leu Arg Gly Gln Thr Asp Leu
          65          70          75          80
Met Ala Glu Arg Leu Glu Asp Glu Glu Gln Leu Ala His Gln Tyr Glu
          85          90          95
Thr Ile Met Asp Glu Cys Gly His Gly Arg Phe Gln Trp Ile Leu Phe
          100          105          110
Phe Val Leu Gly Leu Ala Leu Met Ala Asp Gly Val Glu Val Phe Val
          115          120          125
Val Ser Phe Ala Leu Pro Ser Ala Glu Lys Asp Met Cys Leu Ser Ser
          130          135          140
Ser Lys Lys Gly Met Leu Gly Met Ile Val Tyr Leu Gly Met Met Ala
          145          150          155          160
Gly Ala Phe Ile Leu Gly Gly Leu Ala Asp Lys Leu Gly Arg Lys Arg
          165          170          175
Val Leu Ser Met Ser Leu Ala Val Asn Ala Ser Phe Ala Ser Leu Ser
          180          185          190
Ser Phe Val Gln Gly Tyr Gly Ala Phe Leu Phe Cys Arg Leu Ile Ser
          195          200          205
Gly Ile Gly Ile Gly Gly Ala Leu Pro Ile Val Phe Ala Tyr Phe Ser
          210          215          220
Glu Phe Leu Ser Arg Glu Lys Arg Gly Glu His Leu Ser Trp Leu Gly
          225          230          235          240

```

```

Ile Phe Trp Met Thr Gly Gly Leu Tyr Ala Ser Ala Met Ala Trp Ser
      245                250                255
Ile Ile Pro His Tyr Gly Trp Gly Phe Ser Met Gly Thr Asn Tyr His
      260                265                270
Phe His Ser Trp Arg Val Phe Val Ile Val Cys Ala Leu Pro Cys Thr
      275                280                285
Val Ser Met Val Ala Leu Lys Phe Met Pro Glu Ser Pro Arg Phe Leu
      290                295                300
Leu Glu Met Gly Lys His Asp Glu Ala Trp Met Ile Leu Lys Gln Val
305      310                315                320
His Asp Thr Asn Met Arg Ala Lys Gly Thr Pro Glu Lys Val Phe Thr
      325                330                335
Val Ser Asn Ile Lys Thr Pro Lys Gln Met Asp Glu Phe Ile Glu Ile
      340                345                350
Gln Ser Ser Thr Gly Thr Trp Tyr Gln Arg Trp Leu Val Arg Phe Lys
      355                360                365
Thr Ile Phe Lys Gln Val Trp Asp Asn Ala Leu Tyr Cys Val Met Gly
      370                375                380
Pro Tyr Arg Met Asn Thr Leu Ile Leu Ala Val Val Trp Phe Ala Met
385      390                395                400
Ala Phe Ser Tyr Tyr Gly Leu Thr Val Trp Phe Pro Asp Met Ile Arg
      405                410                415
Tyr Phe Gln Asp Glu Glu Tyr Lys Ser Lys Met Lys Val Phe Phe Gly
      420                425                430
Glu His Val Tyr Gly Ala Thr Ile Asn Phe Thr Met Glu Asn Gln Ile
      435                440                445
His Gln His Gly Lys Leu Val Asn Asp Lys Phe Thr Arg Met Tyr Phe
      450                455                460
Lys His Val Leu Phe Glu Asp Thr Phe Phe Asp Glu Cys Tyr Phe Glu
465      470                475                480
Asp Val Thr Ser Thr Asp Thr Tyr Phe Lys Asn Cys Thr Ile Glu Ser
      485                490                495
Thr Ile Phe Tyr Asn Thr Asp Leu Tyr Glu His Lys Phe Ile Asn Cys
      500                505                510
Arg Phe Ile Asn Ser Thr Phe Leu Glu Gln Lys Glu Gly Cys His Met
      515                520                525
Asp Leu Glu Gln Asp Asn Asp Phe Leu Ile Tyr Leu Val Ser Phe Leu
      530                535                540
Gly Ser Leu Ser Val Leu Pro Gly Asn Ile Ile Ser Ala Leu Leu Met
545      550                555                560
Asp Arg Ile Gly Arg Leu Lys Met Ile Gly Gly Ser Met Leu Ile Ser
      565                570                575
Ala Val Cys Cys Phe Phe Leu Phe Phe Gly Asn Ser Glu Ser Ala Met
      580                585                590
Ile Gly Trp Gln Cys Leu Phe Cys Gly Thr Ser Ile Ala Ala Trp Asn
      595                600                605
Ala Leu Asp Val Ile Thr Val Glu Leu Tyr Pro Thr Asn Gln Arg Ala
      610                615                620
Thr Ala Phe Gly Ile Leu Asn Gly Leu Cys Lys Phe Gly Ala Ile Leu
625      630                635                640
Gly Asn Thr Ile Phe Ala Ser Phe Val Gly Ile Thr Lys Val Val Pro
      645                650                655
Ile Leu Leu Ala Ala Ala Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu Ile Ala Leu
      660                665                670
Arg Leu Pro Glu Thr Arg Glu Gln Val Leu Ile
      675                680

```

```

<210> 30
<211> 727
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

```

<400> 30

```

Met Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Arg Thr Ser Leu Met Lys Gly Ala Lys
 1          5          10          15
Asp Ile Ala Arg Glu Val Lys Lys Gln Thr Val Lys Lys Val Asn Gln
          20          25          30
Ala Val Asp Arg Ala Gln Asp Glu Tyr Thr Gln Arg Ser Tyr Ser Arg
          35          40          45
Phe Gln Asp Glu Glu Asp Asp Asp Tyr Tyr Pro Ala Gly Glu Thr
          50          55          60
Tyr Asn Gly Glu Ala Asn Asp Asp Glu Gly Ser Ser Glu Ala Thr Glu
          65          70          75          80
Gly His Asp Glu Asp Asp Glu Ile Tyr Glu Gly Glu Tyr Gln Gly Ile
          85          90          95
Pro Ser Met Asn Gln Ala Lys Asp Ser Ile Val Ser Val Gly Gln Pro
          100          105          110
Lys Gly Asp Glu Tyr Lys Asp Arg Arg Glu Leu Glu Ser Glu Arg Arg
          115          120          125
Ala Asp Glu Glu Glu Leu Ala Gln Gln Tyr Glu Leu Ile Ile Gln Glu
          130          135          140
Cys Gly His Gly Arg Phe Gln Trp Ala Leu Phe Phe Val Leu Gly Met
          145          150          155          160
Ala Leu Met Ala Asp Gly Val Glu Val Phe Val Val Gly Phe Val Leu
          165          170          175
Pro Ser Ala Glu Thr Asp Leu Cys Ile Pro Asn Ser Gly Ser Gly Trp
          180          185          190
Leu Gly Ser Ile Val Tyr Leu Gly Met Met Val Gly Ala Phe Phe Trp
          195          200          205
Gly Gly Leu Ala Asp Lys Val Gly Arg Lys Gln Ser Leu Leu Ile Cys
          210          215          220
Met Ser Val Asn Gly Phe Phe Ala Phe Leu Ser Ser Phe Val Gln Gly
          225          230          235          240
Tyr Gly Phe Phe Leu Phe Cys Arg Leu Leu Ser Gly Phe Gly Ile Gly
          245          250          255
Gly Ala Ile Pro Thr Val Phe Ser Tyr Phe Ala Glu Val Leu Ala Arg
          260          265          270
Glu Lys Arg Gly Glu His Leu Ser Trp Leu Cys Met Phe Trp Met Ile
          275          280          285
Gly Gly Ile Tyr Ala Ser Ala Met Ala Trp Ala Ile Ile Pro His Tyr
          290          295          300
Gly Trp Ser Phe Ser Met Gly Ser Ala Tyr Gln Phe His Ser Trp Arg
          305          310          315          320
Val Phe Val Ile Val Cys Ala Leu Pro Cys Val Ser Ser Val Val Ala
          325          330          335
Leu Thr Phe Met Pro Glu Ser Pro Arg Phe Leu Leu Glu Val Gly Lys
          340          345          350
His Asp Glu Ala Trp Met Ile Leu Lys Leu Ile His Asp Thr Asn Met
          355          360          365
Arg Ala Arg Gly Gln Pro Glu Lys Val Phe Thr Val Asn Lys Ile Lys
          370          375          380
Thr Pro Lys Gln Ile Asp Glu Leu Ile Glu Ile Glu Ser Asp Thr Gly
          385          390          395          400
Thr Trp Tyr Arg Arg Cys Phe Val Arg Ile Arg Thr Glu Leu Tyr Gly
          405          410          415
Ile Trp Leu Thr Phe Met Arg Cys Phe Asn Tyr Pro Val Arg Asp Asn
          420          425          430
Thr Ile Lys Leu Thr Ile Val Trp Phe Thr Leu Ser Phe Gly Tyr Tyr
          435          440          445
Gly Leu Ser Val Trp Phe Pro Asp Val Ile Lys Pro Leu Gln Ser Asp
          450          455          460
Glu Tyr Ala Leu Leu Thr Arg Asn Val Glu Arg Asp Lys Tyr Ala Asn
          465          470          475          480
Phe Thr Ile Asn Phe Thr Met Glu Asn Gln Ile His Thr Gly Met Glu
          485          490          495

```



```

Tyr Asp Asn Gly Arg Phe Ile Gly Val Lys Phe Lys Ser Val Thr Phe
      500      505      510
Lys Asp Ser Val Phe Lys Ser Cys Thr Phe Glu Asp Val Thr Ser Val
      515      520      525
Asn Thr Tyr Phe Lys Asn Cys Thr Phe Ile Asp Thr Val Phe Asp Asn
      530      535      540
Thr Asp Phe Glu Pro Tyr Lys Phe Ile Asp Ser Glu Phe Lys Asn Cys
545      550      555      560
Ser Phe Phe His Asn Lys Thr Gly Cys Gln Ile Thr Phe Asp Asp Asp
      565      570      575
Tyr Ser Ala Tyr Trp Ile Tyr Phe Val Asn Phe Leu Gly Thr Leu Ala
      580      585      590
Val Leu Pro Gly Asn Ile Val Ser Ala Leu Leu Met Asp Arg Ile Gly
      595      600      605
Arg Leu Thr Met Leu Gly Gly Ser Met Val Leu Ser Gly Ile Ser Cys
      610      615      620
Phe Phe Leu Trp Phe Gly Thr Ser Glu Ser Met Met Ile Gly Met Leu
625      630      635      640
Cys Leu Tyr Asn Gly Leu Thr Ile Ser Ala Trp Asn Ser Leu Asp Val
      645      650      655
Val Thr Val Glu Leu Tyr Pro Thr Asp Arg Arg Ala Thr Gly Phe Gly
      660      665      670
Phe Leu Asn Ala Leu Cys Lys Ala Ala Ala Val Leu Gly Asn Leu Ile
      675      680      685
Phe Gly Ser Leu Val Ser Ile Thr Lys Ser Ile Pro Ile Leu Leu Ala
      690      695      700
Ser Thr Val Leu Val Cys Gly Gly Leu Val Gly Leu Cys Leu Pro Asp
705      710      715      720
Thr Arg Thr Gln Val Leu Met
      725

```

<210> 31
 <211> 742
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 31
Met Glu Glu Gly Phe Arg Asp Arg Ala Ala Phe Ile Arg Gly Ala Lys
 1      5      10      15
Asp Ile Ala Lys Glu Val Lys Lys His Ala Ala Lys Lys Val Val Lys
      20      25      30
Gly Leu Asp Arg Val Gln Asp Glu Tyr Ser Arg Arg Ser Tyr Ser Arg
      35      40      45
Phe Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Phe Pro Ala Pro Ser Asp Gly
      50      55      60
Tyr Tyr Arg Gly Glu Gly Thr Gln Asp Glu Glu Gly Gly Ala Ser
65      70      75      80
Ser Asp Ala Thr Glu Gly His Asp Glu Asp Asp Glu Ile Tyr Glu Gly
      85      90      95
Glu Tyr Gln Asp Ile Pro Arg Ala Glu Ser Gly Gly Lys Gly Glu Arg
      100      105      110
Met Ala Asp Gly Ala Pro Leu Ala Gly Val Arg Gly Gly Leu Ser Asp
      115      120      125
Gly Glu Gly Pro Pro Gly Gly Arg Gly Glu Ala Gln Arg Arg Lys Glu
      130      135      140
Arg Glu Glu Leu Ala Gln Gln Tyr Glu Ala Ile Leu Arg Glu Cys Gly
145      150      155      160
His Gly Arg Phe Gln Trp Thr Leu Tyr Phe Val Leu Gly Leu Ala Leu
      165      170      175
Met Ala Asp Gly Val Glu Val Phe Val Val Gly Phe Val Leu Pro Ser
      180      185      190
Ala Glu Lys Asp Met Cys Leu Ser Asp Ser Asn Lys Gly Met Leu Gly

```

```

      195              200              205
Leu Ile Val Tyr Leu Gly Met Met Val Gly Ala Phe Leu Trp Gly Gly
  210              215              220
Leu Ala Asp Arg Leu Gly Arg Arg Gln Cys Leu Leu Ile Ser Leu Ser
  225              230              235              240
Val Asn Ser Val Phe Ala Phe Phe Ser Ser Phe Val Gln Gly Tyr Gly
      245              250              255
Thr Phe Leu Phe Cys Arg Leu Leu Ser Gly Val Gly Ile Gly Gly Ser
      260              265              270
Ile Pro Ile Val Phe Ser Tyr Phe Ser Glu Phe Leu Ala Gln Glu Lys
      275              280              285
Arg Gly Glu His Leu Ser Trp Leu Cys Met Phe Trp Met Ile Gly Gly
  290              295              300
Val Tyr Ala Ala Ala Met Ala Trp Ala Ile Ile Pro His Tyr Gly Trp
  305              310              315              320
Ser Phe Gln Met Gly Ser Ala Tyr Gln Phe His Ser Trp Arg Val Phe
      325              330              335
Val Leu Val Cys Ala Phe Pro Ser Val Phe Ala Ile Gly Ala Leu Thr
      340              345              350
Thr Gln Pro Glu Ser Pro Arg Phe Phe Leu Glu Asn Gly Lys His Asp
      355              360              365
Glu Ala Trp Met Val Leu Lys Gln Val His Asp Thr Asn Met Arg Ala
  370              375              380
Lys Gly His Pro Glu Arg Val Phe Ser Val Thr His Ile Lys Thr Ile
  385              390              395              400
His Gln Glu Asp Glu Leu Ile Glu Ile Gln Ser Asp Thr Gly Thr Trp
      405              410              415
Tyr Gln Arg Trp Gly Val Arg Ala Leu Ser Leu Gly Gly Gln Val Trp
  420              425              430
Gly Asn Phe Leu Ser Cys Phe Gly Pro Glu Tyr Arg Arg Ile Thr Leu
  435              440              445
Met Met Met Gly Val Trp Phe Thr Met Ser Phe Ser Tyr Tyr Gly Leu
  450              455              460
Thr Val Trp Phe Pro Asp Met Ile Arg His Leu Gln Ala Val Asp Tyr
  465              470              475              480
Ala Ser Arg Thr Lys Val Phe Pro Gly Glu Arg Val Gly His Val Thr
      485              490              495
Phe Asn Phe Thr Leu Glu Asn Gln Ile His Arg Gly Gly Gln Tyr Phe
  500              505              510
Asn Asp Lys Phe Ile Gly Leu Arg Leu Lys Ser Val Ser Phe Glu Asp
  515              520              525
Ser Leu Phe Glu Glu Cys Tyr Phe Glu Asp Val Thr Ser Ser Asn Thr
  530              535              540
Phe Phe Arg Asn Cys Thr Phe Ile Asn Thr Val Phe Tyr Asn Thr Asp
  545              550              555              560
Leu Phe Glu Tyr Lys Phe Val Asn Ser Arg Leu Ile Asn Ser Thr Phe
      565              570              575
Leu His Asn Lys Glu Gly Cys Pro Leu Asp Val Thr Gly Thr Gly Glu
  580              585              590
Gly Ala Tyr Met Val Tyr Phe Val Ser Phe Leu Gly Thr Leu Ala Val
  595              600              605
Leu Pro Gly Asn Ile Val Ser Ala Leu Leu Met Asp Lys Ile Gly Arg
  610              615              620
Leu Arg Met Leu Ala Gly Ser Ser Val Met Ser Cys Val Ser Cys Phe
  625              630              635              640
Phe Leu Ser Phe Gly Asn Ser Glu Ser Ala Met Ile Ala Leu Leu Cys
      645              650              655
Leu Phe Gly Gly Val Ser Ile Ala Ser Trp Asn Ala Leu Asp Val Leu
  660              665              670
Thr Val Glu Leu Tyr Pro Ser Asp Lys Arg Thr Thr Ala Phe Gly Phe
  675              680              685
Leu Asn Ala Leu Cys Lys Leu Ala Ala Val Leu Gly Ile Ser Ile Phe
  690              695              700

```

Thr Ser Phe Val Gly Ile Thr Lys Ala Ala Pro Ile Leu Phe Ala Ser
 705 710 715 720
 Ala Ala Leu Ala Leu Gly Ser Ser Leu Ala Leu Lys Leu Pro Glu Thr
 725 730 735
 Arg Gly Gln Val Leu Gln
 740

<210> 32
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
 в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
 розчеплювана ділянка

<400> 32
 Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5

<210> 33
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
 в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
 розчеплювана ділянка

<400> 33
 Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
 в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
 розчеплювана ділянка

<400> 34
 Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5

<210> 35
 <211> 10
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
 в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
 розчеплювана ділянка

<400> 35
 Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5 10

<210> 36
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
 в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
 розчеплювана ділянка

<400> 36
 Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5 10

<210> 37
 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
 в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
 розчеплювана ділянка

<400> 37
 Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5 10

<210> 38
 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
 в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
 розчеплювана ділянка

<221> SITE
 <222> (13)...(13)
 <223> карбоксильний глютамід

<400> 38
 Cys Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5 10

<210> 39
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
 в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
 розчеплювана ділянка

<400> 39
Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5

<210> 40
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Неприродна послідовність

<220>
<223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
розчеплювана ділянка

<400> 40
Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Неприродна послідовність

<220>
<223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
розчеплювана ділянка

<400> 41
Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5

<210> 42
<211> 10
<212> ПРТ
<213> Неприродна послідовність

<220>
<223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
розчеплювана ділянка

<400> 42
Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 43
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Неприродна послідовність

<220>
<223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
розчеплювана ділянка

<400> 43

Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 44
<211> 12
<212> PPT
<213> Неприродна послідовність

<220>
<223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
в P1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
розчеплювана ділянка

<400> 44
Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 45
<211> 13
<212> PPT
<213> Неприродна послідовність

<220>
<223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
в P1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
розчеплювана ділянка

<221> SITE
<222> (13)...(13)
<223> Carboxylated lysine

<400> 45
Cys Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 46
<211> 11
<212> PPT
<213> Неприродна послідовність

<220>
<223> SNAP-25 антиген

<400> 46
Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5 10

<210> 47
<211> 11
<212> PPT
<213> Неприродна послідовність

<220>
<223> SNAP-25 антиген

<400> 47
Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 48
 <211> 88
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> BirA-HisTag@-SNAP-25-134-197

<400> 48
 Met Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
 1 5 10 15
 His His His His His His His Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala
 20 25 30
 Arg Glu Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile
 35 40 45
 Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr
 50 55 60
 Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys
 65 70 75 80
 Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 85

<210> 49
 <211> 97
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> BirA-HisTag@-SNAP-25-134-206

<400> 49
 Met Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
 1 5 10 15
 His His His His His His His Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala
 20 25 30
 Arg Glu Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile
 35 40 45
 Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr
 50 55 60
 Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys
 65 70 75 80
 Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser
 85 90 95
 Gly

<210> 50
 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> BirA пептид

<400> 50
 Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
 1 5 10 15

<210> 51

<211> 7570
 <212> ДНК
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC конструкція вираження.

<400> 51
 gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggtcgactct cagtacaato tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgatc 240
 catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
 gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacggggtc attagtccat agcccatata 360
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 420
 ccgcgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480
 attgacgtca atgggtggag tatttcgggt aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt 540
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcttgccatt 600
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 660
 tcgctattac catggtgatg cgtttttggc agtacatcaa tggcggtgga tagcggtttg 720
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 780
 aaaatcaacg ggacttttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggcg 840
 gtaggcggtg acggtggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900
 cctggagacg ccatccagcg tgttttgacc tccatagaag acaccgggac ccatccagcc 960
 tccgcggggc accatggagg gcccggttac cgttaccgga tccagatata tggcgggccg 1020
 ctacgcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaggag aagaactctt 1080
 cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatgggtgat gttaacggcc acaagtcttc 1140
 tgtcagtgga gaggtgaa gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga agttcatctg 1200
 cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
 tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gactttttca agagtgccat 1320
 gccggaaggt tatgtacagg aaaggacctt cttcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380
 acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac ccttggttaat agaatcgagt taaagggtat 1440
 tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
 caatgtatag atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagaccgg 1560
 ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagacctt tatcaacaaa atactccaat 1620
 tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaa ctgccctttc 1680
 gaaagatccc aatgcctatt atgaaatgag ggtcctctct gagtttgtaa cagctgctgg 1740
 gattacacat ggcgtggttg aactgtacaa catcgatgga ggcgagggtg gaccttttgt 1800
 taataaaca ttttaattata aagatcctgt aaatgggtgt gatattgctt atataaaaa 1860
 tccaaatgca ggacaaatgc aaccagtaaa agctttttaa attcataata aaatatgggt 1920
 tattccagaa agagatacat ttacaaatcc tgaagaagga gatttaaatc caccaccaga 1980
 agcaaaacaa gttccagttt catattatga ttcaacatat ttaagtacag ataataaaaa 2040
 agataattat ttaaaaggag ttacaaaatt atttgagaga atttattcaa ctgatcttgg 2100
 aagaatgttg ttaacatcaa tagtaagggg aataccattt tgggggtgaa gtacaataga 2160
 tacagaatta aaagtatttg atactaattg tattaatgtg atacaaccag atggtagtta 2220
 tagatcagaa gaacttaatc tagtaataat aggaccctca gctgatatta tacagtttga 2280
 atgtaaaagc tttggacatg aagttttgaa tcttacgcga aatgggtatg gctctactca 2340
 atacattaga tttagccagc attttacatt tggttttgag gagtcaactg aagttgatac 2400
 aaatcctctt ttagggtcag gcaaatttgc tacagatcca gcagtaacat tagcacatga 2460
 acttatacat gctggacata gattatattg aatagcaatt aatccaaata gggtttttaa 2520
 agtaaatact aatgcctatt atgaaatgag tgggttagaa gtaagctttg aggaacttag 2580
 aacatttggg ggacatgatg caaagtttat agatagttta caggaaaaag aatttcgtct 2640
 atattattat aataagttta aagatatagc aagtacactt aataaagcta aatcaatagt 2700
 aggtactact gcttcattac agtatatgaa aaatgttttt aaagagaaat atctctatc 2760
 tgaagataca tctggaaaat ttctcgtaga taaattaaaa tttgataagt tatacaaaat 2820
 gttacacagag atttacaagc aggataattt tgttaagttt tttaaagtac ttaacagaaa 2880
 aacatatttg aattttgata aagccgtatt taagataaat atagtacctt aggtaaaatta 2940
 cacaatatat gatggattta atttaagaaa tacaatttta gcagcaaaact ttaatggtca 3000
 aaatacagaa attaataata tgaattttac taaactaaaa aattttactg gattgtttga 3060
 attttataag ttgctatgtg taagagggat aatcacttcg aaatgaacgc gttggcccta 3120
 ttctatagtg tcacctaagt gctagagctc gctgatcagc ctgcactgtg ccttctagtt 3180
 gccagccatc tgtgttttgc cctcccccgc tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc 3240
 ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 3300

ctattctggg	gggtgggggtg	gggcaggaca	gcaaggggga	ggattgggaa	gacaatagca	3360
ggcatgctgg	ggatgcgggtg	ggctctatgg	cttctgaggc	ggaaaagaacc	agctggggct	3420
ctagggggta	tccccacgcg	ccctgtagcg	gcgcatthaag	cgcggcggggt	gtgggtggta	3480
cgcgcagcgt	gaccgctaca	cttgccagcg	ccctagcgcc	cgtccctttc	gctttcttcc	3540
cttcctttct	cgccacgttc	gccggctttc	cccgtaaacg	tctaaatcgg	ggcatccctt	3600
taggggtccg	atttagtgct	ttacggcacc	tcgaccccaa	aaaacttgat	taggggtgatg	3660
gttccagtag	tgggccatcg	ccctgataga	cgggttttcg	ccctttgacg	ttggagtcca	3720
cgttctttta	tagtggactc	ttgttccaaa	ctggaacaac	actcaaccct	atctcggctct	3780
attcttttga	tttataaggg	attttgggga	tttcggccta	ttggttaaaa	aatgagctga	3840
tttaacaaaa	atttaacgcg	aattaattct	gtggaatgtg	tgtcagttag	ggtgtggaaa	3900
gtccccaggc	tccccaggca	ggcagaagta	tgcaaagcat	gcattctcaat	tagtcagcaa	3960
ccaggtgtgg	aaagtcccca	ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	4020
attagtcagc	aaccatagtc	ccgcccctaa	ctccgcccct	cccgccccta	actccgcccc	4080
gttcgcgcca	ttctcgcgcc	catggctgac	taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	4140
ccgcctctgc	ctctgagcta	ttccagaagt	agtgaggagg	cttttttggg	ggcctaggct	4200
tttgcaaaaa	gctcccgga	gcttgatat	ccattttcgg	atctgatcaa	gagacaggat	4260
gaggatcggt	tcgcatgatt	gaacaagatg	gattgcacgc	aggttctccg	gccgcttggg	4320
tggagaggct	attcgcgtat	gactgggcac	aacagacaat	cggctgctct	gatgccgcgg	4380
tgttcgggtc	aatgcggcag	ggcgcccg	ttctttttgt	caagaccgac	ctgtccggtg	4440
ccctgaatga	actgcaggac	gaggcagcgc	ggctatcgtg	gctggccacg	acggggcgttc	4500
cttcgcgagc	tgtgctcgac	gttgctcactg	aagcgggaag	ggactggtcg	ctattgggcg	4560
aagtgcgggg	gcaggatctc	ctgtcatctc	accttgctcc	tgccgagaaa	gtatccatca	4620
tggctgatgc	ctgcatacgc	ttgatccggc	ttgatccggc	tacctgcccc	ttcgaccacc	4680
aagcgaacaa	tcgcatcgag	cgagcacgta	ctcgatgga	agccggtctt	gtcgatcagg	4740
atgatctgga	cgaagagcat	caggggctcg	cgccagccga	actgttcgcc	aggctcaagg	4800
cgcgcatgcc	cgacggcgag	gatctcgtcg	tgaccatagg	cgatgcctgc	ttgcogaata	4860
tcatggtgga	aaatggccgc	ttttctggat	tcacgactg	tggccggtcg	ggtgtggcgg	4920
accgctatca	ggacatagcg	ttggttaccc	gtgatattgc	tgaagagctt	ggcggcgaat	4980
gggtgaccg	cttctcgtg	ctttacggtg	tcgcgcgtcc	cgattcgcag	cgcctcgcct	5040
tctatcgctc	tcttgacgag	ttcttctgag	cgggactctg	gggttcgaaa	tgaccgacca	5100
agcgacgccc	aaactgccat	cacgagattt	cgattccacc	gccgccttct	atgaaagggt	5160
gggtctcgga	atcggttttc	gggacgccgg	ctggatgac	ctccagcgcg	gggatctcat	5220
gctggagttc	ttcgccaccc	ccaacttggt	tattgcagct	tataatggtt	acaaataaag	5280
caatagcatc	acaaatttca	caaataaagc	atttttttca	ctgcattcta	ggtgtgggtt	5340
gtccaaactc	atcaatgtat	cttatcatgt	ctgtataccg	tcgacctota	gctagagctt	5400
ggcgtaatca	tggtcatagc	tgtttcctgt	gtgaaattgt	tatccgctca	caattccaca	5460
caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	agcctgggggt	gcctaagtga	tgagctaact	5520
cacattaatt	gcgttcgct	cactgccgcg	tttcagtcg	ggaacctgt	cgtgccagct	5580
gcattaatga	atcgcccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	cgtattgggc	gctcttccgc	5640
ttctctcgctc	actgactcgc	tgcgctcggt	cggttcggctg	cggcgagcgg	tatcagctca	5700
ctcaaaaggcg	gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	agaacatgtg	5760
agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	cgtttttcca	5820
taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacia	aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	5880
cccgcaggga	ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	agctccctcg	tcgctctccc	5940
tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	6000
gctttctcaa	tgtctacgct	gtaggatatc	cagttcggtg	taggtcgttc	gctccaagct	6060
gggtctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	6120
tcttgagtc	aacccggtaa	gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	6180
gattagcaga	gcgaggtagt	taggcgggtg	tacagagttc	ttgaagtgg	ggcctaacta	6240
cggctacact	agaaggacag	tatttggat	ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	6300
aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	gctggtagcg	gtggtttttt	6360
tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	6420
ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaaaga	aaactcacgt	taagggattt	tggatcatgag	6480
attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	tttaaatata	aaatgaagtt	ttaaatcaat	6540
ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggtctga	cagttaccaa	tgcttaata	gtgaggcacc	6600
tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcac	catagttgcc	tgactccccg	tcgtgtagat	6660
aactacgata	cgggagggct	taccatctgg	ccccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	6720
acgctcaccg	gctccagatt	tatcagcaat	aaaccagcca	gccggaaggg	ccgagcgag	6780
aagtgtcct	gcaactttat	ccgcctccat	ccagttctatt	aattgttgcc	gggaagctag	6840
agtaagtagt	tcgccagtta	atagtttgcg	caacgttgtt	gccattgcta	caggcatcgt	6900
ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	gtatggcttc	attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	6960
agttacatga	tccccatgt	tgtgcaaaaa	agcggttage	tccttcgggtc	ctccgatcgt	7020
tgtcagaagt	aagttggccg	cagtgttatc	actcatggtt	atggcagcac	tgcataattc	7080

```

tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 7140
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaaa tacgggataa 7200
taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg 7260
aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc 7320
caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagagcaa aaacaggaag 7380
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7440
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 7500
tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttcgcgcg acatttcccc gaaaagtgcc 7560
acctgacgtc 7570

```

<210> 52

<211> 682

<212> ПРТ

<213> Неприродна послідовність

<220>

<223> GFP-BoNT/ Легка ланцюгова послідовність амінокислоти.

<400> 52

```

Ala Ser Lys Gly Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1          5          10          15
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20          25          30
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35          40          45
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 50          55          60
Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
 65          70          75          80
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85          90          95
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
100          105          110
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
115          120          125
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
130          135          140
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145          150          155          160
Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
165          170          175
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
180          185          190
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
195          200          205
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
210          215          220
Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp
225          230          235          240
Gly Gly Gly Gly Gly Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp
245          250          255
Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly
260          265          270
Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val
275          280          285
Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn
290          295          300
Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr
305          310          315          320
Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr
325          330          335

```

Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu
 340 345 350
 Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp
 355 360 365
 Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro
 370 375 380
 Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro
 385 390 395 400
 Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val
 405 410 415
 Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe
 420 425 430
 Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr
 435 440 445
 Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr
 450 455 460
 Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala
 465 470 475 480
 Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu
 485 490 495
 Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly
 500 505 510
 His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu
 515 520 525
 Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala
 530 535 540
 Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val
 545 550 555 560
 Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser
 565 570 575
 Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile
 580 585 590
 Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys
 595 600 605
 Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro
 610 615 620
 Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn
 625 630 635 640
 Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn
 645 650 655
 Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu
 660 665 670
 Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys
 675 680

<210> 53

<211> 6259

<212> ДНК

<213> Неприродна послідовність

<220>

<223> pQBI-25/GFP конструкція вираження.

<400> 53

gacggatcgg gagatctccc gatcccttat ggctgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gtagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggtttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgatc 240
 catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 360
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc 420
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480

```

attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcttggcatt 600
atgccacgta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtatttagtca 660
tcgtatttac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 720
actcacgggg atttccaagt ctccaaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 780
aaaatcaacg ggaactttcca aatgtcgtga acaactccgc cccattgacg caaatgggag 840
gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900
cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc 960
tccgcgggccc accatggagg gcccggttac cggtagccga tccagatata tgggcggccg 1020
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggagcgcg aggtggagct agcaaaaggag aagaactctt 1080
cactggagtt gtcccatttc ttgttggaat agatgggtgat gttaacggcc acaagtcttc 1140
tgtcagtgga gaggtggaag gtgatgcaac atacggaaaa ctaccctga agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
tcaatgcttt caagataacc cggatcatat gaaacggcat gactttttca agagtgccat 1320
gcccgaaagt tatgtacagg aaaggacatc cttcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380
acgtgctgaa gtcaagtgtt ccttggtaat agaatcgagt taaaaggtag 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctctg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagaccgg 1560
ccacaacatt gaagatggaa ggtttcaact agcagaccaa tatcaacaaa atactccaat 1620
tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaa ctgccctttc 1680
gaaagatccc aacgaaaaa gagaccacat ggtccttctt gagtttgtaa cagctgctgg 1740
gtttacacat ggcattggat aactgtacaa catcgatgga ggccgagggt gatgaacgg 1800
ttagccctat tctatagtgt cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc 1860
cttctagtgt ccagccatct gttgtttgcc cctccccctg gccttctctg accctggaag 1920
gtgccactcc cactgtcctt tcttaataaa atgaggaaat tgcctcgcat tgtctgagta 1980
gggtgctatto tattctgggg ggtgggggtg ggacggacag caagggggag gattgggaag 2040
acaatagcag gcatgctggg gatgctgtgg gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca 2100
gctggggctc tagggggtat cccacacgcg cctgtagcgg cgcattaaagc gcggcggtg 2160
tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgcgc gctcctttcg 2220
ctttcttccc ttctcttttc ccgcttttcc ccgtcaagct ctaaatcggg 2280
gcatcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt 2340
agggtagtgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggttttttgc cctttgacgt 2400
tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaaacaaca ctcaacccta 2460
tctcgtgcta ttcttttgat ttataaggga ttttggggat ttccggcctat tgggtaaaaa 2520
atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attaatctg tggaatgtgt gtcagttagg 2580
gtgtggaagc tccccaggct ccccgagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 2640
agtgcagcac cagggtgtgga aagtcaccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaaagca 2700
tgcatctcaa ttagtcagca accatagtc ccgccctaac tccgcccatac ccgcccta 2760
ctccgcccat ttccgcccat tctccgcccc atggtgact aatttttttt atttatgcag 2820
agggcgaggc cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag 2880
gctaggctt ttgcaaaaag ctcccgaggc cttgtatata cattttcgga tctgatcaag 2940
agacaggatg aggatcggtt cgcattgatt aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3000
ccgcttgggt ggagaggcta ttccgctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3060
atgcgcgcgt gttccggctg tcagcgaggg ggccggcggt tctttttgtc aagaccgacc 3120
tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3180
cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcaactga agcgggaagg gactggctgc 3240
tattggggcg agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag 3300
tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtc tgatccggct acctgcccat 3360
tcgaccacca agcgaaacat cgcattcgagc gagcacgtac tccgatggaa gccggtcttg 3420
tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3480
ggctcaaggc gcgcattgcc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct 3540
tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt gccggctgg 3600
gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg tgatattgct gaagagcttg 3660
gcggcgaaat ggctgaccgc ttctcgtgct tttacggtat cgcgcctccc gattcgcagc 3720
gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 3780
gaccgaccaa gcgacgccc acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgcttcta 3840
tgaaagggtt ggcttcggaa tcgttttccg ggacggcggc tggatgatcc tccagcgcg 3900
ggatctcatg ctggagttct tcgcccaccc caactgttt attgcagctt ataaggtta 3960
caataaagc aatagcatca caaatctcac aataaagca tttttttcac tgcattctag 4020
ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt cgacctctag 4080
ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttctctgt tgaaattggt atccgctcac 4140
aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggt cctaagtgt 4200
gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtc ttccagtcgg gaaacctgtc 4260

```

```

gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg 4320
ctcttcgctt tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt 4380
atcagctcac tcaaggcggt taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 4440
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaaccgt aaaaaggccg cggtgctggc 4500
gtttttccat aggtccgccc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtccagag 4560
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gtcctcctgt 4620
gogctctcct gttccgaccc tgcgccttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg 4680
aagcggtggc ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcggttcg 4740
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg cttatcccg 4800
taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 4860
tggtaacagg attagcagag cgaggatgtt aggcgggtgt acagagttct tgaagtgggtg 4920
gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt 4980
taccttcgga aaaagagttg gttagctctt atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg 5040
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 5100
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt 5160
ggtcagtgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctatgctcct ttaaattaaa aatgaagttt 5220
taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 5280
tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tctgtcatcc atagttgcct gactccccgt 5340
cgtgtagata actacgatac gggagggcct accatctggc cccagtgcgt caatgatacc 5400
gcgagaccga cgctcacggc ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaaggcg 5460
cgagcgagca agtggctctg caactttatc cgctccatc cagtctatta attgttgccg 5520
ggaagctaga gtaagttagt cgccagttaa tagtttgctc aacgttggtt ccattgctac 5580
agggatcggt gttgcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 5640
atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc 5700
tccgatcggt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatgttta tggcagcact 5760
gcataattct cttactgtca tggcatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 5820
aaccaagtca tttctgagaa agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgctaat 5880
acgggataat accgcgcac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 5940
ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 6000
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 6060
aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcgc acacggaaat gttgaatact 6120
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 6180
atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 6240
aaaagtgcga cctgacgtc 6259

```

<210> 54

<211> 245

<212> PPT

<213> Неприродна послідовність

<220>

<223> GFP послідовність амінокислоти.

<400> 54

```

Ala Ser Lys Gly Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1          5          10          15
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20          25          30
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35          40          45
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 50          55          60
Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
 65          70          75          80
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85          90          95
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
100          105          110
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
115          120          125
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn

```

```

      130              135              140
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145              150              155              160
Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
      165              170              175
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
      180              185              190
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
      195              200              205
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
      210              215              220
Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp
225              230              235              240
Gly Gly Gly Gly Gly
      245

```

<210> 55
 <211> 4
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> G-спайсер гнучкий спайсер

<400> 55
 Gly Gly Gly Gly
 1

<210> 56
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> G- спайсер гнучкий спайсер

<400> 56
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 57
 <211> 4
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> A- спайсер гнучкий спайсер

<400> 57
 Ala Ala Ala Ala
 1

<210> 58
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Неприродна послідовність

<220>
 <223> A- спайсер гнучкий спайсер

<400> 58
 Ala Ala Ala Ala Val
 1 5

<210> 59
 <211> 821
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
 20 25 30
 Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu
 35 40 45
 Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
 50 55 60
 Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
 65 70 75 80
 Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
 85 90 95
 Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr
 100 105 110
 Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
 115 120 125
 Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
 130 135 140
 Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
 145 150 155 160
 Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys
 165 170 175
 Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
 180 185 190
 Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
 195 200 205
 Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
 210 215 220
 Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
 225 230 235 240
 Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro
 245 250 255
 Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly
 260 265 270
 Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile
 275 280 285
 Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp
 290 295 300
 Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr
 305 310 315 320
 Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp
 325 330 335
 Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe
 340 345 350
 His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu
 355 360 365
 Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly
 370 375 380
 Val Phe Leu Ile Ala Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg Met
 385 390 395 400
 Lys Asn Thr Thr Lys Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val His

```

      405      410      415
Lys Leu Thr Lys Arg Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala
      420      425      430
Glu Ser Ser Ser Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr
      435      440      445
Thr Arg Leu Ser Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser
      450      455      460
Glu Tyr Glu Leu Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys
465      470      475      480
Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val
      485      490      495
Met Ala Glu Ala Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val
      500      505      510
Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu
      515      520      525
Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His
      530      535      540
Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu
545      550      555      560
Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu
      565      570      575
Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg
      580      585      590
Val Pro Glu Glu Gln Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr
      595      600      605
Gln Leu Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His
610      615      620
Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val Met
625      630      635      640
Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr
      645      650      655
Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro
      660      665      670
Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser
      675      680      685
Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr
690      695      700
Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His
705      710      715      720
Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met
      725      730      735
Arg Asp Cys Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln
740      745      750
Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu Glu
755      760      765
Tyr Leu Asp Leu Ser Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr Pro
770      775      780
Asp Thr Arg Ser Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser Pro
785      790      795      800
Asp Pro Met Pro Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn
      805      810      815
Gly Ser Val Lys Thr
      820

```

<210> 60

<211> 822

<212> NPТ

<213> Homo sapiens

<400> 60

```

Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
1          5          10          15

```



```

Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
      20      25      30
Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu
      35      40      45
Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
      50      55      60
Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
      65      70      75      80
Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
      85      90      95
Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr
      100      105      110
Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
      115      120      125
Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
      130      135      140
Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
      145      150      155      160
Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys
      165      170      175
Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
      180      185      190
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
      195      200      205
Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
      210      215      220
Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
      225      230      235      240
Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro
      245      250      255
Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly
      260      265      270
Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile
      275      280      285      290
Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp
      295      300
Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser
      305      310      315      320
Asn Ala Glu Val Leu Ala Leu Phe Asn Val Thr Glu Ala Asp Ala Gly
      325      330      335
Glu Tyr Ile Cys Lys Val Ser Asn Tyr Ile Gly Gln Ala Asn Gln Ser
      340      345      350
Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Lys Gln Gln Ala Pro Gly Arg Glu Lys
      355      360      365
Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile
      370      375      380
Gly Val Phe Leu Ile Ala Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg
      385      390      395      400
Met Lys Asn Thr Thr Lys Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val
      405      410      415
His Lys Leu Thr Lys Arg Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser
      420      425      430
Ala Glu Ser Ser Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile
      435      440      445
Thr Thr Arg Leu Ser Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val
      450      455      460
Ser Glu Tyr Glu Leu Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp
      465      470      475      480
Lys Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val
      485      490      495
Val Met Ala Glu Ala Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala
      500      505      510
Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp

```

```

      515      520      525
Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys
530      535      540
His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro
545      550      555      560
Leu Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr
      565      570      575
Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn
      580      585      590
Arg Val Pro Glu Glu Gln Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr
      595      600      605
Tyr Gln Leu Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile
610      615      620
His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val
625      630      635      640
Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp
      645      650      655
Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala
      660      665      670
Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp
      675      680      685
Ser Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro
690      695      700
Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly
705      710      715      720
His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met
      725      730      735
Met Arg Asp Cys Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys
      740      745      750
Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu
      755      760      765
Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr
      770      775      780
Pro Asp Thr Arg Ser Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser
785      790      795      800
Pro Asp Pro Met Pro Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile
      805      810      815
Asn Gly Ser Val Lys Thr
      820

```

<210> 61
 <211> 769
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

```

<400> 61
Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
1      5      10      15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
      20      25      30
Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu
      35      40      45
Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
      50      55      60
Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
      65      70      75      80
Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
      85      90      95
Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr
      100      105      110
Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
      115      120      125

```

```

Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
130          135          140
Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
145          150          155          160
Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys
165          170          175
Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
180          185          190
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
195          200          205
Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
210          215          220
Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
225          230          235          240
Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro
245          250          255
Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly
260          265          270
Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile
275          280          285
Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp
290          295          300
Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser
305          310          315          320
Asn Ala Glu Val Leu Ala Leu Phe Asn Val Thr Glu Ala Asp Ala Gly
325          330          335
Glu Tyr Ile Cys Lys Val Ser Asn Tyr Ile Gly Gln Ala Asn Gln Ser
340          345          350
Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Lys Gln Gln Ala Pro Gly Arg Glu Lys
355          360          365
Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile
370          375          380
Gly Val Phe Leu Ile Ala Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg
385          390          395          400
Met Lys Asn Thr Thr Lys Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val
405          410          415
His Lys Leu Thr Lys Arg Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser
420          425          430
Ala Glu Ser Ser Ser Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile
435          440          445
Thr Thr Arg Leu Ser Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val
450          455          460
Ser Glu Tyr Glu Leu Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp
465          470          475          480
Lys Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val
485          490          495
Val Met Ala Glu Ala Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala
500          505          510
Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp
515          520          525
Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys
530          535          540
His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro
545          550          555          560
Leu Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr
565          570          575
Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn
580          585          590
Arg Val Pro Glu Glu Gln Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr
595          600          605
Tyr Gln Leu Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile
610          615          620
His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val

```

```

625          630          635          640
Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp
          645          650          655
Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala
          660          665          670
Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp
          675          680          685
Ser Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro
          690          695          700
Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly
705          710          715          720
His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met
          725          730          735
Met Arg Asp Cys Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys
          740          745          750
Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu
          755          760          765
Ile

```

```

<210> 62
<211> 709
<212> ПРТ
<213> Хомо сапиенс

```

```

<400> 62
Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
          20          25          30
Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu
          35          40          45
Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
          50          55          60
Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
65          70          75          80
Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
          85          90          95
Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr
          100          105          110
Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
          115          120          125
Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
          130          135          140
Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
145          150          155          160
Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys
          165          170          175
Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
          180          185          190
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
          195          200          205
Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
210          215          220
Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
225          230          235          240
Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu
          245          250          255
Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly
          260          265          270
Val Phe Leu Ile Ala Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg Met
          275          280          285

```

Lys Asn Thr Thr Lys Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val His
 290 295 300
 Lys Leu Thr Lys Arg Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala
 305 310 315 320
 Glu Ser Ser Ser Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr
 325 330 335
 Thr Arg Leu Ser Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser
 340 345 350
 Glu Tyr Glu Leu Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys
 355 360 365
 Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val
 370 375 380
 Met Ala Glu Ala Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val
 385 390 395 400
 Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu
 405 410 415
 Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His
 420 425 430
 Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu
 435 440 445
 Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu
 450 455 460
 Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg
 465 470 475 480
 Val Pro Glu Glu Gln Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr
 485 490 495
 Gln Leu Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His
 500 505 510
 Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val Met
 515 520 525
 Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr
 530 535 540
 Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro
 545 550 555 560
 Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser
 565 570 575
 Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr
 580 585 590
 Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His
 595 600 605
 Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met
 610 615 620
 Arg Asp Cys Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln
 625 630 635 640
 Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu Glu
 645 650 655
 Tyr Leu Asp Leu Ser Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr Pro
 660 665 670
 Asp Thr Arg Ser Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser Pro
 675 680 685
 Asp Pro Met Pro Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn
 690 695 700
 Gly Ser Val Lys Thr
 705

<210> 63

<211> 707

<212> ПРТ

<213> Хомо сапиенс

<400> 63

Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala

```

1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
20           25           30
Leu Glu Pro Glu Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr
35           40           45
Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala
50           55           60
Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val
65           70           75           80
Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro
85           90           95
Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu
100          105          110
His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile
115          120          125
Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val
130          135          140
Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val
145          150          155          160
Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn
165          170          175
Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr
180          185          190
Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn
195          200          205
Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys
210          215          220
Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile
225          230          235          240
Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly
245          250          255
Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro
260          265          270
Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu
275          280          285
Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly Val Phe Leu Ile Ala Cys Met Val Val
290          295          300
Thr Val Ile Leu Cys Arg Met Lys Asn Thr Thr Lys Lys Pro Asp Phe
305          310          315          320
Ser Ser Gln Pro Ala Val His Lys Leu Thr Lys Arg Ile Pro Leu Arg
325          330          335
Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Glu Ser Ser Ser Ser Met Asn Ser Asn
340          345          350
Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr Thr Arg Leu Ser Ser Thr Ala Asp Thr
355          360          365
Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu Pro Glu Asp Pro Lys
370          375          380
Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu
385          390          395          400
Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Val Gly Ile Asp Lys
405          410          415
Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp
420          425          430
Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met
435          440          445
Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala
450          455          460
Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ser Lys
465          470          475          480
Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met Glu
485          490          495
Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg Val Pro Glu Glu Gln Met Thr Phe Lys
500          505          510

```

```

Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr Gln Leu Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu
515 520 525
Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu
530 535 540
Val Thr Glu Asn Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg
545 550 555 560
Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu
565 570 575
Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr
580 585 590
His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Phe
595 600 605
Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Leu Phe
610 615 620
Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr
625 630 635 640
Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys Trp His Ala Val Pro Ser
645 650 655
Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Ile Leu
660 665 670
Thr Leu Thr Thr Asn Glu Glu Glu Lys Lys Val Ser Gly Ala Val Asp
675 680 685
Cys His Lys Pro Pro Cys Asn Pro Ser His Leu Pro Cys Val Leu Ala
690 695 700
Val Asp Gln
705

```

```

<210> 64
<211> 706
<212> NPТ
<213> Xomo caniehc

```

```

<400> 64
Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
20 25 30
Leu Glu Pro Glu Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu
35 40 45
Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys
50 55 60
Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly
65 70 75 80
Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn
85 90 95
Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly
100 105 110
Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr
115 120 125
Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
130 135 140
Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu
145 150 155 160
Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile
165 170 175
Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro
180 185 190
Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu
195 200 205
Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu
210 215 220
Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala

```

```

225          230          235          240
Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala
          245          250          255
Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly Val Phe Leu
          260          265          270
Ile Ala Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg Met Lys Asn Thr
          275          280          285
Thr Lys Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val His Lys Leu Thr
          290          295          300
Lys Arg Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Glu Ser Ser
305          310          315          320
Ser Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr Thr Arg Leu
          325          330          335
Ser Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu
          340          345          350
Leu Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys Leu Thr Leu
          355          360          365
Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Met Ala Glu
          370          375          380
Ala Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val Thr Val Ala
385          390          395          400
Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu
          405          410          415
Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile
          420          425          430
Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile
          435          440          445
Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg
          450          455          460
Arg Pro Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg Val Pro Glu
465          470          475          480
Glu Gln Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr Gln Leu Ala
          485          490          495
Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu
          500          505          510
Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val Met Lys Ile Ala
          515          520          525
Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys
          530          535          540
Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu
545          550          555          560
Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val
          565          570          575
Leu Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile
          580          585          590
Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp
          595          600          605
Lys Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys
610          615          620
Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu
625          630          635          640
Asp Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu Glu Tyr Leu Asp
          645          650          655
Leu Ser Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr Pro Asp Thr Arg
          660          665          670
Ser Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser Pro Asp Pro Met
          675          680          685
Pro Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn Gly Ser Val
690          695          700
Lys Thr
705

```


<210> 65
 <211> 705
 <212> ПРТ
 <213> Хомо сапиенс

<400> 65

```

Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
 1      5      10      15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
      20      25      30
Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu
      35      40      45
Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
      50      55      60
Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
65      70      75      80
Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
      85      90      95
Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr
      100      105      110
Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
      115      120      125
Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
      130      135      140
Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
145      150      155      160
Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys
      165      170      175
Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
      180      185      190
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
195      200      205
Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
210      215      220
Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
225      230      235      240
Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro
      245      250      255
Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly
      260      265      270
Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile
275      280      285
Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp
290      295      300
Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Val Ser Ala Glu Ser Ser Ser
305      310      315      320
Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr Thr Arg Leu Ser
      325      330      335
Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu
      340      345      350
Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys Leu Thr Leu Gly
      355      360      365
Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala
370      375      380
Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val Thr Val Ala Val
385      390      395      400
Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val
      405      410      415
Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile
      420      425      430
Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val
435      440      445
Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg Arg

```

```

      450      455      460
Pro Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg Val Pro Glu Glu
465      470      475      480
Gln Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr Gln Leu Ala Arg
      485      490      495
Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala
      500      505      510
Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val Met Lys Ile Ala Asp
      515      520      525
Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr
      530      535      540
Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe
      545      550      555
Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu
      565      570      575
Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro
      580      585      590
Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys
      595      600      605
Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys Trp
      610      615      620
His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp
      625      630      635
Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu Glu Tyr Leu Asp Leu
      645      650      655
Ser Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr Pro Asp Thr Arg Ser
      660      665      670
Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser Pro Asp Pro Met Pro
      675      680      685
Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn Gly Ser Val Lys
      690      695      700
Thr
705

```

```

<210> 66
<211> 704
<212> HPT
<213> Xomo caniehc

```

```

<400> 66
Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
1      5      10      15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
      20      25      30
Leu Glu Pro Glu Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu
      35      40      45
Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys
      50      55      60
Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly
      65      70      75      80
Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn
      85      90      95
Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly
      100      105      110
Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr
      115      120      125
Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
      130      135      140
Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu
      145      150      155      160
Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile
      165      170      175

```

```

Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro
180 185 190
Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu
195 200 205
Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu
210 215 220
Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala
225 230 235 240
Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala
245 250 255
Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly Val Phe Leu
260 265 270
Ile Ala Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg Met Lys Asn Thr
275 280 285
Thr Lys Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val His Lys Leu Thr
290 295 300
Lys Arg Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Ser Ala Glu Ser Ser Ser Ser
305 310 315 320
Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr Thr Arg Leu Ser Ser
325 330 335
Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu Pro
340 345 350
Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys Leu Thr Leu Gly Lys
355 360 365
Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Val
370 375 380
Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val Thr Val Ala Val Lys
385 390 395 400
Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser
405 410 415
Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn
420 425 430
Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu
435 440 445
Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg Arg Pro
450 455 460
Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg Val Pro Glu Glu Gln
465 470 475 480
Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr Gln Leu Ala Arg Gly
485 490 495
Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala
500 505 510
Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe
515 520 525
Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr
530 535 540
Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp
545 550 555 560
Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Met
565 570 575
Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val
580 585 590
Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro
595 600 605
Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys Trp His
610 615 620
Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu
625 630 635 640
Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu Glu Tyr Leu Asp Leu Ser
645 650 655
Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr Pro Asp Thr Arg Ser Ser
660 665 670
Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser Pro Asp Pro Met Pro Tyr

```

675 680 685
 Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn Gly Ser Val Lys Thr
 690 695 700

<210> 67
 <211> 680
 <212> PPT
 <213> Xомо caniehc

<400> 67
 Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
 20 25 30
 Leu Glu Pro Glu Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr
 35 40 45
 Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala
 50 55 60
 Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val
 65 70 75 80
 Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro
 85 90 95
 Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu
 100 105 110
 His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile
 115 120 125
 Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val
 130 135 140
 Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val
 145 150 155 160
 Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn
 165 170 175
 Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn
 195 200 205
 Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys
 210 215 220
 His Ser Gly Ile Asn Ser Ser Asn Ala Glu Val Leu Ala Leu Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Thr Glu Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Ile Cys Lys Val Ser Asn Tyr
 245 250 255
 Ile Gly Gln Ala Asn Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Lys Gln
 260 265 270
 Gln Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu
 275 280 285
 Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly Val Phe Leu Ile Ala Cys Met Val
 290 295 300
 Val Thr Val Ile Leu Cys Arg Met Lys Asn Thr Thr Lys Lys Pro Asp
 305 310 315 320
 Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val His Lys Leu Thr Lys Arg Ile Pro Leu
 325 330 335
 Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Glu Ser Ser Ser Met Asn Ser
 340 345 350
 Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr Thr Arg Leu Ser Ser Thr Ala Asp
 355 360 365
 Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu Pro Glu Asp Pro
 370 375 380
 Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly
 385 390 395 400
 Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Val Gly Ile Asp
 405 410 415

```

Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys
      420      425      430
Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu
      435      440      445
Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly
      450      455      460
Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ser
465      470      475      480
Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met
      485      490      495
Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg Val Pro Glu Glu Gln Met Thr Phe
      500      505      510
Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr Gln Leu Ala Arg Gly Met Glu Tyr
      515      520      525
Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
      530      535      540
Leu Val Thr Glu Asn Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala
545      550      555      560
Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg
      565      570      575
Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr
      580      585      590
Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile
      595      600      605
Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu
      610      615      620
Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys
625      630      635      640
Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys Trp His Ala Val Pro
      645      650      655
Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Ile
      660      665      670
Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu Ile
      675      680

```

<210> 68
 <211> 396
 <212> HPT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 68
Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
 1      5      10      15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
      20      25      30
Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu
      35      40      45
Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
      50      55      60
Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
65      70      75      80
Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
      85      90      95
Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr
      100      105      110
Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
      115      120      125
Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
      130      135      140
Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
145      150      155      160
Lys Thr Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys

```

```

          165          170          175
Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
          180          185          190
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
          195          200          205
Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
          210          215          220
Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
          225          230          235          240
Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro
          245          250          255
Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly
          260          265          270
Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile
          275          280          285
Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp
          290          295          300
Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr
          305          310          315          320
Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp
          325          330          335
Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe
          340          345          350
His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Gly Ile Tyr Cys Ser Phe Ser
          355          360          365
Leu Gly Phe Phe Pro Phe Ser Trp Leu Thr Ala Ile Lys Leu Thr Gln
          370          375          380
Leu Leu Leu Ser Glu Met Ala Pro Phe Ile Leu Ala
          385          390          395

```

<210> 69
 <211> 317
 <212> ПРТ
 <213> Хомо саниенс

```

<400> 69
Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
  1      5      10      15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
      20      25      30
Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu
      35      40      45
Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
      50      55      60
Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
      65      70      75      80
Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
      85      90      95
Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr
      100      105      110
Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
      115      120      125
Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
      130      135      140
Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
      145      150      155      160
Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys
      165      170      175
Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
      180      185      190
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
      195      200      205

```

```

Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
210                215                220
Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
225                230                235                240
Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro
                245                250                255
Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly
                260                265                270
Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile
275                280                285
Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp
290                295                300
Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Val Arg Thr Phe
305                310                315

```

```

<210> 70
<211> 266
<212> ПРТ
<213> Хомо сапиенс

```

```

<400> 70
Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
20        25        30
Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu
35        40        45
Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
50        55        60
Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
65        70        75        80
Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
85        90        95
Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr
100       105       110
Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
115       120       125
Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
130       135       140
Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
145       150       155       160
Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys
165       170       175
Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
180       185       190
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
195       200       205
Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
210       215       220
Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
225       230       235                240
Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Gly Glu Ser Ala Ser Pro Arg
245       250                255
Val Ala Ala Ala Tyr Gln Pro Ile Leu Ala
260                265

```

```

<210> 71
<211> 336
<212> ДНК
<213> Миша хатня

```

<400> 71
 cagggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaagg cttctggcta catcttctact gaccatgctc ttcactgggt gaggcagaag 120
 cctgaacagg gcctggaatg gattgggtat atttttcccg gaaatggtaa tattgagtac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag tactgcctac 240
 atgcagctca acagcctgac atctggagat tctgcaatgt atttctgtaa aaagatggac 300
 tactggggcc aagggaaccac ggtcaccgtc tcctca 336

<210> 72
 <211> 111
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 72
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His Ala
 20 25 30
 Leu His Trp Val Arg Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Lys
 85 90 95
 Lys Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 73
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Миша хатня

<400> 73
 cagggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttctact gaccattcta ttcactgggt gaagcagaag 120
 cctggacagg gcctagaatg gattggatat ctttttcccg gaaatggtaa ttttgaatat 180
 aatgagaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
 atgcacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaagatggac 300
 tactggggcc aagggaaccac ggtcaccgtc tcctca 336

<210> 74
 <211> 111
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 74
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ser
 20 25 30
 Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Lys
 85 90 95
 Lys Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 75
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Миша хатня

<400> 75
 caggttcagc tgcagcagtc cgacgctgag ttggtgaaac ctgggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaggg cttctggcta caccttctact gaccatttcta ttctactgggt gaagcagcag 120
 cctggccagg gcctggaatg gatcggatat atttttcccg gaaatggaaa tattgaatac 180
 aatgacaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccgg cactgcctac 240
 atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300
 tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tctca 336

<210> 76
 <211> 111
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 76
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ser
 20 25 30
 Ile His Trp Val Lys Gln Gln Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Asp Lys Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Gly Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Lys
 85 90 95
 Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 77
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Миша хатня

<400> 77
 caggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctgggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggata cacatttctact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
 aatgagaagt tcaaaaggcaa ggccctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacatctc 300
 gctaataacct actactactt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctctca 360

<210> 78
 <211> 119
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 78
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Val
 20 25 30
 Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 79
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Миша хатня

<400> 79
 cagggtcaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
 tcctgcaagg ctcttggtc cacccttcaact gaccatttcta ttcaactgggt gaagcagaag 120
 cctggacagg gcctagaatg gattggatat ctttttcccg gaaatggtaa ttttgagtac 180
 aatgaaaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgtctac 240
 atgtacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgat atttctgtaa aaggatgggg 300
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

<210> 80
 <211> 111
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 80
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ser
 20 25 30
 Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met
 65 70 75 80
 Tyr Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Lys
 85 90 95
 Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 81
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Миша хатня

<400> 81
 gtgaagctgc aggagtctgg acctgaactg gtaaagcctg gggcttcagt gaagatgtcc 60
 tgcaaggcct ctggatacac attcactaac tatgttatac actgggtgaa gcaaaagcct 120
 gggcagggcc ttgagtggat tggatatatt aatccttaca atgatggctc taagtacaat 180
 gagaagttca aaggcaaggc ctcaactgact tcagacaaat cctccagcac agcctacatg 240
 gagctcagca gcctgacctc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag acatctcgtc 300
 aatacctact actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357

<210> 82
 <211> 120
 <212> ПРТ

<213> Миша хатня

<400> 82

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1           5           10           15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20           25           30
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35           40           45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50           55           60
Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr
 65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85           90           95
Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100           105           110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115           120

```

<210> 83

<211> 342

<212> ДНК

<213> Миша хатня

<400> 83

```

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300
cctacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ct 342

```

<210> 84

<211> 113

<212> ПРТ

<213> Миша хатня

<400> 84

```

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1           5           10           15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20           25           30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35           40           45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85           90           95
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100           105           110
Arg

```

<210> 85

<211> 324

<212> ДНК

<213> Миша хатня

<400> 85
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gaacaactga aaatatattac agttatattg tatgggtctca gcagagacag 120
ggaaaatctc ctacagctccg ggtctataat gcaaaaatcct tagcagaagg tgtgccatca 180
agtttcaatg tcagtgtatc aggcacacag ttttctctga agatcaatag cctgcagcct 240
gaagattttg ggacttatca ctgtcaacac cattatggta ctccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaggc tggaataag acgg 324

<210> 86
<211> 108
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 86
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30
Phe Val Trp Ser Gln Gln Arg Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Arg Val
35 40 45
Tyr Asn Ala Lys Ser Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Ser Phe Asn Val
50 55 60
Ser Val Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Thr Tyr His Cys Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Arg Arg
100 105

<210> 87
<211> 336
<212> ДНК
<213> Миша хатня

<400> 87
gacattgtgc tgacacagtc tcctgottcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60
atctcgtaca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcaactggaac 120
саасагааас саггасагсс асссагасс ссасгасгсс тсасгасгсс тсасгасгсс 180
ggggtccctg ccagggtcag tggcagtgagg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg agggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gcttacacgt 300
tcggaggggg gcaccaagct ggaaatcaaa cggaga 336

<210> 88
<211> 112
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 88
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Cys Gln His Ile Arg
85 90 95
Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Arg
100 105 110

<210> 89
 <211> 327
 <212> ДНК
 <213> Миша хатня

<400> 89
 gacatcaaga tgaccagtc tccatcctcc atgtatgcat cgctgggaga gagagtcact 60
 atcacttgca aggcgagtc ggacattaag agctatttaa gctgggtacca gcagaaacca 120
 tggaatctc ctaagaccct gatctattat gcaacaagct tggcagatgg ggtcccatca 180
 agattcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctaa ccatcagcag cctggagtct 240
 gacgatacag caacttatta ctgtctacag catggtgaga gcccgtagac gtccggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa acgggct 327

<210> 90
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 90
 Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 91
 <211> 327
 <212> ДНК
 <213> Миша хатня

<400> 91
 gatgttgatc taactcagtc tccgtgccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtcagt 60
 ctttcctgca gggccagcca aaatattggc aactacctac actgggtatca acagaaatca 120
 catgagtcct caaggcttct catcaagtat gcttccagct ccatctctgg gatccctcc 180
 aggttcagtg gcagtggatc agtcacagat ttcaactctca atatcaacag tggggagact 240
 gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtgacacct ggcctctcac gtccggtgct 300
 gggaccaagc tggagctgaa acgggct 327

<210> 92
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 92
 Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Asn Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50		55		60	
Ser	Gly	Ser	Val	Thr	Asp
65		70		75	
Glu	Asp	Phe	Gly	Met	Tyr
		85		90	
Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr
		100		105	

<210> 93
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 93
 Thr Phe Thr Asp His Ser Ile His
 1 5

<210> 94
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 94
 Thr Phe Thr Asn Tyr Val Ile His
 1 5

<210> 95
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 95
 Ile Phe Thr Asp His Ala Leu His
 1 5

<210> 96
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 96
 Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Asp Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 97
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 97
 Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 98
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 98
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 99
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 99
 Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 100
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 100
 Lys Arg Met Gly Tyr
 1 5

<210> 101
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 101
 Lys Lys Met Asp Tyr
 1 5

<210> 102
 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 102
 Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 103
 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 103
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 104
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 104
 Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Phe Val
 1 5 10

<210> 105
 <211> 15
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 105
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15

<210> 106
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 106
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10

<210> 107
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 107
 Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Asn Tyr Leu His
 1 5 10

<210> 108
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 108
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 109
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 109
 Asn Ala Lys Ser Leu Ala Glu
 1 5

<210> 110
 <211> 7

<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 110
Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 111
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 111
Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5

<210> 112
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 112
Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 113
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 114
Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 115
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 115
Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 116
Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Phe Thr
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 117
Gln Gln Ser Asp Thr Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 118
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 118
Asp His Ala Leu His
1 5

<210> 119
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 119
Asp His Ser Ile His
1 5

<210> 120
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 120
Asn Tyr Val Ile His
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 121
Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Миша хатня

<400> 122
Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu
1 5

<210> 123
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 123
 Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys
 1 5

<210> 124
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 124
 His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 125
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 125
 Ser Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 126
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 126
 Glu Asn Ile Tyr Ser
 1 5

<210> 127
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 127
 Thr Ser Gly Tyr Ser
 1 5

<210> 128
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 128
 Gln Asp Ile Lys Ser
 1 5

<210> 129

<211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Миша хатня

<400> 129
 Gln Asn Ile Gly Asn
 1 5

<210> 130
 <211> 4654
 <212> ДНК
 <213> Хомо сапиенс

<400> 130
 ggcggcggtt ggaagagagc gcggtggaga gccgagcggg cggcgcgcggt gtgcggagcg 60
 ggcgagggag cgcgcgcgsc cgcacacaaag ctccggcgcc gcggggcggtc atgcggcgta 120
 cctggcccggt cgcgcgcgact gctctccggg ctggcggggg cggcgcgga gcccgggggg 180
 ccccgaggcc gcagcttgcc tgcgcgctct gaggccttcgc aactcgcgag caaagtgttg 240
 tggaggcaac gccaaagcctg agtcctttct tcctctcggt ccccaaatcc gagggcagcc 300
 cgcggcggtc atgcccgcgc tcctcgcgag cctgggggtac gcgtgaagcc cgggagggtt 360
 ggcgccggcg aagaccsaag gaccactctt ctgcgtttgg agttgctccc cgcaaccccg 420
 ggctcgtcgc tttctccatc ccgaccacag cggggcgcggt ggacaacaca ggtcgcggag 480
 gagcgttgcc attcaagtga ctgcagcagc agcggcagcg cctcggttcc tgagccacc 540
 gcaggctgaa ggcattgcgc gtagtccatg ccgtagagg aagtgtgcag atgggattaa 600
 cagatgccat ctcatccgga gatgatgagg atgacaccga tggtagcgaa gattttgtca 660
 gtggtttcat ctgcctggtc gtggtcacc tggcaacctt gtccctggcc cggccctcct 720
 tcagtttagt tgaggatacc acattagagc cagaagagcc accaaccaaa taccaatct 780
 ctcaaccaga agtgtagctg gctgcgcag gggagtcgct agagggtgcgc tgctgttga 840
 aagatgccgc cgtgatcagt tggactaagg atgggggtgca cttggggccc aacaatagga 900
 cagtgtctat tggggagtac ttgcagataa agggcgccac gcctagagac tccggcctct 960
 atgctgttac tgcagtagg actgtagaca gtgaaacttg gtacttcatt gtgaatgtca 1020
 cagatgccat ctcatccgga gatgatgagg atgacaccga tggtagcgaa gattttgtca 1080
 gtgagaacag taacaacaag agagcaccat actggaccaa cacagaaaag atggaaaagc 1140
 ggctccatgc tgtgcctgag gccaacactg tcaagtctcg ctgcccgacc ggggggaacc 1200
 caatgccaac catgcggtgg ctgaaaaacg ggaaggagtt taagcaggag catcgcatgt 1260
 gaggctacaa ggtacgaaac cagcactgga gcctcattat ggaaagtgtg gtcccatctg 1320
 acaagggaat ttatacctgt gtagtgagga atgaatacgg gtccatcaat cacacgtacc 1380
 acctggatgt tgtggagcga tcgcctcacc ggcccatcct ccaagccgga ctgcccggca 1440
 atgcctccac agtggtcgga ggagacgtag agtttgtctg caagggttac agtgatgccc 1500
 agccccacat ccagtggtac aagcagctgg aaaagaacgg cagtaataac gggcccgacg 1560
 ggctgcccct cctcaagggt ctcaaggccg ccggtgttaa caccacggac aaagagattg 1620
 aggttctcta tattcggaat gtaacttttg aggacgctgg ggaatatacg tgcttggcgg 1680
 gtaattctat tgggatatcc tttcactctg catggttgac agttctgcca gcgcctggaa 1740
 gagaaaagga gattacagct tccccagact acctggagat agccatttac tgcatagggg 1800
 tcttcttaat cgctgtatg gtggtaacag tcatcctgtg ccgaatgaag aacacgacca 1860
 agaagccaga ctccagcagc cagccggctg tgcacaagct gaccaaactg atccccctgc 1920
 ggagacaggt aacagtttct gctgagtcga gctcctccat gaactccaac accccgctgg 1980
 tgaggataac aacacgcctc tcttcaacgg cagacacccc catgctggca ggggtctccg 2040
 agtatgaact tccagaggac ccaaatggg agtttccaag agataagctg aactgggca 2100
 agccccggg agaaggttgc tttgggcaag tgggtcatggc ggaagcagtg ggaattgaca 2160
 aagacaagcc caaggaggcg gtcaccgtgg ccgtgaagat gttgaaagat gatgccacag 2220
 agaaagacct ttctgatctg gtgtcagaga tggagatgat gaagatgatt gggaaacaca 2280
 agaatatcat aaatcttctt ggagcctgca cacaggatgg gcctctctat gtcatagttg 2340
 agtatgcctc taaaggcaac ctccgagaat acctccgagc ccggaggcca cccgggatgg 2400
 agtactccta tgacattaac cgtgttctg aggagcagat gacctcaag gacttgggtg 2460
 catgcacctc ccagctggcc agaggcatgg agtacttggc tccccaaaaa tgatttcato 2520
 gagatttagc agccagaaat gttttggtaa cagaaaaaaa tgtgatgaaa atagcagact 2580
 ttggactcgc cagagatata aacaatatag actattacaa aaagaccacc aatggcgggc 2640
 ttccagtcga gtggatgggt ccagaagccc tgtttgatag agtatacact catcagagtg 2700
 atgtctgggt ctcgggggtg ttaatgtggg agatcttcac tttagggggc tcgcccatac 2760
 cagggattcc cgtggaggaa ctttttaagc tgctgaagga aggacacaga atggataagc 2820
 cagccaactg caccacgaa ctgtacatga tgatgaggga ctgttgcat gcagtgcctt 2880

```

cccagagacc aacgttcaag cagttggtag aagacttga tccaattctc actctcaca 2940
ccaatgagga atacttggac ctcagccaac ctctcgaaca gtattcacct agttaccctg 3000
acacaagaag ttcttgttct tcaggagatg attctgtttt ttctccagac cccatgcctt 3060
acgaaccatg ccttctcag tatccacaca taaacggcag tgtaaaaca tgaatgactg 3120
tgtctgcctg tccccaaca ggacgcact gggaacctag ctacactgag caggagagacc 3180
atgcctocca gagcttgttg tctccacttg tatatatgga tcagaggagt aaataattgg 3240
aaaagtaatc agcatatgtg taaagattta tacagttgaa aacttgtaat cttccccagg 3300
aggagaagaa ggtttctgga gcagtggact gccacaagcc accatgtaac ccctctcacc 3360
tgccgtgcgt actggctgtg gaccagtagg actcaagggt gacgtgcgtt ctgccttctc 3420
tgtaattttt gtaataattg gagaagattt atgtcagcac acacttacag agcacaaatg 3480
cagtatatag gtgctggatg tatgtaaata tattcaaatt atgtataaat atatattata 3540
atttattaat gagttatttt ttgtattgat tttaaatgga tgtccaatg cacctagaaa 3600
attggtctct ctttttttaa tagctatttg ctaaatgctg ttcttacaca taatttctta 3660
attttcaccg agcagaggtg gaaaaatact ttgtctttca gggaaaaatg tataacgtta 3720
atgccccata aaattggtaa tatacaaaaac aattaatcat ttatagtttt ttttgtaatt 3780
taagtggcat ttctatgcag gcagcacagc agactagtta atctattgct tggacttaac 3840
tagttatcag atcctttgaa aagagaatat ttacaatata tgactaattt ggggaaatg 3900
aagttttgat ttatttgtgt ttaaatgctg ctgtcagacg attgttctta gacctcctaa 3960
atgccccata ttaaaagaac tcattccatg gaaggtgttt cattttgtg tgcaaccctg 4020
tcattacgtc aacgcaacgt ctaactggac ttccaagat aaatggtacc agcgtcctct 4080
taaaagatgc ctaaatccat tccttgagga cagaccttag ttgaaatgat agcagaatgt 4140
gcttctctct ggcagctggc cttctgcttc tgagttgcac attaatcaga ttagcctgta 4200
ttctcttcag tgaattttga taatggcttc cagactcttt ggcgttggag acgcctgta 4260
ggatcttcaa gtcccatcat agaaaattga aacacagagt tgtctgctg atagttttg 4320
ggatacgtcc atctttttaa gggattgctt tcacttaatt ctggcaggac ctacacaaaa 4380
gatcccatca catacctaca tcagacaaaa tatcgccgtt gttccttctg tactaaagta 4440
ttgtgttttg ctttggaaac acccactcac ttgcaatag ccgtgcaaga tgaatgcaga 4500
ttacactgat cttatgtgtt acaaaattgg agaaagtatt taataaaacc tgtaattttt 4560
tatactgaca ataaaaatgt ttctacagat attaatgtta acaagacaaa ataatgtca 4620
cgcaacttat ttttttaata aaaaaaaaaa aaaa 4654

```

<210> 131
 <211> 4657
 <212> ДНК
 <213> Хомо сапієнс

```

<400> 131
ggcggcggtt ggaggagagc gcggtggaga gccgagcggt gggcgggcgt gtgcggagcg 60
ggcgagggag cgcgcgcggc cgcacaaaag ctcgggcgcc ggggggctgc atgcggcgta 120
cctggcccggt cgcggcgact gctctccggg ctggcggggg ccggcccgga gccccggggg 180
ccccgaggcc gcagcttgcc tgcgcgtctc gagccttcgc aactcgcgag caaagttttg 240
tggaggcaac gccaaagcct agtcctttct tcctctcgtt ccccaaatcc gagggcagcc 300
cgcggcgctc atgcccgcgc tcctccgcag cctggggtac gcgtgaagcc cgggagggct 360
ggcgcggcgt aagaccsaag gaccactctt ctgcgttttg agttgctccc cgcaaccctg 420
ggctcgtcgc ttctctcatc ccgacccacg cggggcgcg ggacaacaca ggtcgcggag 480
gagcgttgcc attcaagtga ctgcagcagc agcggcagcg cctcgggttc tgagcccacc 540
gcaggctgaa ggcattgcgc gtagtccatg ccgtagagg aagtgtgcag atgggattaa 600
cgtcccatat gagatatgga agaggaccgg ggattgttac cgttaaccatg gtcagctggg 660
gtcgtttcat ctgcctggtc gtggtcacc tggcaacctt gtccttgccc cggccctcct 720
tcagtttagt tgaggatacc acattagagc cagaagagcc accaaccaaa taccaaatct 780
ctcaaccaga agtgtacgtg gctgcgcag gggagtcgct agaggtgcgc tgctgttga 840
aagatgccgc cgtgatcagt tggactaagg atggggtgca cttggggccc aacaatagga 900
cagtgcttat tggggagtac ttgcagataa agggcgccac gcctagagac tccggcctct 960
atgcttgtac tgccagtagg actgtagaca gtgaaacttg gtacttcctg gtgaatgtca 1020
cagatgccat ctcatccgga gatgatgagg atgacaccga tggtgcgga gattttgtca 1080
gtgagaacag taacaacaag agagcaccat actggacca cagagaaaag atggaaaagc 1140
ggctccatgc tgtgcctgcg gccaacactg tcaagtttcg ctgccagcc ggggggaacc 1200
caatgccaac catgcgttgg ctgaaaaacg ggaaggagt taagcaggag catcgattg 1260
gaggctacaa ggtacgaaac cagcactgga gcctcattat ggaagtgtg gtcccatctg 1320
acaagggaat ttatacctgt gtagtgaga atgaatacgg gtccatcaat cacacgtacc 1380
acctggatgt tgtggagcga tcgcctcacc ggcccatcct ccaagccgga ctgccggcaa 1440
atgcctccac agtggtcgga ggagacgtag agtttgcctg caaggtttac agtgatgcc 1500
agccccacat ccagtggatc aagcacgtgg aaaagaacgg cagtaaatatc gggcccgacg 1560

```

```

ggctgccccta cctcaaggtt ctcaagcact cggggataaa tagttccaat gcagaagtgc 1620
tggctctgtt caatgtgacc gaggcggatg ctggggaata tatatgtaag gtctccaatt 1680
atataggggca ggccaaccag tctgcctggc tcaactgtcct gccaaaaacag caagcgcctg 1740
gaagagaaaaa ggagattaca gcttccccag actacctgga gatagccatt tactgcatag 1800
gggtcttctt aatcgccgtgt atggtggtaa cagtcatcct gtgccgaatg aagaacacga 1860
ccaagaagcc agacttcagc agccagccgg ctgtgcacaa gctgaccaa cgtatcccc 1920
tgcggagaca ggtaacagtt tcggctgagt ccagctcctc catgaactcc aacaccccc 1980
tgggtgaggat aacaacacgc ctctcttcaa cggcagacac ccccatgctg gcaggggtct 2040
ccgagtatga acttccagag gacccaaaat gggagtctcc aagagataag ctgacactgg 2100
gcaagccctt gggagaaggt tgctttgggc aagtggcat ggcggaagca gtgggaattg 2160
acaaagacaa gcccaaggag gcggtcaccg tggccgtgaa gatgttgaat gatgatgcca 2220
cagagaaaaga cctttctgat ctggtgtcag agatggagat gatgaagatg attgggaaac 2280
acaagaatat cataaatctt cttggagcct gcacacagga tgggctctc tatgtcatag 2340
ttgagtatgc ctctaaaggc aacctccgag aatacctccg agcccgagg ccacccggga 2400
tggagtactc ctatgacatt aacctgttct ctgaggagca gatgacctc aaggacttgg 2460
tgtcatgcac ctaccagctg gccagaggca tggagtactt ggcttcccaa aaatgtattc 2520
atcgagattt agcagccaga aatgttttgg taacagaaaa caatgtgatg aaaatagcag 2580
actttggact cgcagagat atcaacaata tagactatta caaaaagacc accaatgggc 2640
ggcttccagt caagtggat gctccagaag cctgttttga tagagtatac actcatcaga 2700
gtgatgtctg gtcttccggg gtgttaattg gggagatctt cactttaggg ggctgcctt 2760
acccagggat tcccgtagag gaacttttta agctgctgaa ggaaggacac agaattggata 2820
agccagccaa ctgcaccaac gaactgtaca tgatgatgag ggactgttgg catgcagtgc 2880
ctcccagag accaacgttc aagcagttgg tagaagactt ggatcgaaat ctactctca 2940
caaccaatga ggaatacttg gacctcagcc aacctctcga acagtattca cctagtacc 3000
ctgacacaa aagttctgtt tcttcaggag atgattctgt tttttctcca gaccccatgc 3060
cttacgaacc atgccttctc cagtatccac acataaacgg cagtgttaaa acatgaatga 3120
ctgtgtctgc ctgtcccaa acaggacagc actgggaacc tagctacact gagcagggag 3180
accatgcctc ccagagcttg ttgtctccac ttgtatatat ggatcagagg agtaataaat 3240
tggaagaata atcagcatat gtgtaaatgag ttatacagtt gaaaacttgt aatcttccc 3300
aggaggagaa gaagggttct ggagcagtg actgccacaa gccaccatgt aacctctc 3360
acctgcctg cgtactggct gtggaccagt aggactcaag gtggacgtgc gttctgcctt 3420
cctgttaaat tttgtaataa ttggagaaga tttatgtcag cacacactta cagagcacia 3480
atgcagtata taggtgctgg atgtatgtaa atatatcaa attatgtata aatataat 3540
atatatttac aaggagtatt tttttgtatt gattttaaat ggatgtccca atgcacctag 3600
aaaattggtc tctctttttt taatagctat ttgctaaatg ctgttcttac acataatttc 3660
ttaattttca ccgagcagag gtggaaaaat acttttgctt tcagggaaaa tgggtataacg 3720
tcaatttatt aataaattgg taatatacaa aacaattaat catttatagt tttttttgta 3780
atttaagtgg catttctatg caggcagcac agcagactag ttaatctatt gcttggactt 3840
aactagtatt cagatccttt gaaaagagaa tttttacaat atatgactaa tttggggaaa 3900
atgaagtttt gattttattg tgtttaaatg ctgctgtcag acgattgttc ttagacctcc 3960
taaagcccc atattaaaag aactcattca taggaagggtg ttcattttg gtgtgcaacc 4020
ctgtcattac gtcaacgcaa cgtctaactg gacttcccaa gataaatggg accagcgtcc 4080
tcttaaaaga tgccttaatc cattccttga ggacagacct tagttgaaat gatagcagaa 4140
tgtgtctctc tctggcagct ggccctctgc ttctgagttg cacattaatc agattagcct 4200
gtattctctt cagtgaattt tgataatggc ttccagactc tttggcgttg gagacgcctg 4260
ttaggatctt caagtcccat catagaaaat tgaacacag agttgttctg ctgatagttt 4320
tggggatacg tccatctttt taagggtattg ctttcatcta attctggcag gacctcacca 4380
aaagatccag cctcatacct acatcagaca aaatatcgcc gttgttcctt ctgtactaaa 4440
gtattgtgtt ttgcttttga aacacccact cactttgcaa tagccgtgca agatgaatgc 4500
agattacact gatcttatgt gttacaaaat tggagaaagt atttaataaa acctgttaat 4560
ttttatactg acaataaaaa tgtttctaca gatattaatg ttaacaagac aaaataaatg 4620
tcacgcaact tattttttta ataaaaaaa aaaaaaa 4657

```

<210> 132
 <211> 2781
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

```

<400> 132
tgactgcagc agcagcggca gcgcctcggg tcttgagccc accgcaggct gaaggcattg 60
cgctagctcc atgcccctag aggaagtgtg cagatgggat taacgtccac atggagatat 120
ggaagaggac cggggatttg taccgtaacc atggtcagct ggggtcgttt catctgcctg 180
gtcgtggtca ccatggcaac cttgtccctg gcccgccctt ccttcagttt agttgaggat 240

```

```

accacattag agccagaaga gccaccaacc aaataccaaa tctctcaacc agaagtgtac 300
gtggctgctc caggggagtc gctagagggt cgctgcctgt tgaagatgc cgccgtgatc 360
agtttgacta aggatggggt gcacttgggg cccaacaata ggacagtgtc tattggggag 420
tacttgcaga taaagggcgc cacgcctaga gactccggcc tctatgcttg tactgccagt 480
aggactgtag acagtgaaac ttggtacttc atggtgaatg tcacagatgc catctcatcc 540
ggagatgatg aggatgacac cgatggtgct gaagattttg tcagttagaa cagtaacaac 600
aagagagcac catactggac caacacagaa aagatggaaa agcgggtcca tgctgtgcct 660
gcggccaaca ctgtcaagtt tcgctgccca gccgggggga acccaatgcc aaccatgcgg 720
tggtgaaaaa acgggaagga gtttaagcag gagcatcgca ttggaggcta caaggtacga 780
aaccagcact ggaacctcat tatggaaagt gtggtcccat ctgacaaggg aaattatacc 840
tgtgtagtgg agaataaata cgggtccatc aatcacacgt accacctgga tgttgtggag 900
cgatcgcttc accggcccat cctccaagcc ggactgccgg caaatgcctc cacagtggtc 960
ggaggagacg tagagtttgt ctgcaaggtt tacagtgtatg ccagcccca catccagtgg 1020
atcaagcacg tggaaaagaa cggcagtaaa tacgggcccc acgggctgcc ctacctcaag 1080
gttctcaagc actcggggat aaatagtctc aatgcagaag tgctggctct gttcaatgtg 1140
accgagggcg atgctgggga atatatatgt aaggtctcca attatatagg gcaggccaac 1200
cagtctgcct ggctcactgt cctgccaaaa cagcaagcgc ctggaagaga aaaggagatt 1260
acagcttccc cagactacct ggagatagcc atttactgca taggggtctt cttaatcgcc 1320
tgtatggtag taacagtcat cctgtgccga atgaagaaca cgaccaagaa gccagacttc 1380
agcagccagc cggctgtgca caagctgacc aaacgtatcc cctgcccagg acaggtaca 1440
gtttcggctg agtccagctc ctccatgaac tccaacaccc cgctggtgag gataacaaca 1500
cgctctcttc caacggcaga caccoccatg ctggcagggg tctccagta tgaacttcca 1560
gaggacccaa aatgggagtt tccaagagat aagctgacac tgggcaagcc cctgggagaa 1620
ggttgtcttg ggcaagtgg catggcggaa gcagtgggaa ttgacaaaga caagcccaag 1680
gaggcggtca cctggccgtg gaagatgttg aaagatgatg ccacagagaa agacctttct 1740
gatctggtgt cagagattga gatgatgaag atgattggga aacacaagaa tatcataaat 1800
cttcttgtag cctgcacaca ggatgggctt ctctatgtca tagttgagta tgctctaaa 1860
ggcaaccttc gagaatacct ccgagcccg atgagagta aggccaccgg ggatggagta ctctatgac 1920
attaacctgt ttcttgagga gcagatgacc tccaaggact tgggtgatg cacctaccag 1980
ctggccagag gcatggagta cttggcttcc caaaaatgta ttcacagaga tttagcagcc 2040
agaaatgttt tggtaacaga aaacaatgtg atgaaaatag cagactttgg actcgcaga 2100
gatatacaaa atatagacta ttacaaaaag accaccaatg ggccgcttcc agtcaagtgg 2160
atggctccag aagccctgtt tgatagagta tacactcatc agagtgtatg ctggtcttcc 2220
ggggtgttaa tgtgggagat cttcacttta gggggtctgc cctacccagg gattcccggt 2280
gaggaacttt ttaagctgct gaaggaagga cacagaatgg ataagccagc caactgcacc 2340
aacgaactgt acatgatgat gagggactgt tggcatgcag tgccctccca gagaccaacg 2400
ttcaagcagt tggtagaaga cttggatcga attctcactc tcacaaccaa tgagatctga 2460
aagtttatgg ctctcattgag aaactgggaa aagttggtca ggcgcagtgg ctcatgcctg 2520
taatccagc actttgggag gccagggcag gcggtatcat aggtcaggag ttccagacca 2580
gcctggccaa ctgggtgaaa ccctgtctct actaaaagata caaaaaatta gccgggctg 2640
ttggtgtgca cctgtaatcc cagctactcc gggaggctga ggcaggagag tcaactgaac 2700
cggggaggcg gaggttgtag tgagccgaga tcatgccatt gcattccagc cttggcgaca 2760
gagcgagact ccgtctcaaa a

```

```

<210> 133
<211> 3821
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 133
tgactgcagc agcagcggca gcgcctcggt tcttgagccc accgcaggct gaaggcattg 60
cgctgagctc atgcccgtag aggaagtgtg cagatgggat taacgtccac atggagatat 120
ggaagaggac cggggatttg taccgttaacc atggtcagct ggggtcgttt catctgcctg 180
gtcgtgggtc ccatggcaac cttgtccctg gcccgccctt ccttcagttt agttgaggat 240
accacattag agccagaaga gccaccaacc aaataccaaa tctctcaacc agaagtgtac 300
gtggctgctc caggggagtc gctagagggt cgctgcctgt tgaagatgc cgccgtgatc 360
agtttgacta aggatggggt gcacttgggg cccaacaata ggacagtgtc tattggggag 420
tacttgcaga taaagggcgc cacgcctaga gactccggcc tctatgcttg tactgccagt 480
aggactgtag acagtgaac ttggtacttc atggtgaatg tcacagatgc catctcatcc 540
ggagatgatg aggatgacac cgatggtgct gaagattttg tcagttagaa cagtaacaac 600
aagagagcac catactggac caacacagaa aagatggaaa agcgggtcca tgctgtgcct 660
gcggccaaca ctgtcaagtt tcgctgccca gccgggggga acccaatgcc aaccatgcgg 720
tggtgaaaaa acgggaagga gtttaagcag gagcatcgca ttggaggcta caaggtacga 780

```

```

aaccagcact ggagcctcat tatggaagt gtggtcccat ctgacaagg aaattatacc 840
tgtgtagtgg agaataaata cgggtccatc aatcacacgt accacctgga tgttgtggcg 900
cctggaagag aaaaggagat tacagcttcc ccagactacc tggagatagc catttactgc 960
ataggggtct tcttaatcgc ctgtatgggt gtaacagtca tctgtgccc aatgaagaac 1020
acgaccaaga agccagactt cagcagccag cgggtgtgac acaagctgac caaacgtatc 1080
ccctgcgga gacaggtaac agtttcggct gagtccagct cctccatgaa ctccaacacc 1140
cgctgtgtga ggataacaac acgcctctct tcaacggcag acaccccat gctggcaggg 1200
gtctccgagt atgaacttcc agaggaccga aatgggagt ttccaagaga taagctgaca 1260
ctgggcaagc cctggggaga aggttgcttt gggcaagtgg tcatggcgga agcagtggga 1320
attgacaaag acaagcccaa ggagcggtc accgtggcgg tgaagatggt gaaagatgat 1380
gccacagaga aagaccttcc tgatctgggt tcagagatgg agatgatgaa gatgattggg 1440
aaacacaaga atatcataaa tcttcttggg gcctgcacac aggatgggccc tctctatgct 1500
atagttgagt atgcctctaa aggcaacctc cgagaatacc tccgagcccc gaggccaccc 1560
gggatggagt actcctatga cattaaccgt gttcctgagg agcagatgac ctccaaggac 1620
ttggtgtcat gcacctacca gctggccaga ggcattggagt acttggcttc ccaaaaatgt 1680
attcatcgag atttagcagc cagaaatggt ttggtaacag aaaacaatgt gatgaaaata 1740
gcagactttg gactcgcag agatatcaac aatatagact attacaaaaa gaccaccaat 1800
ggggcgcttc cagtcaagt gatggctcca gaagccctgt ttgatagagt atacactcat 1860
cagagtgtat tctgggtcct cgggtgttta atgtgggaga tcttctactt agggggctcg 1920
ccctacccag ggattcccg ggaggaaact tttaagctgc tgaagggaagg acacagaatg 1980
gataagccag ccaactgcac caacgaactg tacatgatga tgagggactg ttggcatgca 2040
gtgccctccc agagccaac gttcaagcag ttggtagaag acttggatcg aattctcact 2100
ctcacacca atgagggaata cttggacctc agccaacctc tcgaacagta ttcacctagt 2160
tacctgaca caagaagttc ttgttcttca ggagatgatt ctgttttttc tccagacccc 2220
atgccttacg aaccatgcct tctcagtat ccacacataa acggcagtggt taaaacatga 2280
atgactgtgt ctgcctgtcc ccaaacagga cagcactggg aacctagcta cactgagcag 2340
ggagaccatg cctcccagag cttgtgtct ccacttgat atattggatca gaggagtaaa 2400
taattggaaa agtaatcagc atattgttaa agatttatac agttgaaaaa ttgtaatctt 2460
ccccaggagg agaagaaggt ttctggagca gtggactgcc acaagccacc atgtaacccc 2520
tctcactgct cgtgcgtact ggctgtggac cagtaggact caaggtggac gtgcgttctg 2580
ccttccttgt taattttgta ataattggag aagatttatg tcagcacaca cttacagagc 2640
acaaatgcag tatataggtg ctggatgat gtaaatatat tcaaattatg tataaatata 2700
tattatata ttacaaggag ttattttttg tattgatttt aatggatgt ccaatgcac 2760
ctagaaaatt ggtctctctt ttttaatag ctatttgcta aatgctgttc ttacacataa 2820
tttcttaatt ttaccgcagc agaggtggaa aaatactttt gctttcaggg aaaaatggat 2880
aacgttaatt tattaataaa ttgtaatat acaaaaacaat taatcattta tagttttttt 2940
tgtaatttaa gtggcatttc tatgcaggca gcacagcaga ctagttaatc tattgcttgg 3000
acttaactag ttatcagatc ctttgaagg agaataatta caatatatga ctaatttggg 3060
gaaaatgaag ttttgattta tttgtgttta aatgctgctg tcagacgatt gttcttagac 3120
ctcctaaatg ccccatatta aaagaactca ttoataggaa ggtgttccat tttggtgtgc 3180
aaccctgtca ttaogtcaac gcaacgtcta actggaactc ccaagataaa tgggtaccagc 3240
gtcctcttaa aagatgcctt aatccattcc ttgaggacag acctagtttg aaatgatagc 3300
agaatgtgct tctctctggc agctggcctt ctgctctgga gttgcacatt aatcagatta 3360
gcctgtattc tcttcagtga attttgataa tggcttccag actccttggc gttggagacg 3420
cctgttagga tcttcaagtc ccatcataga aaattgaaac acagagtgtg tctgctgata 3480
gttttgggga tacgtccatc tttttaaggg attgctttca tctaattctg gcaggacctc 3540
accaaaagat ccagcctcat acctacatca gacaaaatat cgccgttgtt ccttctgtac 3600
taaagtattg tgttttgctt tggaacacc cactcacttt gcaatagccg tgcaagatga 3660
atgcagatta cactgatctt atgtgttaca aaattggaga aagtatttaa taaaacctgt 3720
taatttttat actgacaata aaaaatgttc tacagatatt aatgttaaca agacaaaata 3780
aatgtcacgc aacttatttt ttttaataaa aaaaaaaaaa a 3821

```

<210> 134
 <211> 3708
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

```

<400> 134
aatttgggtga ggaatttccc cctagccttg accccttgac agctcccgct cctactcagt 60
gctgggggaga agtagggagg ccttaagcga agagatgggt ctgcactttg gaggagccgg 120
acactgttga ctttctctgat gtgaaatcta cccaggaaca aaacaccagt gactgcagca 180
gcagcggcag cgctcgggtt cctgagccca ccgcaggctg aaggcattgc gcgtagtcca 240
tgcccgtaga ggaagtgtgc agatgggatt aacgtccaca tggagatatg gaagaggacc 300

```



```

ggggattggt accgtaacca tgggtcagctg ggggtcgtttc atctgcctgg tcgtgggtcac 360
catggcaacc ttgtccctgg cccggccctc cttcagttta gttgaggata ccacattaga 420
gccagaagat gccatctcat ccggagatga tgaggatgac accgatggtg cggaagattt 480
tgtcagttag aacagtaaca acaagagagc accatactgg accaacacag aaaagatgga 540
aaagcggctc catgctgtgc ctgcccga cactgtcaag ttctgctgcc cagccggggg 600
gaacccaatg ccaaccatgc ggtggctgaa aaacgggaag gagtttaagc aggagcatcg 660
cattggaggc tacaaggtag gaaaccagca ctggagcctc attatggaaa gtgtgggtccc 720
atctgacaag ggaattata cctgtgtagt ggagaatgaa tacgggtcca tcaatcacac 780
gtaccacctg gatgttgtgg agcgatcgcc tcaccggccc atcctccaag ccggactgcc 840
ggcaaatgcc tcacacagtg tcggaggaga cgtagagttt gtctgcaagg ttacagtga 900
tgcccagccc cacatccagt ggatcaagca cgtggaaaag aacggcagta aatacggggc 960
cgacgggctg ccctacctca aggttctcaa ggccgcccgt gttaacacca cggacaaaaga 1020
gattgagggt ctctatatcc ggaatgtaac ttttgaggac gctggggaat atactgtctt 1080
ggcgggtaat tctattggga tatcctttca ctctgcatgg ttgacagtcc tgccagcgcc 1140
tggaagagaa aaggagatta cagcttcccc agactacctg gagatagcca ttactgcat 1200
aggggtcttc ttaatgcctc gtatgggtgt aacagtcac ctgtgccgaa tgaagaacac 1260
gaccaagaag ccagacttca gcagccagcc ggctgtgcac aagctgacca aacgtatccc 1320
cctgcggaga caggaacag tttcggtgta gtccagctcc tccatgaact ccaacacccc 1380
gctggtgagg ataacaacac gcctctcttc aacggcagac acccccatgc tggcagggtt 1440
ctccgagtat gaacttccag aggacccaaa atgggagttt ccaagagata agctgacact 1500
gggcaagccc ctgggagaag gttgctttgg gcaagtggtc atggcggaag cagtgggaat 1560
tgaccaagac aagcccgaag aggcgggtcac cgtggccgtg aagatgttga aagatgatgc 1620
cacagagaaa gacctttctg atctgggtgc agagatggag atgatgaaga tgattgggaa 1680
acacaagaat atcataaatc ttcttggagc ctgcacacag gatgggcctc tctatgtcat 1740
agttgagtat gcccttaag gcaacctccg agaatacctc cgagcccgga ggccaccccg 1800
gatggagtag tctatgaca ttaaccgtgt tcttgaggag cagatgacct tcaaggactt 1860
ggtgtcatgc acctaccagc tggccagagg catggagtac ttggcttccc aaaaatgtat 1920
tcatcgagat tttagcagca gaaatgtttt ggtaacagaa aacaatgtga tgaaaatagc 1980
agactttgga ctgcagag atatacaaa tatagactat tacaanaaga ccaccaatgg 2040
gcggcttcca gtcaagtgga tggctccaga agccctgttt gatagagtat aactcatca 2100
gagtgtatgc tggctcttcg ggggtttaat gtgggagatc ttacttttag ggggtctgcc 2160
ctaccagggg attcccgtgg aggaactttt taagctgctg aaggaaggac acagaatgga 2220
taagccagcc aactgcacca acgaactgta catgatgat agggactggt ggcagcgagt 2280
gcctcccag agaccaacgt tcaagcagtt ggtagaagac ttggatcgaa ttctactct 2340
cacaaccaat gaggaggaga agaaggtttc tggagcagtg gactgccaca agccacctg 2400
taacccctct cacctccgtg gcgtactggc tgtggaccag taggactcaa ggtggacgtg 2460
cgttctgctc tcttgttaa ttttgaata attggagaag atttatgtca gcacacactt 2520
acagagcaca aatgcagtat ataggtgtg gatgtatgta aatatattca aattatgtat 2580
aaatatatat tatatattta caaggagtta ttttttgtat tgattttaaa tggatgtccc 2640
aatgcaacta gaaaattggg ctctcttttt ttaatagcta ttgtctaaat gctgttctta 2700
cacataatth cttaattttc accgagcaga ggtggaaaaa tacttttctt ttcagggaaa 2760
atgggtataac gtttaatttat taataaattg gtaatatata aaacaattaa tcatttatag 2820
ttttttttgt aattttaagt gcaatttctat gcaggcagca cagcagacta gttaatctat 2880
tgcttggaact taactagtta tcagatcctt tgaaaagaga atatttacia tatatgacta 2940
atthggggaa aatgaagttt tgatttattt gtgtttaaat gctgctgtca gacgattgtt 3000
cttagacctc ctaaatgccc catattaaaa gaactcattc ataggaagggt gtttcatttt 3060
ggtgtgcaac cctgtcatta cgtcaacgca acgtctaaact ggaacttccc agataaatgg 3120
taccagcgtc ctcttaaaag atgccttaat ccattccttg aggacagacc ttagttgaaa 3180
tgatagcaga atgtgcttct ctctggcagc tggccttctg ctctgagtt gcacattaat 3240
cagattagcc tgtattctct tcagtgaatt ttgataatgg cttccagact ctttggcggt 3300
ggagacgcct gttaggatct tcaagtecca tcatagaaaa ttgaaacaca gaggttgtct 3360
gctgatagtt ttggggatac gtccatcttt ttaagggtatt gctttcatct aattctggca 3420
ggacctcacc aaaagatcca gcctcatacc tacatcagac aaaaatctgc cgttgttctt 3480
tctgtactaa agtatttgtt tttgctttgg aaacacccac tcactttgca atagccgtgc 3540
aagatgaatg cagattacac tgatcttatg tgttcaaaaa ttggagaaag tatttaataa 3600
aacctgttaa tttttatact gacaataaaa atgtttctac agatattaat gtttaacaaga 3660
caaaaataat gtcacgcaac ttattttttt aataaaaaaa aaaaaaaa 3708

```

```

<210> 135
<211> 4103
<212> ДНК
<213> Хомо сапієнс

```

<400> 135

```

gagcacacat tgcctcactg aagtggctgc acgtatctga gtcctgtago tactgtttta 60
tctctgtttc ttaaaagtat gcttttataa agattagcct cacacatttc tgtggaccgg 120
tctgggtgga tcacctggga ctctgagggt aggatggaag gatttagcag ataataaaaa 180
agaactctgt ttgcgcacat ttgagaggct gaaaaatggt tttatcccac ttgggctgga 240
gtgatttggc attggggaag attccctgac tcgccaatct ctttctttaa gtgactgcag 300
cagcagcggc agcgcctcgg ttccctgagcc caccgcaggc tgaaggcatt gcgcgtagtc 360
catgccogta gaggaagtgt gcagatggga ttaacgtcca catggagata tggaaaggga 420
ccggggattg gtaccgtaac catggtcagc tggggctcgt tcatctgcct ggtcgtggtc 480
accatggcaa ccttgtccct ggcccgcccc tccctcagtt tagttgagga taccacatta 540
gagccagaag gagcaccata ctggaccaac acagaaaaga tggaaaagcg gctccatgct 600
gtgcctgccc ccaacactgt caagtttcgc tgcccagccg gggggaaccc aatgccaacc 660
atgcggtggc tgaanaacgg gaaggagttt aagcaggagc atcgcatagg aggctacaag 720
gtacgaaac agcactggag cctcattatg gaaagtgtgg tcccatctga caagggaat 780
tatacctgtg tagtgagaaa tgaatcaggg tccatcaatc acacgtacca cctggatgtt 840
gtggagcgat cgctcaccg gcccatcctc caagccggac tgccggcaaa tgccctccca 900
gtgggtcgag gagacgtaga gtttgtctgc aaggtttaca gtgatgcca gccccacatc 960
cagtggatca agcacgtgga aaagaacggc agtaaatagc ggcccgacgg gctgccctac 1020
tcaagggttc tcaaggccgc cgggtttaac accacggaca aagagattga ggttctctat 1080
attcggaatg taacttttga ggacgctggg gaataatcgt gcttggcggg taattctatt 1140
gggatatcct ttactctgc atggttgaca gttctgccag cgcttggaag agaaaaggag 1200
attacagctt cccagacata cctggagata gccatttact gcatagggtt cttcttaatc 1260
gcctgtatgg tgtaacagt catcctgtgc cgaatgaaga acacgaccaa gaagccagac 1320
ttcagcagcc agccggctgt gcacaagctg accaaacgta tccccctcgg gagacaggta 1380
acagtttcgg ctgagtcagg ctctctccatg aactccaaca ccccgctggt gaggataaca 1440
acacgcctct cttcaacggc agacaccccc atgctggcag ggtctccga gtatgaactt 1500
ccagaggacc caaaatggga gtttccaaga gataagctga cactgggcaa gccctggga 1560
gaaggttgct ttgggcaagt ggtcatggcg gaagcagtg gaattgacaa agacaagccc 1620
aaggaggcgt tcaccgtggc cgtgaagatg ttgaaagatg atgccacaga gaaagacctt 1680
tctgatctgg tgcagagat ggagatgatg aagatgatgg ggaacacaaa gaatatcata 1740
aatcttcttg gagcctgcac acaggatggg cctctctatg tcatagttag gtatgcctct 1800
aaaggcaacc tccgagaata cctccgagcc cggaggccac ccgggatgga gtactcctat 1860
gacattaacc gtgttccctg ggagcagatg acctcaagg acttgggtgc atgcacctac 1920
cagctggcca gaggcattga gtacttggct tccccaaat gtattcatcg agatttagca 1980
gccagaaatg ttttgtaac agaaaacaat gtgatgaaaa tagcagactt tggactcgcc 2040
agagatatca acaatataga ctattacaaa aagaccacca atgggcggct tccagtcaag 2100
tgagatggct cagaagccct gtttgataga gtatacactc atcagagtga tgtctggtcc 2160
ttcggggtgt taatgtggga gatcttccat ttagggggct cgcctacccc agggattccc 2220
tgaggaggaa tttttaagct gctgaaggaa ggacacagaa tggataagcc agccaactgc 2280
accaacgaac gtacatgat gatgaggac tgttggcatg cagtgccttc ccagagacca 2340
acgttcaagc agttggtaga agacttggat cgaattctca ctctcacaac caatgaggaa 2400
tacttggacc tcagccaacc tctcgaacag tattcaccta gttaccctga cacaagaagt 2460
tcttgttctt caggagatga ttctgttttt tctccagacc ccatgcctta cgaaccatgc 2520
cttctcagct atccacacat aaacggcagt gttaaaaatc gaatgactgt gtctgcctgt 2580
ccccaaacag gacagcactg ggaacctagc tacactgagc agggagacca tgccctcccag 2640
agcttgttgt ctccacttgt atatatggat cagaggagta aataattgga aaagtaatca 2700
gcatatgtgt aaagatttat acagtggaaa acttgtaatc ttcccagga ggagaagaag 2760
gtttctggag cagtggactg ccacaagcca ccatgtaacc cctctcactt gccgtgcgta 2820
ctggctgtgg accagtagga ctcaagggtg acgtgcgttc tgcttccctt gtttaattttg 2880
taataattgg agaagattta tgtcagcaca cacttacaga gcacaaatgc agtatatagg 2940
tgctggatgt atgtaaatat attcaaatg tgtataaata tatattatat atttacaagg 3000
agttattttt tgtattgatt ttaaatggat gtcccaatgc acctagaaaa ttggtctctc 3060
tttttttaat agctatttgc taaatgctgt tcttacacat aatttcttaa ttttcaccga 3120
gcagagggtg aaaaaactt ttgttttcag ggaaaaatgt ataactgtta tttattaata 3180
aattggtaat atacaaaaca ataatcatt tatagttttt ttgttaattt aagtggcatt 3240
tctatgcagg cagcacagca gactagttaa tctattgctt ggacttaact agttatcaga 3300
tcctttgaaa agagaatatt tacaatatat gactaatttg gggaaaaatga agttttgatt 3360
tatttgtgtt taaatgctgc tgtcagacga ttgttcttag acctcctaaa tgccccatat 3420
taaaagaact cattcatagg aaggtgtttc atttttggtg gcaacccctg cattacgtca 3480
acgcaacgct taactggact tcccaagata aatggtacca gcgtcctctt aaaagatgcc 3540
ttaatccatt ccttgaggac agaccttagt tgaatatgata gcagaatgtg cttctctctg 3600
gcagctggcc ttctgcttct gagttgcaca ttaatcagat tagcctgtat tctcttcagt 3660
gaattttgat aatggcttcc agactctttg gcgttgagga cgctgttag gatcttcaag 3720

```

```

tcccatcata gaaaattgaa acacagagtt gttctgctga tagttttggg gatacgtcca 3780
tctttttaag ggattgcttt catctaattc tggcaggacc tcacccaaaag atccagcctc 3840
atacctacat cagacaaaat atcgccgttg ttccttctgt actaaagtat tgtgttttgc 3900
tttggaacaa cccactcact ttgcaatagc cgtgcaagat gaatgcagat tacactgac 3960
ttatgtgtta caaaattgga gaaagtattt aataaaacct gttaattttt atactgacaa 4020
taaaaatggt tctacagata ttaatgttaa caagacaaaa taaatgtcac gcaacttatt 4080
tttttaataa aaaaaaaaaa aaa 4103

```

```

<210> 136
<211> 4306
<212> ДНК
<213> Хомо сапиенс

```

```

<400> 136
ggcggcggtt ggaggagagc gcggtggaga gccgagcggg cggcgcgcggt gtgcggagcg 60
ggcgaaggag cgcgcgcggc cgcacaaaag ctccggcgcc gcggggctgc atgcggcgta 120
cctggcccg cgcgcgcgact gctctccggg ctggcggggg cggcgccgga gccccggggg 180
ccccgaggcc gcagcttgcc tgcgcgctct gagccttcgc aactcgcgag caaagtttgg 240
tggaggcaac gccaaagcctg agtcctttct tctctcgtt ccccaaatcc gagggcagcc 300
cgcgggcgctc atgcccgcgc tctcgcgag cctggggtac gctggaagcc cgggaggcct 360
ggcgccggcg aagaccgaag gaccactctt ctgcgtttgg agttgctccc cgcaaccccg 420
ggctcgtcgc tttctccatc ccgaccacg cggggcgcggt ggacaacaca ggtcgcggag 480
gagcgttgcc attcaagtga ctgcagcagc agcggcagcg cctcggttcc tgagccacc 540
gcaggctgaa ggcatctgcg gtagtcacat ccgtagagg aagtgtgcag atgggattaa 600
cgtccacatg gagatatgga agaggaccgg ggattggtac cgtaacatg gtcagctggg 660
gtcgtttcat ctcctgtggt gtggtcacca tggcaacctt gtccttgcc cgccctcct 720
tcagtttagt tggagatacc acattagagc cagaagagcc accaaccaaa taccaaatct 780
ctcaaccaga agtgtagctg gctgcgcgag gggagtcgct agaggtgcgc tgcctgttga 840
aagatgccgc cgtgatcagt tggactaagg atgggtgca cttggggccc aacaatagga 900
cagtgtctat tggggagtac ttgcagataa agggcgccac gcttagagac tccggcctct 960
atgcttgtac tgccagtagg actgtagaca gtgaaacttg gtagtctcat gtgaatgtca 1020
cagatgccat ctcatccgga gatgatgagg atgacaccga tgggtgcgaa gattttgtca 1080
gtgagaacag taacaacaag agagcaccat actggaccaa cacagaaaag atggaaaagc 1140
ggctccatgc tgtgcctgcg gccaaactg tcaagtttcg ctgccagcc ggggggaacc 1200
caatgccaac catgcggtgg ctgaaaaacg ggaaggagtt taagcaggag catcgattg 1260
gaggctacaa ggtacgaaac cagcactgga gctcattat ggaaagtgtg gtcccatctg 1320
acaaggaaaa ttatacctgt gtagtggaga atgaatacgg gtccatcaat cacacgtacc 1380
acctggtgt tgtggagcga tcgcctcacc ggccatcct ccaagccgga ctgccggcaa 1440
atgcctccac agtggctcga ggagacgtag agtttgtctg caaggtttac agtgatgcc 1500
agccccacat ccagtggatc aagcacgtgg aaaagaacgg cagtaataac gggcccgacg 1560
ggctgccta cctcaagggt ctcaagggtt cggtgagtc cagctcctcc atgaaactca 1620
acaccccgct ggtgaggata acaaacgcgc tctcttcaac ggagacacc ccatgctgg 1680
caggggtctc cgagtatgaa cttccagagg acccaaatg ggagtttcca agagataagc 1740
tgacactggg caagccctcg ggagaagggt gctttgggca agtgggtcat gcggaagcag 1800
tgggaattga caaagacaag ccaaggagg cggtcaccgt ggccgtgaag atgttgaaag 1860
atgatgccac agagaaaagc ctttctgatc tgggtgcaga gatggagatg atgaagatga 1920
ttgggaaca caagaatctc ataatcttc ttggagcctg cacacaggat gggcctctct 1980
atgtcatagt ttagtatgcc tctaaaggca acctccgaga atacctcca gcccgaggc 2040
caccgggat ggagtactcc tatgacatta accgtgttcc tgaggagcag atgacctca 2100
aggacttgggt gtcatgcacc taccagctgg ccagaggcat ggagtacttg gcttccaaa 2160
aatgtattca tcgagattta gcagccagaa atgttttgg aacagaaaac aatgtgatga 2220
aaatagcaga ctttggactc gccagagata tcaacaatat agactattac aaaaagacca 2280
ccaatggcg gcttcagtc aagtggatgg ctccagaagc cctgtttgat agagtataca 2340
ctcatcagag tgatgtctgg tcttcgggg tgtaaatgtg ggagatcttc actttagggg 2400
gctcgccta cccagggatt cccgtggagg aactttttaa gctgctgaag gaaggacaca 2460
gaatggataa gccagccaac tgcaccaacg aactgtacat gatgatgagg gactgttggc 2520
atgcagtgcc ctcccagaga ccaacgttca agcagtttgt agaagacttg gatcgaatto 2580
tactctcac aaccaatgag gaatacttgg acctcagcca acctctcga cagtattcac 2640
ctagttaccc tgacacaaga agttcttgtt ctccaggaga tgattctgtt ttttctccag 2700
accccatgcc ttacgaacca tgccttcttc agtatccaca cataaacggc agtgttaaaa 2760
catgaatgac tgtgtctgcc tgtcccaaaa caggacagca ctgggaacct agctacactg 2820
agcagggaga ccatgcctcc cagagcttgt tgtctccact tgtatatatg gatcagagga 2880
gtaaataatt ggaagagtaa tcagcatatg tgtaagatt tatacagttg aaaacttgta 2940

```

```

atcttcccca ggaggagaag aaggtttctg gagcagtgga ctgccacaag ccaccatgta 3000
acctctctca cctgccgtgc gtactggctg tggaccagta ggactcaagg tggacgtgcg 3060
ttctgccttc cttgtttaatt ttgtaataat tggagaagat ttatgtcagc acacacttac 3120
agagcacaaa tgcagtatat aggtgctgga tgtatgtaaa tatattcaaa ttatgtataa 3180
atataatta tatatttaca aggagtattt ttttgattg attttaaatg gatgtcccaa 3240
tgcacctaga aaattggtct ctcttttttt aatagctatt tgctaaatgc tgttcttaca 3300
cataatttct taattttcac cgagcagagg tggaaaaata cttttgcttt cagggaaaaat 3360
ggtataacgt taattttatta ataaattggt aatatacaaa acaattaatc atttatagtt 3420
ttttttgtaa ttaagtggc atttctatgc aggcagcaca gcagactagt taatctattg 3480
cttggactta actagttatc agatcctttg aaaagagaat atttacaata tatgactaat 3540
ttggggaaaa tgaagttttg atttatttgt gtttaaatgc tgctgtcaga cgattgttct 3600
tagacctcct aaatgcccca tattaaaaa actcattcat aggaagggtg ttcattttgg 3660
tgtgcaaccc tgtcattacg tcaacgcaac gtctaactgg acttcccaag ataaatggta 3720
ccagcgtcct cttaaaagat gccttaatcc attccttgag gacagacctt agttgaaatg 3780
atagcagaat gtgcttctct ctggcagctg gccttctgct tctgagttgc acattaatca 3840
gattagcctg tattctcttc agtgaatttt gataatggct tccagactct ttggcgttgg 3900
agacgcctgt taggatcttc aagtcctatc atagaaaatt gaaacacaga gttgttctgc 3960
tgatagtttt ggggatcacg ccatcttttt aagggattgc ttcatctaa ttctggcagg 4020
acctcaccaa aagatccagc ctcatacctg catcagacaa aatatcgccg ttgttcttc 4080
tgtactaaag tattgtgttt tgctttgaa acaccactc actttgcaat agccgtgcaa 4140
gatgaatgca gattacactg atcttatgtg ttacaaaatt ggagaaagta tttataaaaa 4200
cctgttaatt ttataactga caataaaaaat gtttctacag atattaatgt taacaagaca 4260
aaataaatgt cacgcaactt atttttttaa taaaaaaaaa aaaaaa 4306

```

<210> 137

<211> 4303

<212> ДНК

<213> Хомо сапієнс

<400> 137

```

ggcgcgcggt ggaggagagc gcggtggaga gccgagcggg cggcgcgcggt gtgcggagcg 60
ggcgagggag cgcgcgcggc cgccacaaag ctcgggcgcc gcggggctgc atgcggcgta 120
cctggcccg gcgggcgact gctctccggg ctggcggggg ccggcccgca gccccggggg 180
ccccgaggcc gcagcttgcc tgcgcgctct gagccttcgc aactcgcgag caaagtttgg 240
tggaggcaac gccaaagcctg agtctcttct tcctctcgtt ccccaaatcc gagggcagcc 300
cgcgggcgct atgcccgcgc tcctccgca gctgggttac gcgtgaagcc cgggagggct 360
ggcgccggcg aagacccaag gaccactctt ctgcgtttgg agttgctccc cgcaaccccg 420
ggctcgtcgc ttctccatc ccgacccacg cggggcgcg ggacaacaca ggtcgcggag 480
gagcgttgcc attcaagtga ctgcagcagc agcggcagcg cctcggttcc tgagcccacc 540
gcaggtgaa ggcatctgcg gtatccatg ccogtagagg aagtgtgcag atgggattaa 600
cgtccacatg gagatatgga agaggaccgg ggattggtac cgtaacatg gtcagctggg 660
gtcgtttcat ctgcctggtc gtgtgcacca tggcaacctt gtcctggcc cggccctcct 720
tcagtttagt tgaggatacc acattagagc cagaaggagc accatactgg accaacacag 780
aaaagatgga aaagcggctc catgctgtgc ctgcggccaa cactgtcaag ttctcgtgcc 840
cagccggggg gaacccaatg ccaaccatgc ggtgctgaa aaacgggaag gagttaagc 900
aggagcatcg cattggaggc tacaaggtag gaaaccagca ctggagcctc attatggaaa 960
gtgtggtccc atctgacaag ggaaattata cctgtgtagt ggagaatgaa tacgggtcca 1020
tcaatcacac gtaccacctg gatgttgtgg agcgatcgcc tcaccggccc atcctccaag 1080
ccggactgcc ggcaaatgcc tccacagtgg tcggaggaga cgtagagttt gtctgcaagg 1140
tttacagtga tgcccagccc cacatccagt ggcataagca cgtggaaaag aacggcagta 1200
aatacggggc cgacgggctg ccctacctca aggtttctca ggccgcgggt gttaacacca 1260
cggacaaaaga gattgaggtt ctctatatcc ggaatgtaac ttttgaggac gctggggaat 1320
atacgtgctt ggcgggtaat tctattggga tatcctttca ctctgcatgg ttgacagttc 1380
tgccagcgcc tggaaagaaa aaggagatta cagcttcccc agactacctg gagatagcca 1440
tttactgcat aggggtcttc ttaatcgcc gtatggtggt aacagtcac ctgtgccgaa 1500
tgaagaacac gaccaagaag ccagacttca gcagccagcc ggctgtgcac aagctgacca 1560
aacgtatccc cctgcggaga cagggttcgg ctgagtcag ctctccatg aactccaaca 1620
ccccgctggt gaggataaca acacgcctct cttcaacggc agacaccccc atgctggcag 1680
gggtctccga gtatgaactt ccagaggacc caaaatggga gtttccaaga gataagctga 1740
cactgggcaa gccctggga gaaggttgct ttgggcaagt ggtcatggcg gaagcagtgg 1800
gaattgacaa agacaagccc aaggaggcgg tcaccgtggc cgtgaagatg ttgaaagatg 1860
atgccacaga gaaagacctt tctgatctgg tgtcagagat ggagatgatg aagatgattg 1920
ggaaacacaa gaatatcata aatcttcttg gagcctgcac acaggatggg cctctctatg 1980

```

tcatagtgtga	gtatgcctct	aaaggcaacc	tccgagaata	cctccgagcc	cggaggccac	2040
ccgggatgga	gtactcctat	gacattaacc	gtgttctctga	ggagcagatg	accttcaagg	2100
acttggtgtc	atgcacctac	cagctggcca	gaggcatgga	gtacttggct	tcccaaaaat	2160
gtattcateg	agatttagca	gccagaaatg	ttttggtaac	agaaaacaat	gtgatgaaaa	2220
tagcagactt	tggactcgcc	agagatatca	acaatataga	ctattacaaa	aagaccacca	2280
atgggcggct	tccagtcaag	tggatggctc	cagaagccct	gtttgataga	gtatacactc	2340
atcagagtga	tgtctgttcc	ttcgggggtg	taatgtggga	gatcttctact	ttagggggct	2400
cgccctaccc	agggattccc	gtggaggaac	tttttaagct	gctgaaggaa	ggacacagaa	2460
tggataagcc	agccaactgc	accaacgaac	tgtacatgat	gatgagggac	tgttggcatg	2520
cagtgccttc	ccagagacca	acgttcaagc	agttggtaga	agacttggat	cgaatttctca	2580
ctctcacac	caatgaggaa	tacttggacc	tcagccaacc	tctcgaacag	tattcaccta	2640
gttaccctga	cacaagaagt	tcttgttctt	caggagatga	ttctgttttt	tctccagacc	2700
ccatgcctta	cgaaccatgc	cttctcctagt	atccacacat	aaacggcagt	gttaaaacat	2760
gaatgactgt	gtctgcctgt	ccccaaacag	gacagcactg	ggaacctagc	tacactgagc	2820
agggagacca	tgctcccag	agcttgttgt	ctccacttgt	atatatggat	cagaggagta	2880
aataattgga	aaagtaatca	gcataatgtgt	aaagatttat	acagttgaaa	acttghtaatc	2940
ttcccagga	ggagaagaag	gtttctggag	cagtggactg	ccacaagcca	ccatgtaacc	3000
cctctcacct	gcogtgcgta	ctggctgttg	accagtagga	ctcaagggtg	acgtgcgttc	3060
tgcttctctt	gttaattttg	taataatttg	agaagattta	tgtcagcaca	cacttacaga	3120
gcacaaatgc	agtatatagg	tgctggatgt	atgtaaatat	attcaaatta	tgtataaata	3180
tatatattat	atttacaagg	agttattttt	tgtattgatt	ttaaattggat	gtcccaatgc	3240
acctagaaaa	ttggtctctc	tttttttaat	agctatttgc	taaattgctgt	tcttacacat	3300
aatttcttaa	ttttcaccca	gcagagggtg	aaaaataact	ttgctttcag	ggaaaaatgt	3360
ataacgttaa	tttattaata	aattggtaat	atacaaaaca	attaatcatt	tatagttttt	3420
tttghtaatt	aagtggcatt	tctatgcagg	cagcacagca	gactagttaa	tctatttgctt	3480
ggacttaact	agttatcaga	tcctttgaaa	agagaatatt	tacaatatat	gactaatttg	3540
gggaaaatga	agttttgatt	tatttgtgtt	taaattgctgc	tgtcagacga	ttgttcttag	3600
acctcctaaa	tgccccatat	taaaagaact	cattcatagg	aaggtgtttc	attttgggtg	3660
gcacacctgt	cattacgtca	acgcaacgtc	taactggact	tcccaagata	aatggtacca	3720
gcgtctctct	aaaagatgcc	ttaatccatt	ccttgaaggac	agaccttagt	tgaaatgata	3780
gcagaatgtg	cttctctctg	gcagctggcc	ttctgcttct	gagttgcaca	ttaatcagat	3840
tagcctgtat	tctcttcagt	gaattttgat	aatggcttcc	agactctttg	gcgttgagga	3900
cgctgttag	gatcttcaag	tcocatcata	gaaaattgaa	acacagagtt	gttctgctga	3960
tagttttggg	gatacgtcca	tctttttaag	ggattgcttt	catctaattc	tggcaggacc	4020
tcacccaaaag	atccagcctc	atacctacat	cagacaaaat	atcgccgttg	tctcttctgt	4080
actaaagtat	tgtgtttgtc	tttggaaaca	ccactcact	ttgcaatagc	cgtgcaagat	4140
gaatgcagat	tacatttgct	ttatgtgtta	caaaattgga	gaaagtattt	aataaaaacct	4200
gttaattttt	atactgacaa	taaaaatgtt	tctacagata	ttaatgttaa	caagacaaaa	4260
taaatgtcac	gcaacttatt	tttttaataa	aaaaaaaaaa	aaa		4303

<210> 138
 <211> 3011
 <212> ДНК
 <213> Хомо сапієнс

<400> 138						
ggcggcggt	ggaggagagc	gcggtggaga	gccgagcggg	cggcgcgcg	gtgcggagcg	60
ggcggaggag	cgcgcgcgcc	cgccacaaag	ctcgggcgcc	gcggggctgc	atgcggcgta	120
cctggcccg	cgcgcgact	gctctccggg	ctggcgggg	ccggcccgga	gccccggggg	180
ccccgaggcc	gcagcttgcc	tgcgcgctct	gagccttcgc	aactcgcgag	caaagttttg	240
tggaggcaac	gccaaagcctg	agtcctttct	tcctctcggt	ccccaaatcc	gagggcagcc	300
cgcgggcgtc	atgccccgcg	tcctccgcag	cctggggtac	gcgtgaagcc	cgggaggctt	360
ggcgccggcg	aagacccaag	gaccactctt	ctgctgttgg	agttgctccc	cgcaaccccg	420
ggctcgtcgc	tttctccatc	ccgacccacg	cggggcgcg	ggacaacaca	ggtcgcggag	480
gagcgttgcc	attcaagtga	ctgcagcagc	agcggcagcg	cctcggttcc	tgagccacc	540
gcaggctgaa	ggcattgcgc	gtagtccatg	cccgtagagg	aagtgtgcag	atgggattaa	600
cgtccacatg	gagatatgga	agaggaccgg	ggattggtag	cgtaaccatg	gtcagctggg	660
gtcgtttcat	ctgcctggtc	gtggtcacca	tggcaacctt	gtccctggcc	cggccctcct	720
tcagtttagt	tgaggatacc	acattagagc	cagaagatgc	catctcatcc	ggagatgatg	780
aggatgacac	cgatggtgcg	gaagattttg	tcagtggaga	cagtaacaac	aagagagcac	840
catactggac	caacacagaa	aagatggaaa	agcggtccca	tgctgtgcct	gcggccaaca	900
ctgtcaagtt	tcgctgcccc	gccgggggga	acccaatgcc	aacctgcgg	tggctgaaaa	960
acgggaagga	gtttaagcag	gagcatcgca	ttggaggcta	caaggtagca	aaccagcact	1020


```

ggagcctcat tatggaagt gtgtgccat ctgacaagg aaattatacc tgtgtagtgg 1080
agaatgaata cgggtccatc aatcacacgt accacctgga tgttgtggag cgtatcgctc 1140
accggcccat cctccaagcc ggactgcccg caaatgcctc cacagtggtc ggaggagacg 1200
tagagtttgt ctgcaaggtt tacagtgatg cccagcccca catccagtgg atcaagcacg 1260
tggaagaaga cggcagtaaa tacgggcccg acgggctgcc ctacctcaag gttctcaagc 1320
actcggggat aaatagttcc aatgcagaag tgctggctct gttcaatgtg accgagggcg 1380
atgctgggga atatatatgt aaggtctcca attatatagg gcaggccaac cagtctgcct 1440
ggctcactgt cctgccaata cagcaagcgc ctggaagaga aaaggagatt acagcttccc 1500
cagactacct ggagatagcc atttactgca taggggtctt cttaatcgcc tgtatggtgg 1560
taacagtcac cctgtgccga atgaagaaca cgaccaagaa gccagacttc agcagccagc 1620
cggtctgtgca caagctgacc aaacgtatcc ccctgcggag acaggtaaca gtttcggctg 1680
agtccagctc ctccatgaac tccaacaccc cgctggtgag gataacaaca cgcctctctt 1740
caacggcaga ccccccatg ctggcagggg tctccagta tgaacttcca gaggacccaa 1800
aatgggagtt tccaagagat aagctgacac tgggcaagcc cctgggagaa ggttgctttg 1860
ggcaagtggc catggcgga gcagtggaa ttgacaaaga caagcccaag gagcggtca 1920
ccgtggccgt gaagatgttg aaagatgatg ccacagagaa agacctttct gatctggtgt 1980
cagagatgga gatgatgaag atgattggga aacacaagaa tatcataaat cttcttggag 2040
cctgcacaca ggtgggcct ctctatgtca tagttgagta tgctctaaa ggcaacctcc 2100
gagaatacct ccgagcccg aggccaccg ggatggagta ctctatgac attaacctg 2160
ttcctgagga gcagatgacc ttcaaggact tgggtcatg caccctaccg ctggccagag 2220
gcatggagta cttggcttcc caaaaatgta ttcatcgaga tttagcagcc agaaatggtt 2280
tggtaacaga aaacaatgtg atgaaaatag cagactttgg actcgccaga gatataca 2340
atatagacta ttacaaaaag accaccaatg ggcggcttcc agtcaagtgg atggctccag 2400
aagccctgtt tgatagagta tacactcatc agagtgtatg ctggtccttc ggggtgttaa 2460
tgtgggagat cttcacttta gggggctcgc cctaccagag gattccctg gaggaacttt 2520
ttaagctgct gaaggaagga cacagaatgg ataagccagc caactgcacc aacgaactgt 2580
acatgatgat gagggactgt tggcatgcag tgccctccca gagaccaacg ttcaagcagt 2640
ttgtagaaga cttggatcga attctcactc tcacaaccaa tgagatctga aagtttatgg 2700
cttcattgag aaactgggaa aagttgtgca ggcgagtg gcctatgcctg taatccagc 2760
actttgggag gccgagcgag gcggtatcat aggtcaggag ttccagacca gcctggccaa 2820
catggtgaaa cctgtctct actaaagata caaaaatta gccgggctg ttggtgtgca 2880
cctgtaatcc cagctactcc gggaggtcga ggcagagag tcacttgaac cggggaggcg 2940
gaggttgca tgagccgaga tcatgccatt gcattccagc cttggcgaca gagcgagact 3000
ccgtctcaaa a 3011

```

<210> 139
 <211> 4286
 <212> ДНК
 <213> Хомо sapiens

```

<400> 139
gtcgcgggca gctggcgccg cgcggtctct ctctgccggt cgcacggacg caccggcggg 60
ccgccggccg gagggacggg gcgggagctg ggcccgcgga cagcgagccg gagcgggagc 120
cgcgcgtagc gagccgggct ccggcgctcg ccagtctccc gagcggcgcc cgcctcccgc 180
cggtgcccgc gccggggcgt ggggggcagc atgcccgccg gcgctgctg aggacggccg 240
ggcccccgcc ccgcgcatgg gcgcccctgc ctgcgcccct gcgctctcg tggccgtggc 300
catcgtggcc ggccctcctt cggagtcctt ggggacggag cagcgcgctg tggggcgagc 360
ggcagaagtc ccggggccag agcccgccca gcaggagcag ttggtctctg gcagcgggga 420
tgctgtggag ctgagctgtc ccccgcccgg ggggtgtccc atggggccca ctgtctgggt 480
caaggatggc acagggtctg tgccctcgga gcgtgtctct gtggggcccc agcggtgca 540
ggtgctgaat gcctcccacg aggaactccg ggcctacagc tgccggcagc ggctcacgca 600
gcgcgtactg tgccacttca gtgtgcgggt gacagacgct ccctcctcgg gagatgacga 660
agacggggag gacgaggtcg aggcacagc tgtggacaca gggggcccct actggacagc 720
gccgagcggt atggacaaga agctgctggc cgtgccggcc gccaacaccg tccgcttccg 780
ctgccagacc gctggcaacc ccaactccct catctcctg ctgaagaacg gcaggaggtt 840
ccgcggcgag caccgcattg gaggcacaa gctgcggcat cagcagtgga gcctggtcat 900
ggaaaagcgt gtgccctcgg acccgggcaa ctacacctgc gtcgtggaga acaagtttgg 960
cagcatccgg cagacgtaca cgctggacgt gctggagcgc tccccgacc ggccatcct 1020
gcaggcgggg ctgccggcca accagacgac ggtgctgggc agcgagctg agttccactg 1080
caaggtgtac agtgaagcac agccccacat ccagtggctc aagcacgtgg aggtgaatga 1140
cagcaagggt ggcccgcgac gcacacccta cgttaccgtg ctcaagacgg cgggcgctaa 1200
caccaccgac aaggagctag aggttctctc cttgcacaac gtcacctttg aggacggccg 1260
ggagtacacc tgcttgccgg gcaattctat tgggttttct catcactctg cgtggctggt 1320

```

```

ggtgctgccca gccgaggagg agctgggtgga ggctgacgag gcgggagtg tgtatgcagg 1380
catcctcagc tacgggggtgg gcttcttctt gttcatcctg gtggtggcgg ctgtgacgct 1440
ctgccgcctg cgcagccccc ccaagaaaagg cctgggctoc cccacccgtg acaagatctc 1500
ccgcttcccg ctcaagcgac aggtgtccct ggagtccaac gcgtccatga gctccaacac 1560
accactggtg cgcacgcgaa ggctgtctct aggggagggc cccacgctgg ccaatgtctc 1620
cgagctcgag ctgcctgccg accccaaatg ggagctgtct cgggcccggc tgacctggg 1680
caagccctt ggggagggct gcttcggcca ggtggtcatg gcggaggcca tcggcattga 1740
caaggaccgg gccgccaagg ctgtcaccgt agccgtgaag atgctgaaag acgatgccac 1800
tgacaaggac ctgtcggacc tgggtgtctga gatggagatg atgaagatga tcgggaaaca 1860
caaaaacatc atcaacctgc tgggcgcctg caccgagggc gggcccctgt acgtgctgtg 1920
ggagtacgcg gccaaaggta acctgcggga gtttctgcgg gcgcgggcgg ccccgggcct 1980
ggactactcc ttcgacacct gcaagccgcc cgaggagcag ctacacctca aggacctggt 2040
gtcctgtgcc taccagggtg cccggggcat ggagtacttg gctcccaga agtgcatcca 2100
cagggacctg gctgcccgca atgtgtcgtg gaccgaggac aacgtgatga agatcgaga 2160
cttcgggctg gccgggagc tgacacacct cgactactac aagaagacga ccaacggccg 2220
gctgcgcgtg aagtggatgg cgctgaggc cttgtttgac cgagtctaca ctaccagag 2280
tgacgtcttg tcttttgggg tctgtctctg ggagatcttc acgtggggg gctccccgta 2340
ccccggcatc cctgtggagg agctcttcaa gctgtgaag gagggccacc gcatggacaa 2400
gccgcgcaac tgcacacacg acctgtacat gatcatgcgg gagtgtggc atgcgcgcc 2460
ctcccagagg cccaccttca agcagctggt ggaggacctg gaccgtgtcc ttaccgtgac 2520
gtccaccgag gagtacctgg acctgtcggc gcctttcgag cagtactccc cgggtggcca 2580
ggacaccccc agctccagct cctcagggga cgactccgtg tttgccacg acctgctgcc 2640
cccgcccca ccagcagtg ggggctcggc gacgtgaagg gccactggtc ccaacaatg 2700
tgagggggtc ctagcagccc acctgctgc tgggtcacag ccactcccc gcatgagact 2760
cagtgcagat ggagagacag ctacacagag ctttggctg tgtgtgtgtg tgtgcgtgtg 2820
tgtgtgtgtg tgtgcacatc cgcgtgtgcc tgtgtgcgtg cgcactctgc ctccagggtc 2880
agaggtagccc tgggtgtccc cgctgctgtg caacggtctc ctgactggtg ctgcagcacc 2940
gaggggcctt tgttctgggg ggaccagatg cagaatgtaa gtgggccac ccggtgggac 3000
ccccgtgggg cagggagctg ggcgcgacat ggctccggcc tctgccttg caccacggga 3060
catcacaggg tgggcctcgg ccctccccc acccaaagct gaggctgcag ggaagcccca 3120
catgtccagc acctgtgtcc tggggtgtta gtggcaccgc ctccccacct ccaggctttc 3180
ccacttccca cctgcccct cagagactga aattacgggt acctgaagat gggagccttt 3240
accttttatg caaaaggttt attccggaaa ctagtgtaca tttctataaa tagatgctgt 3300
gtatatggta tatatacata tatatatata acatatatgg aagaggaaaa ggctggtaca 3360
acggaggcct gcgaccttg gggcacagga ggcaggcatg gccctggcg gggcgtgggg 3420
gggctgtggg ggaggcccca ggggtctca cccatgcaag cagaggacca gggccttttc 3480
tggcaccgca gttttgtttt aaaactggac ctgtatattt gtaaagctat ttatgggcc 3540
ctggcactct tgttccaca cccaacact tccagcattt agctggccac atggcgaga 3600
gttttaattt ttaacttatt gacaaccgag aaggtttatt ccgccgatag agggacggcc 3660
aagaatgtac gtccagcctg ccccgagct ggaggatccc ctccaagcct aaaaggttgt 3720
taatagttgg aggtgattcc agtgaagata ttttatttcc tttgtccttt ttcaggagaa 3780
ttagatttct ataggatttt tctttaggag atttattttt tggacttcaa agcaagctgg 3840
tattttcata caaattcttc taattgctgt gtgtcccagg caggagagac gtttccaggg 3900
aggggcgggc cctgtgtgca ggttccgatg ttattagatg ttacaagttt atatatatct 3960
atatatataa ttattagat ttttacaaga tgtatttgtt gtagacttaa cacttcttac 4020
gcaatgcctc tagagtttta tagcctggac tgctacctt caaagcttg agggaagccg 4080
tgaattcagt tggttcgttc tgtactgta ctgggcccgt agtctgggca gctgtccct 4140
gcttgccctg agggccatgg ctcagggtgg tctctctctt gggcccagtg catggtggcc 4200
agaggtgtca cccaaaccgg caggtgcgat tttgttaacc cagcgacgaa ctttccgaaa 4260
aataaagaca cctggttgct aacctg 4286

```

```

<210> 140
<211> 3950
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 140
gtcgcgggca gctggcgcgg cgcggctctg ctctgcgggt cgcacggacg caccggcggg 60
ccgccggcgg gagggacggg gcgggagctg ggcccgcgga cagcgagccg gagcgggagc 120
cgcgcgtagc gagccgggct ccggcgctcg ccagtctccc gagcggcgcc cgcctcccgc 180
cggtgcgcgc gccgggcccgt ggggggcagc atgccgcgc gcgctgcctg aggacgccgc 240
ggcccccgcc ccgcgcatgg gcgcctctgc ctgcgccttc gcgctctgcg tggcctgtgc 300
catcgtggcc ggcgcctcct cggagtcctt ggggacggag cagcgcgctc tggggcgagc 360

```

```

ggcagaagtc cggggccag agcccgcca gcaggagcag ttggtcttcg gcagcgggga 420
tgctgtggag ctgagctgtc ccccgcccg ggggtgtccc atggggccca ctgtctgggt 480
caaggatggc acagggtctg tgccctcgga gcgtgtcctg gtggggcccc agcggctgca 540
ggtgtgaat gctccacag aggaactccg ggccctacagc tgccggcagc ggctcacgca 600
gcgctgtact tgccacttca gtgtgcgggt gacagacgct ccatcctcgg gagatgacga 660
agacggggag gaocaggctg aggaacacag tgtggacaca gggggccctt actggacacg 720
gcccagcgg atggacaaga agctgtctgc cgtgccggcc gccaaacaccg tccgcttccg 780
ctgccagcc gctggcaacc ccactccctc catctcctgg ctgaagaacg gcaggagtt 840
ccgcgcgag caccgcattg gaggcacaa gctgcggcat cagcagtgga gcctggtcat 900
ggaaagcgt gtgccctcgg acccgcgcaa ctacacctgc gtcgtggaga acaagtttgg 960
cagcatccgg cagacgtaca cgctggacgt gctggagcgc tccccgcacc ggcccatcct 1020
gcaggcgggg ctgccggcca accagacggc ggtgctgggc agcgacgtgg agttccactg 1080
caaggtgtac agtgacgcac agccccacat ccagtggctc aagcacgtgg aggtgaatgg 1140
cagcaaggtg gggccggagc gcacacccta cgttaccctg ctcaagtggt ccctggagtc 1200
caacgcgtcc atgagctcca acaaccact ggtgcgcata gcaaggctgt cctcagggga 1260
ggggccccag ctggccaatg tctccgagct cgagctgcct gccgacccca aatgggagct 1320
gtctcggggc cgctgtaccc tgggcaagcc ccttggggag ggtgcttcg gccagggtgt 1380
catggcggag gccatcgcca ttgacaagga ccgggcccgc aagcctgtca ccgtagccgt 1440
gaagatgctg aaagacgatg ccactgacaa ggacctgtcg gacctggtgt ctgagatgga 1500
gatgatgaag atgatcggga aacacaaaa catcatcaac ctgctgggcg cctgcacgca 1560
gggcggggcc ctgtacctgc ttggtggagta ccgggccaag ggtaacctgc gggagtttct 1620
gcgggcggcg cggcccccgg gcctggacta ctcttcgac acctgcaagc cggccgagga 1680
gcagctcacc ttcaaggacc ttggtgtctg tgcctaccag gtggcccggg gcatggagta 1740
cttgcctcc cagaagtga tccacaggga cctggctgcc cgcaatgtgc tggtagccga 1800
ggacaacgtg atgaagatcg cagacttcgg gctggcccgg gacgtgcaca acctcgacta 1860
ctacaagaag accgaccaag gccggctgcc cgtgaagtgg atggcgctg aggccttgtt 1920
tgaccgagtc taccctcacc agagtgcgt ctggtccttt ggggtctcgc tctgggagat 1980
cttcacgctg gggggctccc cgtaccccgg catccctgtg gaggagctct tcaagctgct 2040
gaaggagggg caccgcgatg acaagcccgc caactgcaca cacgacctgt acatgatcat 2100
gcgggagtg cggcatgccg cgcctccca gagggccacc ttcaagcagc tggtaggagga 2160
cctggaccgt gtccctaccg tgacgtccac cgacgagtac ctggacctgt cggcgccctt 2220
cgagcagtac tccccgggtg gccaggacac cccagctcc agctcctcag gggacgactc 2280
cgtgtttgcc cagcacctgc tgcccccgcc cccaccagc agtgggggct cgcggacgtg 2340
aaggggccact ggtccccaac aatgtgagg gtcctagca gccaccctg ctgctggtgc 2400
acagccactc ccggcatga gactcagtc agatggagag acagctacac agagcttttg 2460
tctgtgtgtg ttgtgtgtg gtgcagagt accctgggtg tccccgctgc tgcctgtgtg 2520
cgtgtgcata ttgcctccag gtgcagagt accctgggtg tccccgctgc tgcctgtgtg 2580
tctcctgact ggtgctcag caccgagggg cctttgttct ggggggaccc agtgcaaat 2640
gtaagtgggc ccaccgggtg ggaccccgt ggggcaggga gctggggccc acatggctcc 2700
gacctctgcc ttgcaccac gggacatcac aggggtgggc tcggccctc ccacacccaa 2760
agctgagcct gcagggaagc cccacatgct cagcaccttg tgcctgggtg gttagtggca 2820
ccgctcctcc acctccaggg tttccactt cccaccctgc cctcagaga ctgaaattac 2880
gggtacctga agatgggagc ctttaccctt tatgcaaaag gtttattccg gaaactagt 2940
tacctttcta taaatagatg ctgtgtatat ggtatatata catatatata tataacatat 3000
atggaagagg aaaagcgtg tacaacggag gcctgcgacc ctgggggac aggaggcagg 3060
catggccctg ggcggggcgt gggggggcgt ggaggggagc ccagggggt ctcacccatg 3120
caagcagagg accaggccct tttctggcac cgcagttttg ttttaaaact ggacctgtat 3180
atgtgtaaag ctatttatgg gccctggcca ctctgttcc cacaccccaa cacttcagc 3240
atgtagctgg ccacatggcg gagagtttta atttttaact tattgacaac cgagaaggtt 3300
tatcccgccg atagagggac ggccaagaat gtacgtccag cctgcccgg agctggagga 3360
tcccctccaa gcctaaaagg ttgttaatag ttggagggtg ttccagtga gatattttat 3420
ttcctttgtc ctttttcagg agaattagat ttctatagga ttttcttta ggagatttat 3480
tttttgact tcaaagcaag ctggtatttt catacaaatt cttctaattg ctgtgtgtcc 3540
caggcaggga gacggtttcc agggaggggc cgccctgtg tgagggttcc gatgttatta 3600
gatgttacia gtttatatat atctatatat ataatttatt gaggttttac aagatgtatt 3660
tgtttagtag ttaacacttc ttacgcaatg cttctagagt tttagacct tttagacct ggactgctac 3720
ctttcaaaagc ttggagggaa gccgtgaatt cagttgggtc gttctgtact gttactgggc 3780
cctgagctcg ggcagctgtc ccttgcctgc ctgcagggcc atggctcagg gtggtctctt 3840
cttggggccc agtgcatggt ggccagaggt gtcacccaaa ccggcagggt cgattttgtt 3900
aaccacgca cgaactttcc gaaaaataaa gacacctggt tgctaacctg 3950

```

<210> 141

<211> 2085

<212> ДНК
<213> Хомо сапієнс

<400> 141

```

atgggcgcgc ctcctcgccg cctcgcgctc tgcgtggccg tggccatcgt ggccggcgcc 60
tctctggagt ccttggggac ggagcagcgc gtcgtggggc gagcggcaga agtcccgggc 120
ccagagcccg gccagcagga gcagttggtc ttcggcagcg gggatgctgt ggagctgagc 180
tgtcccccg ccgggggtgg tccatgggg cccactgtct gggccaagga tggcacaggg 240
ctggtgccct cggagcgtgt cctggtgggg cccacgcggc tgcaggtgct gaatgcctcc 300
cacgaggact ccggggccta cagctgccgg cagcggctca cgcagcgcgt actgtgccac 360
ttcagtggtc ggtgacaga cgtccatcc tcgggagatg acgaagacgg ggaggacgag 420
gctgaggaca caggtgtgga cacaggggco cttactgga cacggcccga gcgcatggac 480
aagaagctgc tggcctgccc ggccgccaac accgtccgct tccgctgccc agccgctggc 540
aaccaccact cctccatctc ctggtcgaag aacggcaggg agttcccgcg cgagcaccgc 600
attggaggca tcaagctcgg gcatcagcag tggagcctgg tcatggaaag cgtggtgccc 660
tcggaccgcg gcaactacac ctgcgtcgtg gagaacaagt ttggcagcat ccggcagacg 720
tacacgctgg acgtgctgga gcgtccccc caccggccca tctgcaggc ggggctgccc 780
gcccaaccaga cggcgggtgt gggcagcgac gtggagtctc actgcaaggt gtacagtgc 840
gcacagcccc acatccagtg gctcaagcac gtggaggtga acggcagcaa ggtgggccc 900
gacggcacac cctacgttac cgtgctcaag gtgtccctgg agtccaacgc gtccatgagc 960
tccaacacac cactggtgcg catcgcaagg ctgtcctcag gggagggccc cacgctggcc 1020
aatgtctccg agctcgagct gcctgccgac cccaaatggg agctgtctcg ggcccggtcg 1080
accctgggca agccccctgg ggagggtgc ttcggccagg tggcatggc ggaggccatc 1140
ggcattgaca aggaccgggc cgccaagcct gtcaccgtag ccgtgaagat gctgaaagac 1200
gatgccactg acaaggacct gtcggacctg gtgtctgaga tggagatgat gaagatgac 1260
gggaaacaca aaaacatcat caacctgctg ggcgctgca cgcaggcgcg gccctgtac 1320
gtgctggtgg agtacgcggc caagggtaac ctgcgggagt ttctgcgggc gcggcgggcc 1380
ccgggcctgg actactcctt cgacacctgc aagcccgccc aggagcagct cacttcaag 1440
gacctggtgt cctgtgccta ccaggtggcc cggggcatgg agtacttggc ctcccagaag 1500
tgcatccaca gggacctggc tgcccgaat gtgctggtga ccgaggacaa cgtgatgaag 1560
atcgagact tcgggctggc ccgggacgtg cacaacctcg actactacaa gaagacaacc 1620
aacggccggc tgcccgtgaa gtggatggcg cctgaggcct tgtttgaccg agtctacact 1680
caccagagtg acgtctggtc ctttggggtc ctgctctggg agatcttcac gctggggggc 1740
tcccgtacc ccggcatccc tgtggaggag ctcttcaagc tgctgaagga gggccaccgc 1800
atggacaagc ccgccaaactg cacacacgac ctgtacatga tcatgcggga gtgtggcat 1860
gcgcgcctcc ccagagggcc cacttcaag cagctggtgg aggacctgga cgtgtcctt 1920
accgtgacgt ccaccgacga gtacctggac ctgtcgggca ctttcgagca gtactccccg 1980
ggtgcccagg acacccccag ctccagctcc tcaggggaag actccgtgtt tgcccacgac 2040
ctgtgcccc ccgccccacc cagcagtggt ggctcgggga cgtga 2085

```

<210> 142
<211> 4431
<212> ДНК
<213> Хомо сапієнс

<400> 142

```

aggcggggct ggaagtgttg aagggggtg gcaggtctgc attgccgctt ccctggtgcc 60
gggagcagtc gccctgcgcg cctccgcccg cggccgggac ccccgctctc gcccgggact 120
ccttaccggt ggaacctaga ccaggtctcc agaggcttgt ggaagagaag caggcgaccc 180
ttcctgagtt atcctggctt agcctcccaa tctggtctcc cttecccttc ccattccct 240
gctccccctg tcccttcccc atccacccaa ctgaactggg tataggtcaa agctcctctc 300
ttctcttttc ctctcaggc actcattggc taggacctgt ttgctctttt tttgtgccc 360
agagatactg gaacacgctt catctaagta actgtgggga ggggtctttt tgactctaca 420
agtccttgag caaaaagctg aaaaagaagc aggaggtgga gaagaccag tgaagtggcc 480
caagcccat catggaagag ggcttccgag accgggcagc ttcatccgt ggggccaaaag 540
acattgctaa ggaagtcaaa aagcatgcgg ccaagaaggt ggtgaagggc ctggacagag 600
tccaggacga atattccga agatcgta ctccgtttga ggaggaggat gatgatgatg 660
acttccctgc tccagtgat ggttattacc gaggagaagg gaccaggat gaggaggag 720
gtggtgcatc cagtgatgct actgagggcc atgacgagga tgatgagatc tatgaagggg 780
aatatcaggg cattccccgg gcagagtctg ggggcaaagg cgagcggatg gcagatgggg 840
cgccccctggc tggagtaagg gggggcttga gtgatgggga gggctcccct gggggccggg 900
gggaggcaca acgacgaaa gaacgagaag aactggccca acagtatgaa gccatcctac 960
gggagtggtg ccacggccgc ttccagtgga cactgtatct tgtgcttggt ctggcgctga 1020

```

```

tggtgacggtg tgtggaggtc tttgtggtgg gcttcgtgct gccagcgct gagaaagaca 1080
tgtgctgtgc cgaactcaac aaagcatgc taggcctcat cgtctacctg ggcatgatgg 1140
tgaggagcctt cctctgggga ggtctggctg accggctggg tcggaggcag tgtctgctca 1200
tctcgctctc agtcaacagc gtctctgcct tcttctcctc ttttgtccag gggtacggca 1260
ctttctctct ctgccgccta ctttctgggg ttgggattgg aggttccatc cccattgtct 1320
tctctatatt ctccgagttt ctggcccagg agaaacgagg ggagcatttg agctggctct 1380
gcatgttttg gatgattggg ggcgtgtacg cagctgctat ggctggggcc atcatcccc 1440
actatgggtg gagttttcag atgggttctg cctaccagtt ccacagctgg agggctctcg 1500
tctctgtctg cgcctttcct tctgtgtttg ccattggggc tctgaccacg cagcctgaga 1560
gcccccgttt ctctctagag aatggaaagc atgatgaggc ctggatgggt ctgaagcagg 1620
tccatgatac caacatgcga gccaaaggac atcctgagcg agtgttctca gtaaccaca 1680
ttaagacgat tcatcaggag gatgaattga ttgagatcca gtcggacaca gggacctggt 1740
accagcgctg ggggggtccg gccttgagcc taggggggca ggtttggggg aattttctct 1800
cctgttttgg tcccgaaatc cggcgcatca ctctgatgat gatgggtgtg tggttcacca 1860
tgtcatctcg ctactatggc ctgaccgtct ggtttctctg catgatccgc catctccagg 1920
cagtggacta cgcacccgcg accaaagtgt tccccgggga gcgcgtagag catgtaactt 1980
ttaacttcac gttggagaat cagatccacc gagggcgcca gtacttcaat gacaagttca 2040
ttgggtctcg gctcaagtca gtgtcctttg aggattccct gtttgaagag tggtattttg 2100
aggatgtcac atccagcaac acgtttttcc gcaactgcac attcatcaac actgtgttct 2160
ataaactgta cctgttctgag tacaagtttg tgaacagcgc tctgataaac agtacattcc 2220
tgacacaaca ggggggtctg ccgctagacg tgacagggac gggcgaaagt gcctacatgg 2280
tatactttgt gagcttctcg gggacactgg cagtgtcttc tgggaatatc gtgtctgccc 2340
tgctcatgga caagatcggc aggtcagaa tgcttctctg ctccagctg atgtcctgtg 2400
tctctgtctt ctctctgtct tttgggaaca gtgagtcggc catgatcgct ctgctctgcc 2460
tttttggcgg ggtcagcatt gcctcctgga atgctgtgga cgtgttgact gttgaactct 2520
acccctcaga caagaggacc acagcttttg gcttctctga tgccctgtgt aagctggcag 2580
ctgtgtctgg gatcagcctc ttcacatcct tcgtgggaat caccaaggct gcacccatcc 2640
tctttgcctc agctgccttt gcccttggca gctctctggc cctgaagctg cctgagaccc 2700
gggggcagggt gctgcagctc aggggtctct agggcttttg gattggcagg cactactgtg 2760
gaccaacaac tctctctctc cctccctcgc cctgccatcc tgacctccag agccctcact 2820
ccccactccc cgtgttttgt gtcttagctg tgtgtgcgtg tgcgtgtgca tgtgtgtaaa 2880
ccccgtgggc agggactaca ggggaaggct cttcatccca gttttgagat gaagctgtac 2940
tccccatttc ccaactgcct tgactttgca caagagaagg ctgagcccca tctctctccc 3000
cctgttagag aggggcccct gcttccctgt tccaggggtt ccagaatagg cttcctgcct 3060
tccccatcat tccctctgcc taggcccctg tgaaccaca ggtatgcaat tatgctaggg 3120
gctggggctc tgggttagac catggaccaa aagaacttct tagagtctga agagtgggcc 3180
tcgggtgccc tctcacatct cctgttggat gctgggggag aagcaataaa cctcagccct 3240
ctggcctcca ctttctctct aatttgggct gcaaatatga agcctgaatt ttatgaaatt 3300
agctttctga ttctatttta ttaatagatt aagttctgag gcagctccgc aggactgtgt 3360
gtgaatgtgt atgtatactt acatatgtgt gtgcatgtgc catggggcgg ggggtatcac 3420
tatactgtcc tcaaatataa gccaaaggta atttcagcgg atgcacacac aaccctgcct 3480
cccacagttc ctcccctaatt ctggtttctg tgttgagcct gggatggagg agccctaggc 3540
cagcctggga taagagtccc acagtctagg gagatctgag ggcacccgac aaggccatc 3600
tcttccctc ctcaagaagc agaggcctcc tctggagtga gaggctccac ccactacagc 3660
acaggcggga atagcacagc tgccctccca tgcctccctc ctgtccctc acagggaggg 3720
gagcagggga gggaaagaaa ccaggcatct ggtcaaaaca gcagatcaaa aagcacaagg 3780
agctggggga gaggcaggaa gcaggggccc tcttgccagc tctctgagt ggggagagg 3840
tgggcagtgat gtgagggacc cctaagtcag ggactagaag cctcagtttc cccattttac 3900
ccttccacac aatagcctct gttaggttag ctgcccctac ccaccctact ctgtgtggct 3960
gctttctttg gtgccctccc ctcacccac tgtagctgtg acgtgttgta gtttttagat 4020
gtttgtaaaa tgtttaaaaa aatgttaaaa ggaaaaaagt gaaaaataca aaaaagaaaa 4080
tcaaaattca ccttcgtcat gctgcgtcca gtgcccacac cctgtgtgca ctctcccat 4140
tttgtaacac tgtaccaggt ggtgactgtt taactctttg gtgtctgtgc tcaaaagact 4200
gccttctcca gtcccagtg tatgagtgtg tgccctgtgc ccttgtccct cactcccac 4260
atgctggagc tagccctctt cctcgacccc ctgggaggga cccatccatc tccctgtctc 4320
tcttggggaa cctaaacccc aactctgttg atgtgaaaaa tgcagtgaag aatatgacg 4380
aaaaataaaa cggaaacaaa tctcaaaat acaaaaaaaa aaaaaaaa a 4431

```

```

<210> 143
<211> 5311
<212> ДНК
<213> Хомо сапиенс

```

<400> 143

```

agcataacct tccgtggcag gacaaatcag gccagcacgc agtctgccaa gtccctgctcg 60
ctccctgtca agaaaaacag ctggatccat ttotaatcaa cacttcccaa cgcaacactt 120
ctgagctctc gaaggagacc agagcttgaa actttccaga ctccaacag acatcgagtg 180
caaaaggata tttaggttgt ctttgacaaa atctggttga tttgagagat aaaggggggg 240
ggaaccagtg tgactttcac ctaagaagtc acatgaacat atttcacatt tgaactacat 300
aatgaatgat ggttattgaa atagcccaaa cctctaccac agagcgaggg atatagctca 360
aggggcaacc aggcagtcgc agaaccaagg aatggatgac tacaagtatc aggacaatta 420
tgggggctat gtcgccagtg atggctatta ccgcggaat gagtccaacc cagaagaaga 480
tgcacagagt gatgtcaccg aaggccatga tgaggagac gagatctatg agggcgagta 540
ccagggtatc cctcaccagg atgatgtcaa ggccaagcag gccaagatgg cgccctccag 600
aatggacagc cttcggggcc agacagacct gatggctgag aggctggaag atgaggagca 660
gttggcccac cagtacgaga ccatcatgga tgagtgtggc catggccgct tccagtggat 720
cctctttttc gctctgggtt tggccctgat ggccgatggg gtggaagtgt tcgtggtgag 780
ttttgccttg ccagtgacg agaaggacat gtgtctgtcc agttccaaaa aaggaaatgct 840
agggatgata gttacttgga gaatgatggc gggcgccctt atcctgggag gcctggctga 900
taagctggga aggaagcgag tcctcagcat gtctctggcc gtcaatgcct ccttcgcctc 960
cctctcttcc ttogtgacgg gatatggagc cttctctctt tgcgactca tctcaggcat 1020
cggtatgtgg ggtgctctac cgattgtttt tgccattttt tctgaattct tgtctcggga 1080
gaagcgagga gaacacctca gttggctggg catctctctg atgactgggg gcctgtacgc 1140
atctgccatg gcttgagca tcacccaca ctatggctgg ggcttcagca tggggaccaaa 1200
ttaccacttc catagctgga gagtgtttgt catcgtctgt gctctgccct gcaccgtgtc 1260
catggtggcc ctgaagttca tgccagagag cccaagggtt ctgctagaga tgggcaaaaa 1320
tgatgaagcc tggatgattc tcaagcaagt ccatgacacc aacatgagag ctaaggggac 1380
ccagagaaaa gtgttcacgg tttccaacat caaaactccc aagcaaatgg atgaattcat 1440
tgagatccaa agttcaacag gaacctggta ccagcgctgg ctggtcagat tcaagacct 1500
tttcaagcag gtctgggata atgcctgtga ctgtgtgatg gggccctaca gaatgaatac 1560
actgattctg gccgtggttt ggtttgccat ggcattoagt tactatggac tgacagtttg 1620
gtttcctgat atgacccgct attttcaaga tgaagaatac aagtctaaaa tgaaggtgtt 1680
ttttggtgag catgtgtacg gcgccacaat caacttcacg atggaaaatc agatccacca 1740
acatgggaaa cttgtgaatg ataagttcac aagaatgtac tttaaacatg tactctttga 1800
ggacacattc tttgacagat gctattttga agacgtaaac tcaacagata cctacttcaa 1860
aaattgtacc attgaatcaa ccatctttta caacacagac ctctacgagc acaagttcat 1920
caactgtcgg tttatcaact ccaccttccg ggagcagaag gagggctgcc acatggactt 1980
ggagcaagat aatgacttcc tgatttacct cgtcagcttc ctgggcagcc tgtctgtctt 2040
acccgggaac atcatttctg ccctgtctat ggatagaatt ggaaggctca agatgatttg 2100
tggctccatg ctaactctg cagtctgtg ctctctctg ttttttggca acagtgaagc 2160
tgcaatgatc ggctggcagt gcctgttctg tgggacaagc attgcagcct ggaatgctct 2220
ggatgtgatc acagtggagc tgtatccac caaccagaga gcaacagcct tcggcattct 2280
caatggatta tgcaaatttg gcgccatcct gggaaacacc atctttgctt cttttgttgg 2340
gataacccaa gtggtcccca tcctctctgg tgctgtctct ctggttgggg gtggcctgat 2400
tgcccttcga ctgccagaga ctgcagaaca ggtcctgatg tgaacaacct atgggaaaaa 2460
gaaaggtcga gagaatcttg tccaggacac tgaatgcat ccacacttcc tgcctatcac 2520
ggtccggagg acaccttgga tagcacggga ggagaagttg actttgtgac ccctagttta 2580
ggaccacatt cagctgtcaa tatgtttgta actcagggtg ctgatttggg ggtgccctga 2640
gccaccctta gaatcacaga gctgcgtgtt taacttcaag tcttccagc ccaaggcagg 2700
gagaggattc tcagtgagt gcacacacta tgcgaggagc aagcatttct ctaagtcaag 2760
tgcaaggact taacttgctg ttgaaaagga attagagggt cagaaacacc caggttcctc 2820
cagaaaagctc cttggagccc aacaacttaa caaatcaact tggctggaag ttagagtcac 2880
tatatgaaga tttggcttga agtatatatt tttgcattta aaagtatcac ctatcatatt 2940
ttccactcga aaattgacat agtagcattg aggatactct gatctagaaa gccaaagtatt 3000
tgagcaacat ctatagagat ctacttttct cctatgtctc ctaggcttcc catgataatt 3060
aggtaataca tttaaagaag atattttatt ctgttttctt ctattcaaa aaacggaatg 3120
ggatagttat tctgtaaaat aagtttgtat ataactttat ttgggtttaa tttccacaac 3180
tggatctgct aaattatgcc agcattttag ccataatttg ggagaacttg gtgtttgagg 3240
tcccaggaaa tgaggtctga tcaaatgaaa tgcaagcaca atttcttaca gccatttaac 3300
tttctgttgg gaggatgaat taacaaactc acattgtgca gctgtcttaa tccaggcact 3360
tttctttgtg cagggtgagt gagtagttac ttctctccct tacacagatg acttgtgaaa 3420
ctcaagctca ccatctcag tgctggcatt ttactttgoc actaccacaa aacaatgtga 3480
gatgtgttca gtggcctctg gtactctttg caggcaagaa tcaacaacaa tggggactga 3540
gggaaggatg ggggaagtga gccacagttc ttccaaatgt aaatactttt tgtttgttct 3600
agtggtaaaa tgcaaatgca atccatattt gttaggatgg tcagggtctca tgagaaatct 3660
atgctatgtg tccagagctt ttgaacaga gtccattgga gtgggagtta gggagtgtag 3720

```

```

tggatgccaa atatgttttt cttcagtgct taagagaact gtttcctgaa gtccagcttt 3780
gaacataaac aggggtgtgg gttgggggag gagcttagga caaacctctc tgatgaaggt 3840
cagcaataga ctgaagtcct gactgcatgg aagaggaaaa acatcagaac tgtctgacaa 3900
tggaggggac agtgagctac gcacaactgc cagcggagggt gaacttgcac ctgcccaggc 3960
cggatgaaca tcagcctgca agaactagtt gtttgagttg atttgacgtg ctctcaatgg 4020
gcaagtgcc aattttccct ggcagagatc tccaaaaatt taaaacagaa taataatggc 4080
tatatcgagt gttttctcag tattggagaa atgcttaggt cctatgatag ctccgggaca 4140
tctttctgta attttctca attaacgggt tggtaggggt aaatcttatg acacctttcc 4200
accgtcgatt tgagatcagt tttaatggtt aaaatgttta ctctccttct gtcaaccctc 4260
acctttttat ttacaccctt cccttttttt ctgtacaggg agagaagaca tattgactct 4320
gactggacac cctgattcct ccaaatatat ataccactgt gtattaatct ttctctcagt 4380
gttttatagg agtactaaca tttattgctc tgtcaataat gaaaggctcg atgtaataa 4440
gctgtaattt actttccata tgaatacagt ggctagggtc ataaaagaga attgtgtgag 4500
tctgggatta ccacatctaa aacattatct tttaatggga taatacaatt cattgagcag 4560
ctaccactta aaaaacttgc aggacagtta gagcctgcat ttctagttaa gatggatctt 4620
gtaaatttaa aattggatta acattggagt gctgggggtg ctgcaataat ttgggggcta 4680
actccatttg gtttccaaga tctcacttct gcattatctt tatggctctt taaaccagcc 4740
acctagccaa tcaagggcaa ttcccatctc atccatcact cagggtcttg taaagggtgc 4800
agccaagctc tgcagacttt tgcaggattg tctagcctga gtaccgggct acttcttaa 4860
tgccgtcact cctgctgaga taaatgcgtc tttaaaaata gtctctgtgg cagggtcactg 4920
ggggacaatg tacagcattc tggccatcca ctctcttttc acttcatggt ctaccccaag 4980
agactcccga tgtcggctgt ggagggttaa agggatgagg ctctccttg ttagcaaat 5040
cgtgtcacag ttcttgatga tgtattttat gatgccagc ttggaaatag ttgctttcca 5100
tagtctcaac tgtattgtgt catctcctga tgcgtatttt tgatcttttg ttttattaaa 5160
aataattagt gaaagagggt tgcctatctg tgaagtttgt agtacatcat cctgagggtca 5220
tgtaacaagt aaaccccaac ccagcgttcc ctctacgtt gtgttagttc attaaaaacta 5280
aataataaaa ataactgtaa gaaaacctta a 5311

```

<210> 144
 <211> 2362
 <212> ДНК
 <213> Хомо sapiens

```

<400> 144
cactcagggc aagggtgtcc gacggctgga gcgttctgtt ttgaacccaa agtggatgat 60
gctgtcagag ctgaactact gaaaggaggc tgtgaaaatt tcccatcttc tcattggcca 120
tcagttgaga taagatggaa gactcttaca aggataggac ttactgatg aagggtgcca 180
aggacattgc cagagaggtg aagaacaaa cagtaaagaa ggtgaatcaa gctgtggacc 240
gagcccagga tgaatacacc cagaggtcct acagtcggtt ccaagatgaa gaagatgatg 300
atgactacta cccggctgga gaaacctata atggtgaggc caacgatgac gaaggctcaa 360
tggaagccac tgaggggcat gatgaagatg atgagatcta tgagggggag tatcagggca 420
tccccagtat gaaccaagcg aaggacagca tctgttcagt ggggcagccc aagggcgatg 480
agtacaagga ccgacgggag ctggaatcag aaaggagagc tgacagggaa gagttagccc 540
agcagtatga gctgataatc caagaatcgc gtcattggtc ttttcagtgg gcccttttct 600
tcgtcctggg catggctctt atggcagacg gtgtagaggt gtttgcgtt ggcttcgtgt 660
taccagtgct tgagacagac ctctgcattc caaattcagg atctggatgg ctaggcagca 720
tagtgtacct cgggatgatg gtgggggctt tcttctgggg aggactggca gacaaagtgg 780
gaaggaacaa gtctcttctg atttgcatgt ctgtcaacgg attctttgcc ttcccttctt 840
catttgtcca aggttatggc ttctttctct tctgtcgtt actttctgga ttccgggattg 900
gaggagccat acccactgtg ttctcgtact ttgctgaagt cctggcccgg gaaaagcggg 960
gcgaacactt gagctggctc tgcattgtct ggatgatcgg tggcatctac gcctctgcca 1020
tggcctgggc catcatcccg cactacgggt ggagcttcag catgggatcg gcctaccagt 1080
ttcacagttg gcgtgtgttt gtcactgtct gtgactccc ctgtgtctcc tccgtggtgg 1140
ccctcacatt catgcctgaa agcccacgat tctgttgga ggttgaaaa catgatgaag 1200
cttgatgat tctgaagtta attcatgaca ccaacatgag agcccggggt cagcctgaga 1260
aggtcttcac ggtaaacaaa ataaaaactc ctaaacaaat agatgagctg attgaaattg 1320
agagtgcac aggaacatgg tataggaggt gttttgttcg gatccgcacc gagctgtacg 1380
gaatttggtt gacttttatc agatgtttca actaccagc cagggataat acaataaagc 1440
ttacaattgt ttgggttcacc ctgtcctttg ggtactatgg attatccgtt tggttccctg 1500
atgtcattaa acctctgcag tccgatgaat atgcattgct aaccagaaat gtggagagag 1560
ataaatatgc aaatttctact attaacttta caatggaaaa tcagattcat actggaatgg 1620

```

```

aatacagacaa tggcagattc ataggggtca agttcaaadc tgtaactttc aaagactctg 1680
tttttaagtc ctgcaccttt gaggatgtaa cttcagttaa cacctacttc aagaactgca 1740
cattttattga cactgttttt gacaacacag attttgagcc atataaattc attgacagtg 1800
aatttaaaaa ctgctcgttt ttccacaaca agacgggatg tcagattacc tttgatgatg 1860
actatagtgc ctactggatt tattttgtca actttctggg gacattggca gtattgccag 1920
ggaacattgt gtctgctctg ctgatggaca gaattgggag cttacaatg ctaggtggct 1980
ctatggtgct ttccggggatc agctgtttct tcctttgggt cggcaccagt gaatccatga 2040
tgataggcat gctgtgtctg tacaatggat tgaccatctc agcctggaac tctcttgacg 2100
tggtcactgt ggaactgtac cccacagacc ggagggcaac aggttttggc ttcttaaatg 2160
cgctatgcaa ggacgagacc gtccctggga acttaatat ttgctctctg gtcagcatca 2220
ccaaatcaat ccccatcctg ctggtttcta ctgtgctctg gtgtggagga ctctgtgggc 2280
tgtgcctgcc tgacacacga acccaggttc tgatgtaatg ggaaaaaaag ccatccttcc 2340
tgcggtttctt cctcctgccc tg
2362

```

<210> 145
 <211> 2053
 <212> ДНК
 <213> Хомо сапієнс

```

<400> 145
catctttgat gagggcagag ctacagttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
gctgtctttc cttccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca accctccgga gaagcccagg tccagagcca aacctcgtac tgacccccca 180
gcccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtgcctg gaaagcacc 300
gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact ttggttatgt 360
tggtgaaca aggagaacaa ctcgatcgtg tcgaagaagg catgaaccat atcaaccaag 420
acatgaagga ggctgagaaa aatttaaaag atttagggaa atgctgtggc cttttcatat 480
gtccttgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtggt ggccagccag cctgctcgtg tagtgagcga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggtt catcccgagg gtaacaaatg atgcccgaga aaatgaaatg gatgaaacc 660
tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggaatcatga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaagccaac caacgtgcaa caaagatgct gggagtggt taagtgtgcc 840
caccctgtt ctctccaaa tgctgtcggg caagatagct ccttcagct tttctcatg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtc accccattg tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttggtctct 1020
ttctttccaa aggttgtaca tagtggtcat ttggtggtc taactccttg atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcggtggc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattott tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtcc tttgagtgtc aggtctgtaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttctct atggctgtta tctgtcttta tgatttcatt attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgcactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380
atthtttagat tctacttaa acaaaaaact tccatgacag tagcatactg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaaacaac agcaacaaca acagaacaac acaaaagcat gtcagatatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact ttttctctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tcctttttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatatgtt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggaatgtaaa taggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtggtgatg taaattttat aaggctgact cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtag aattctttgt tgcttaatct agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaatat aaattcctcc 1980
tgtctcctct gtcagttttg gaagtgtatt acattttgta gctagtttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc
2053

```

<210> 146
 <211> 2053
 <212> ДНК
 <213> Хомо сапієнс

```

<400> 146
catctttgat gagggcagag ctacagttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60

```

```

gctgtctttc cttccctccc tgctcgccgg ctcaccacac gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aaccgcgcac tgacccccca 180
gcccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg gaaagcacc 300
gtcgtatgct gcaactgggt gaagagagta aagatgctgg taccaggact ttggttatgt 360
tgatgaaca aggagaacaa ctggaacgca ttgaggaagg gatggacca atcaataagg 420
acatgaaaga agcagaaaaa aatttgacgg acctaggaaa attctgcggg ctttgtgtgt 480
gtccctgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtggg gccagccag cctgctcgtg tagtggacga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggtt catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gagcgcatc atcggaaccc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaagtggg taagtgtgcc 840
caccggtgtt ctctccaaa tgctgtcggg caagatagct ccttcagtgt tttctcatgg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtc accccattg tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttggtctct 1020
ttctttccaa aggttgtaca tagtggtcat ttggtggctc taactccttg atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcggtggc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200
cagagtact gccacggtcc tttgagtgtc aggtctgtaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttcttc atggctgtta tctgtcttta tgatttcagt attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgcactaaa agtgaatgta tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380
atthtttagat tctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact tttttcctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tcctttttta aaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatataatgt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggaatgaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtgtggatg taaattttat aaggctgact cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtag aattctttgt tgcctaatct agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaatat aaattcctcc 1980
tgtctcctct gtcagtttgt gaagtgtatg acattttgta gctagtttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc 2053

```

<210> 147

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Неприродна послідовність

<220>

<223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
розчеплювана ділянка

<400> 147

Asp Glu Ala Asn Gln

1

5

<210> 148

<211> 6

<212> ПРТ

<213> Неприродна послідовність

<220>

<223> SNAP-25 антиген, що має вільний карбоксильний кінець
в Р1 залишку нестійкого хімічного зв'язку BoNT/A
розчеплювана ділянка

<400> 148

Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Композиція, що містить носій, гнучкий лінкер і антиген SNAP-25, де гнучкий лінкер містить щонайменше три амінокислоти, і антиген SNAP-25 містить SEQ ID NO: 148.
2. Композиція за п. 2, яка **відрізняється** тим, що амінокислотна послідовність гнучкого лінкера і антигену SNAP-25 є SEQ ID NO: 38.
3. Виділене антитіло α -SNAP-25, яке **відрізняється** тим, що виділене антитіло α -SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25;
- 10

де антитіло α -SNAP-25 має константу швидкості асоціації для епітопа, що не містить С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, складову менше $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; і

де антитіло α -SNAP-25 має рівноважну константу дисоціації для епітопа, складову менше 0,450 нМ.

4. Виділене антитіло α -SNAP-25 за п. 3, яке **відрізняється** тим, що епітоп є SEQ ID NO: 32.

5. Виділене антитіло α -SNAP-25, що містить:

а) варіабельну область важкого ланцюга, що містить: SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80 або SEQ ID NO: 82; і

б) варіабельну область легкого ланцюга, що містить: SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 або SEQ ID NO: 92.

6. Виділене антитіло α -SNAP-25, що містить:

а) варіабельну область важкого ланцюга, що містить: SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 121 або SEQ ID NO: 100; і

б) варіабельну область легкого ланцюга, що містить: SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110 або SEQ ID NO: 115.

7. Виділене антитіло α -SNAP-25, що містить щонайменше VH CDR3 з SEQ ID NO: 100, VH CDR3 з SEQ ID NO: 101 або VH CDR3 з SEQ ID NO: 102.

8. Спосіб виявлення активності BoNT/A, що включає стадії:

а) обробки клітини із стабільної клітинної лінії зразком, що містить BoNT/A, де клітина із стабільної клітинної лінії чутлива до інтоксикації BoNT/A в концентрації BoNT/A приблизно 500 пМ або менше;

б) виділення з обробленої клітини компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

в) приведення в контакт компонента SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, пов'язаним з твердофазним носієм,

де антитіло α -SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, де антитіло α -SNAP-25 має константу швидкості асоціації для епітопа з SNAP-25, що не містить С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, складову менше $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; і антитіло α -SNAP-25 має рівноважну константу дисоціації для епітопа, складову менше 0,450 нМ;

г) виявлення наявності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

де виявлення за допомогою комплексу антиген-антитіло є показником активності BoNT/A.

9. Спосіб за п. 8, який відрізняється тим, що продукт розщеплювання SNAP-25 є SNAP-25₁₉₇.

10. Спосіб за п. 8, який відрізняється тим, що присутність комплексу антиген-антитіло виявляють з використанням сендвіч ІФА.

11. Спосіб за п. 8, який відрізняється тим, що спосіб має відношення сигналу до шуму на нижній асимптоті щонайменше 3:1 і відношення сигналу до шуму на верхній асимптоті щонайменше 10:1.

12. Спосіб за п. 8, який відрізняється тим, що зразок містить максимально 100 пМ BoNT/A.

13. Спосіб за п. 8, який відрізняється тим, що клітина із стабільної клітинної лінії чутлива до інтоксикації BoNT/A в концентрації BoNT/A приблизно 100 пМ або менше.

14. Спосіб за п. 8, який відрізняється тим, що спосіб здійснюють в моноплексному варіанті або мультиплексному варіанті.

15. Спосіб визначення імунорезистентності до BoNT/A у ссавця, що включає стадії:

а) додавання BoNT/A до тестованого зразка, одержаного у ссавця, тестованого на наявність або відсутність антитіл, нейтралізуючих α -BoNT/A;

б) обробки клітини із стабільної клітинної лінії тестованим зразком, де клітина із стабільної клітинної лінії чутлива до інтоксикації BoNT/A;

в) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

г) приведення в контакт компонента SNAP-25 з антитілом α -SNAP-25, пов'язаним з твердофазним носієм;

де антитіло α -SNAP-25 зв'язується з епітопом, що містить С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25, де антитіло α -SNAP-25 має константу швидкості асоціації для епітопа з SNAP-25, що не містить С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A продукту розщеплювання SNAP-25,

складову менше $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; і антитіло α -SNAP-25 має рівноважну константу дисоціації для епітопа, складову менше 0,450 нМ;

д) виявлення наявності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло α -SNAP-25 і продукт розщеплювання SNAP-25, що має С-кінцевий глутамін розщеплюваного зв'язку сайту розщеплювання BoNT/A;

е) повторення стадій б-д з негативним контрольним зразком замість тестованого зразка, де негативний контрольний зразок містить BoNT/A і сироватку, про яку відомо, що вона не містить нейтралізуючі антитіла α -BoNT/A; і

ж) порівняння кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії д, з кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії е,

де виявлення меншої кількості комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії д, в порівнянні з кількістю комплексу антиген-антитіло, виявленого на стадії е, є показником присутності нейтралізуючих антитіл α -BoNT/A.

16. Спосіб виявлення активності ботулінічного токсину серотипу А (BoNT/A) у зразку, який відрізняється тим, що спосіб включає наступні стадії:

а) приведення в контакт клітини із стабільної клітинної лінії експресії SNAP-25 поліпептиду, що містить переважно щонайменше фрагмент людського SNAP-25, що містить SEQ ID NO: 5, що розщеплюється на BoNT/A зразком, що можливо містить BoNT/A, де стабільна клітинна лінія чутлива до інтоксикації BoNT/A в концентрації BoNT/A приблизно 500 пМ або менше на літр культурального середовища, як показано ферментативним розщепленням вказаного SNAP-25 поліпептиду BoNT/A з отриманням фрагмента вказаного SNAP-25 поліпептиду, що містить С-кінець амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 38;

б) виділення поліпептидів з клітини;

в) приведення в контакт поліпептидів з моноклональним антитілом, що специфічно зв'язується з пептидом SEQ ID NO: 38, де вказане специфічно зв'язується з епітопом, що містить вказаний фрагмент вказаного SNAP-25 поліпептиду, що містить С-кінець амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 38 з рівноважною константою дисоціацією, зі складовою менше 0,450 нМ, і де вказане антитіло має константу швидкості асоціації для епітопа з інтактним SNAP-25 поліпептидом, що містить SEQ ID NO: 5, що має складову менше $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; та

г) виявлення наявності комплексу антиген-антитіло, що містить антитіло та фрагмент вказаного SNAP-25 поліпептиду, що містить С-кінець амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 38, де висока кількість комплексу антиген-антитіло виявлена висока кількість BoNT/A у зразку.

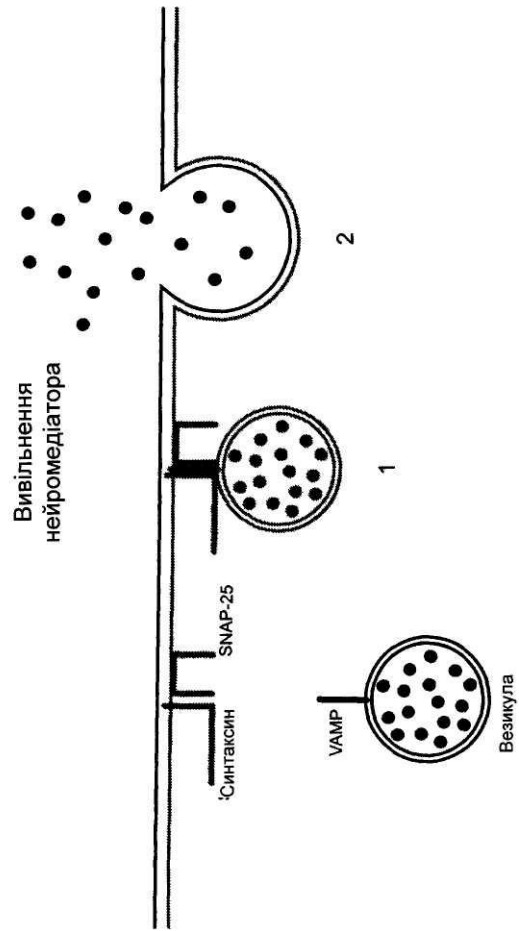


FIG. 1A

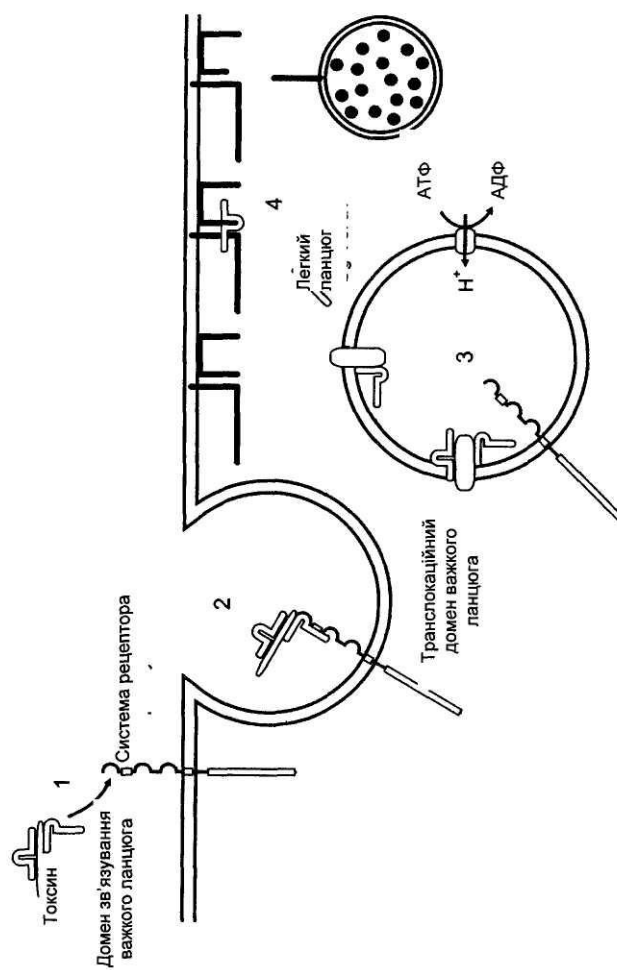
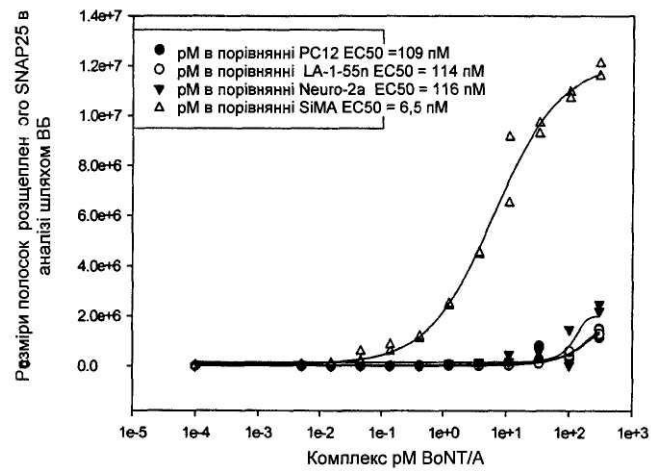


FIG. 1B

A

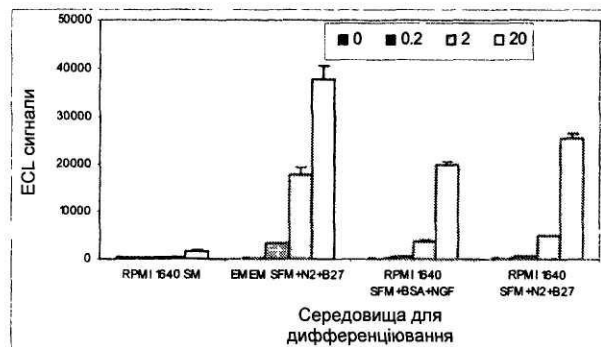
Аналіз шляхом вестерн-блотінга (ВБ)



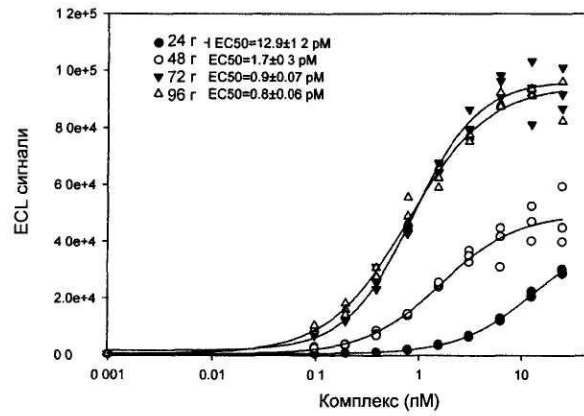
B

Відношення сигнал/шум	PC12	LA-1-55n	Neuro-2a	SiMA
300pM/0pM	107	121	184	412
1 2pM/0pM	3	2	8	85

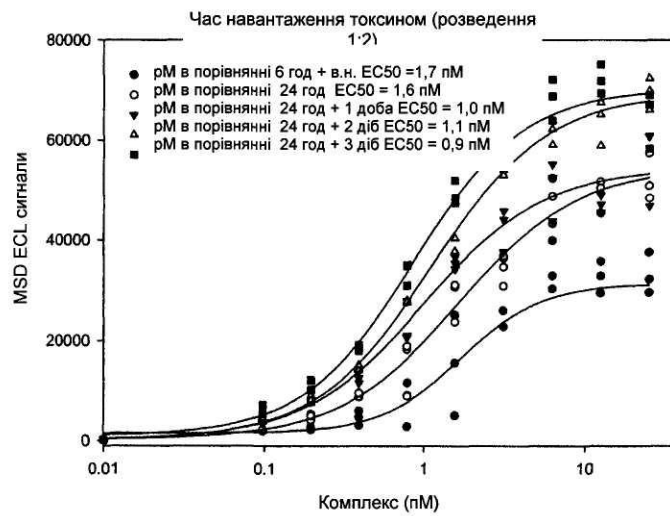
ФІГ. 2



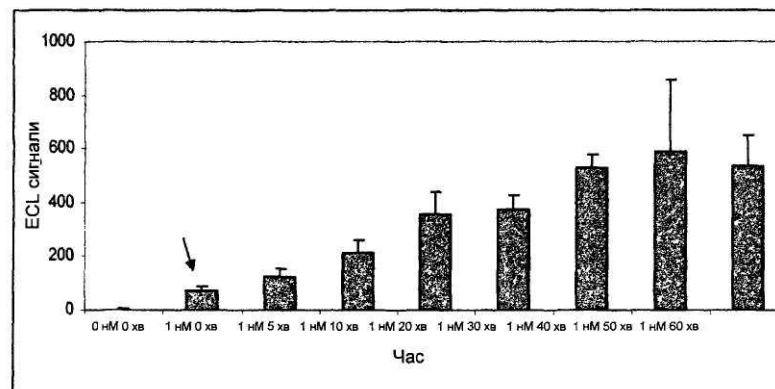
ФІГ. 3



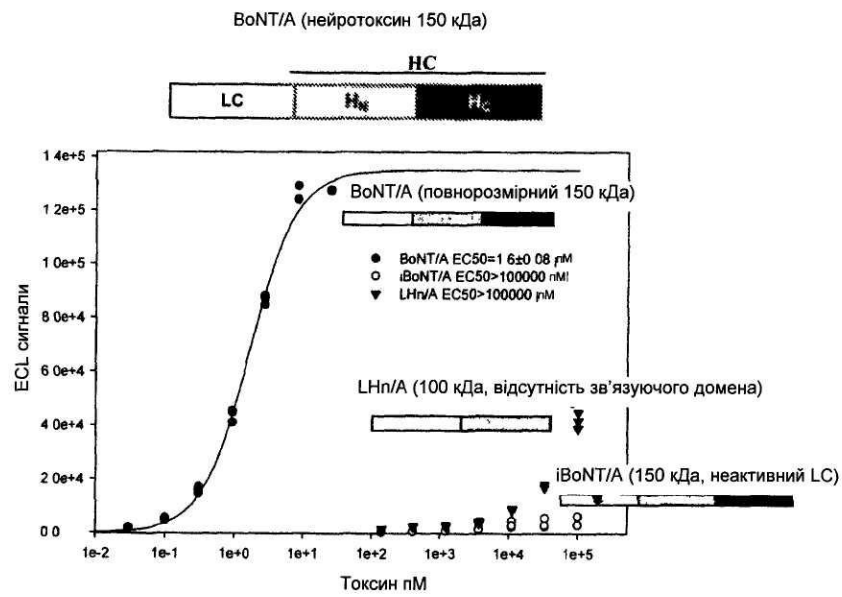
ФІГ. 4



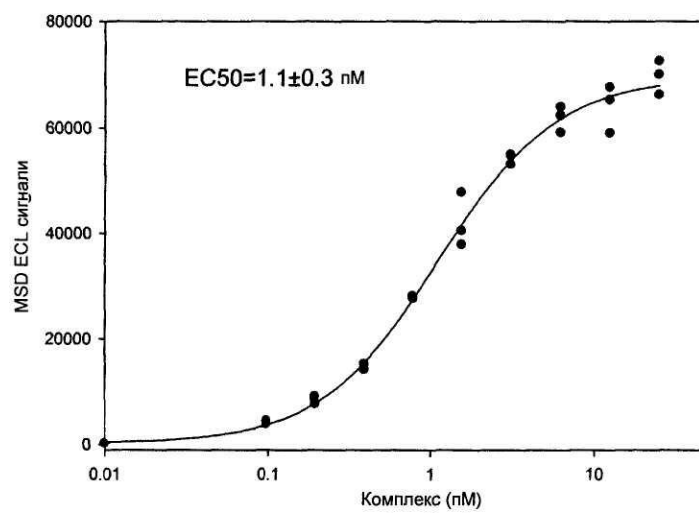
ФіГ. 5



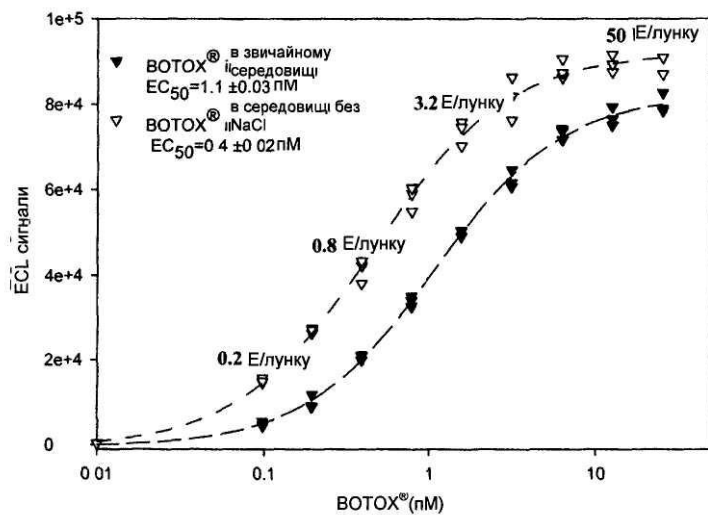
ФіГ. 6



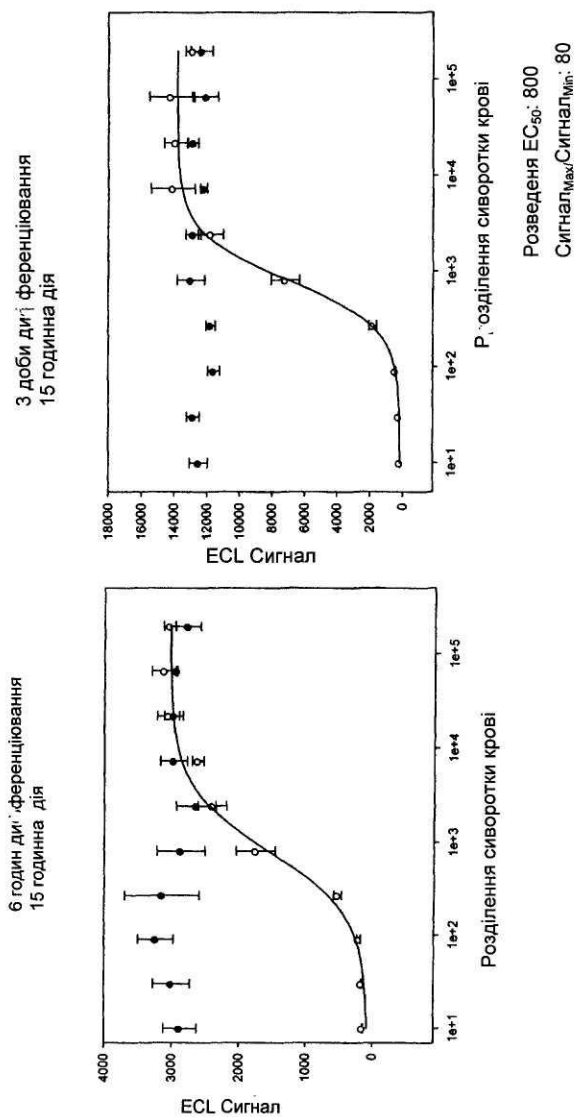
ФІГ. 7



ФІГ. 8



ФІГ. 9



ФІГ. 10

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601