



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 104456

(13) C2

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2011 11973	(72) Винахідник(и):	Ванг Джоан (US),
(22) Дата подання заявки:	12.03.2010		Жу Гонг (US),
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.02.2014		Ходжес Д. Діанна (US),
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/160,217	(73) Власник(и):	Фернандес Салес Істер (US)
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	13.03.2009		АЛЛЕРГАН, ІНК.,
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		2525 Dupont Drive, T2-7H, Irvine, CA 92612, United States of America (US)
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.11.2011, Бюл.№ 21	(74) Представник:	Брагарник Олександр Миколайович,
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.02.2014, Бюл.№ 3		реєстр. №326
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2010/027244, 12.03.2010	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 96/33273 A1, 24.10.1996 WO 95/33850 A1, 14.12.1995 US 2004/219619 A1, 04.11.2004 JONES ET AL: "Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 329, no. 1-2, 23 October 2007 (2007-10-23), pages 92-101

(54) ІМУНОЛОГІЧНІ ТЕСТИ НА АКТИВНІСТЬ ЕНДОПЕПТИДАЗ ІЗ ЗМІНЕНОЮ НАЦІЛЕНІСТЮ**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу виявлення активності ендопептидаз зі зміненою націленістю та анти-SNAP-25 антитіл, які зв'язуються з епітопом, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A з продукту розщеплення SNAP-25.

UA 104456 C2

[01] Дана заявка на патент претендує на пріоритет відповідно до § 119(e) розділу 35 Зводу законів США відповідно до попередньої заявки на патент США № 61/160217, поданої 13 березня 2009 р., зміст якої повністю включений в дану заявку за допомогою посилання.

[02] Послідовності, охарактеризовані в даному описі, наведені в переліку послідовностей, поданому разом з даною заявкою, який повністю включений у дану заявку за допомогою посилання.

[03] Здатність токсинів клостридій, таких як, наприклад, ботулінічні нейротоксини (BoNT,), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F й BoNT/G, і правцевий нейротоксин (TeNT), інгібувати нейронну передачу сигналу знаходить широке застосування в терапії й косметології, див., наприклад, William J. Lipham, *Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin* (Slack, Inc., 2004). Токсини клостридій, комерційно доступні у формі фармацевтичних композицій, включають препарати BoNT/A, такі як, наприклад, BOTOX® (Allergan, Inc., Ірвін, Каліфорнія), DYSPORT®/RELOXIN® (Ipsen Ltd., Слау, Англія), PURTOX® (Mentor Corp., Санта-Барбара, Каліфорнія), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, Gmb., Франкфурт, Німеччина), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Очанг-мієон, Південна Корея), BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Яньтай, Шаньдун, Китай); і препарати BoNT/B, такі як, наприклад, MYOBLOC®/NEUROBLOC® (Solstice Neurosciences, Inc., Південний Сан-Франциско, Каліфорнія). Наприклад, BOTOX® у даний час схвалений в одній або декількох країнах для наступних показань: ахалазія, м'язова спластичність у дорослих, анальні тріщини, біль у спині, блефароспазм, бруксизм, шийна дистонія, есенціальний тремор, міжбровні зморшки або гіперкінетичні лицьові зморшки, головний біль, геміфаціальний спазм, гіперактивність сечового міхура, підвищене потовиділення, дитячий церебральний параліч, розсіяний склероз, міоклонічні порушення, носогубні зморшки, спастична дисфонія, косоокість і ураження VII нерва.

[04] Обробка токсином клостридій призводить до інгібування вивільнення нейромедіаторів і нейропептидів шляхом порушення процесу екзоцитозу, за допомогою якого здійснюється секреція нейромедіаторів і нейропептидів у синаптичну щілину. Фармацевтична промисловість прагне розширити терапевтичне застосування токсину клостридій за межі нинішнього використання як міорелаксанту й застосовувати його для лікування захворювань, пов'язаних із сенсорними нервами, таких як, наприклад, різні види хронічного болю, нейрогенного запалення й урогенітальних порушень, а також інших захворювань, таких як, наприклад, панкреатит. Один підхід, що використовується у даний час для розширення сфери застосування способів лікування на основі токсину клостридій, включає модифікацію токсину клостридій, у результаті якої модифікований токсин має змінену націленість стосовно нервових або стосовно нервових клітин, які представляють собою інтерес. Ці молекули, названі ендопептидазами зі зміненою націленістю або Білками-Модуляторами Направленого Везикулярного Екзоцитозу (TVEMP), здійснюють свою інгібуючу дію відносно екзоцитозу, використовуючи рецептор-мішень, який є присутнім на нервових, або таких що не відносяться до нервових клітинах-мішенях, що представляють собою інтерес. Така зміна специфічності стосовно клітин-мішеней досягається за рахунок заміни природного домена зв'язування токсину клостридій на націлюючий домен, який демонструє вибірково зв'язуючу активність стосовно рецептора, відмінного від рецептора токсину клостридій і присутнього на нервових або таких що не відносяться до нервових клітинах-мішенях, що представляють собою інтерес. Такі модифікації домена зв'язування призводять до того, що молекула здобуває здатність вибірково зв'язувати рецептор, відмінний від рецептора токсину клостридій і присутній на клітинах-мішенях. Ендопептидаза зі зміненою націленістю здатна зв'язуватися з рецептором-мішенню, переміщатися в цитоплазму й проявляти свій протеолітичний ефект стосовно комплексу SNARE нервових або стосовно нервових клітин-мішеней, що представляють собою інтерес.

[05] Одна група ендопептидаз зі зміненою націленістю включає молекули, які мають домен зв'язування з опіоїдними рецепторами. Ці ендопептидази зі зміненою опіоїдною націленістю включають домен зв'язування з опіоїдними рецепторами, транслокаційний домен токсину клостридій і ферментативний домен токсину клостридій. Необмежуючі приклади ендопептидаз зі зміненою опіоїдною націленістю або опіоїдно-TVEMP описані, наприклад, в Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, патенті США 5989545; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, патенті США 7132259; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, патенті США 7244437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, патенті США 7413742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, патенті США 7415338; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, патенті США 7514088; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, публікації заявки на патент США 2008/0064092; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, публікації заявки на патент США

2009/0035822; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, публікації заявки на патент США 2009/0048431; Keith A. Foster, Non-Cytotoxic Protein Conjugates, публікації заявки на патент США 2009/0162341; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, публікації міжнародної заявки WO 2005/023309; i Lance E. Steward, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells, публікації міжнародної заявки WO 2008/008805; зміст кожного з яких повністю включений в дану заявку за допомогою посилання.

[06] Одна із головних відмінностей між ендопептидазами зі зміненою націленістю й токсинами клостридій полягає в тому, що оскільки мотонейрони зазвичай не є мішенями ендопептидаз зі зміненою націленістю, смертність, пов'язана з перевищенням дози ендопептидаз зі зміненою націленістю, у ссавців значно знижена або навіть повністю виключена. Наприклад, ендопептидази зі зміненою опіоїдною націленістю можна ввести в дозі, що перевищує терапевтично ефективну дозу в 10000 раз без прояву свідчень летальності, яка в цьому випадку є результатом пасивної дифузії молекули, а не процесу інтоксикації. Таким чином, ендопептидази зі зміненою націленістю являють собою нелетальні молекули при будь-яких практичних застосуваннях. Хоча ця властивість відсутності летальності має великі переваги для застосування в терапії, виникає проблема, пов'язана з виробництвом, оскільки стандартним тестом на активність, що використовується у виробництві біопрепаратів на основі токсину клостридій, є біотест ЛД50 на мишах, тест на летальність. S. S. Arnon et al., JAMA 285: 1059-1070 (2001). У цей час біотест ЛД50 на мишах використовується всіма виробниками фармацевтичної продукції для вираження активності їхніх препаратів на основі токсину клостридій. Фактично, одиниці активності токсинів клостридій являють собою одиниці ЛД50 у мишей. Однак, внаслідок того, що ендопептидази зі зміненою націленістю власне кажучи нелетальні, біотест ЛД50 на мишах не можна використовувати для оцінки активності цих молекул. Таким чином, простий, надійний, перевірений і прийнятний з погляду державних органів тест на активність, який дозволяє оцінити надійність всіх етапів, необхідних для поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю, мав би значну цінність.

[07] Відповідно до даної заявки запропоновані нові композиції, клітини й способи для оцінки активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, що підходять для застосування в різних галузях промисловості, таких як, наприклад, фармацевтична й харчова промисловість, із забезпеченням пов'язаних із цим переваг. Ці композиції, клітини й способи не припускають використання живих тварин або тканин, взятих у живих тварин, але дозволяють оцінити всі етапи, необхідні для дії ендопептидаз зі зміненою націленістю.

Детальний опис графічних матеріалів

[08] На Фіг. 1 показана схема сучасної парадигми вивільнення нейромедіатора й токсичної дії токсину клостридій у центральному й периферичному нейроні. На Фіг. 1А показана схема механізму вивільнення нейромедіатора в центральному й периферичному нейроні. Процес вивільнення можна описати як такий, що складається з двох етапів: 1) стикування пухирця, при якому пов'язаний з пухирцем білок SNARE пухирця, що містить молекули нейромедіатора, взаємодіє з пов'язаними з мембраною білками SNARE, розташованими на плазматичній мембрані; i 2) вивільнення нейромедіатора, при якому пухирець зливається із плазматичною мембраною й відбувається екзоцитоз молекул нейромедіатора. На Фіг. 1Б показана схема механізму токсичної дії правцевого й ботулінічного токсинів у центральному й периферичному нейроні. Цей процес інтоксикації можна описати як такий, що складається із чотирьох етапів: 1) зв'язування рецептора, при якому токсин клостридій зв'язується з рецепторним комплексом клостридій й ініціює процес інтоксикації; 2) інтерналізації комплексу, при якій після зв'язування токсину відбувається перенесення пухирця, що містить комплекс токсин/рецепторна система, у клітину шляхом ендоцитозу; 3) транслокації легкого ланцюга, при якій, як припускають, має місце велика кількість подій, включаючи зміну рН всередині пухирця, формування каналу пори, що включає домен HN важкого ланцюга токсину клостридій, розділення легкого й важкого ланцюгів токсину клостридій i вивільнення легкого ланцюга, i 4) ферментативної модифікації мішені, при якій легкий ланцюг токсину клостридій протеолітично розщеплює свої субстрат-мішені SNARE, такі як, наприклад, SNAP-25, VAMP або Syntaxin, таким чином запобігаючи стикуванню пухирця й вивільненню нейромедіатора.

[09] На Фіг. 2 показана повнодозова відповідь на ендопептидазу зі зміненою націленістю Nsc/A у клональній клітинній лінії ORL-1Clone #6 з підвищеною експресією ORL-1. Специфічне поглинання Nsc/A можна спостерігати в клональній клітинній лінії ORL-1Clone #6, надекспресуючою ORL-1. Обробка Nsc/A (LHN/A плюс варіант зв'язуючого ліганду ноцицептину) i LHN/A (LC/A й HN без домену зв'язування), проведена на клоні №6 стабільної клітинної лінії ORL-1 у тесті методом твердофазного ІФА в модифікації ECL на розщеплений SNAP-25197,

продемонструвала, що поглинання Noc/A є специфічним у цієї клональної клітинної лінії. Клональна клітинна лінія також демонструє значну чутливість до Noc/A, яка характеризується значенням EC50, що дорівнює 1,2 нМ.

[010] На Фіг. 3 показана повнодозова відповідь на Noc/A у клонах №3 й №22 SK-N-DZ, одержаних з однієї клітини. Специфічне поглинання Noc/A у клонах №3 й №22 SK-N-DZ у порівнянні з LHN/A (n=4 проведених незалежних експерименти). Клітини розсівали на 96-лункові планшети, покриті полі-D-лізином, у СБС RPMI+N2+B27+NGF. Обробка речовинами тривала 22 години. Тест методом твердофазного ІФА в модифікації ECL на розщеплений SNAP-25197 продемонстрував, що поглинання Noc/A є специфічним у цих клональних клітинних лініях. Клональні клітинні лінії також демонструють значну чутливість до Noc/A, яка характеризується значенням EC50, що дорівнює 0,3 нМ для клону №3 й 0,9 нМ для клону №22.

[011] На Фіг. 4 показані результати аналізу "сендвіч"-методом твердофазного ІФА в модифікації ECL на клонах 1C11, 4B7 й 4C9 ORL1 ND7, оброблених ендopeптидазою зі зміненою націленістю Noc/A. Батьківські клони ND7 й ORL1 ND7 обробляли Noc/A протягом 24 годин, після чого проводили інкубацію протягом двох днів. EC50 для батьківського ND7 неможливо було обчислити, тому що розщеплення SNAP-25197 відбувалося лише приблизно на 50 %. У клонах 4B7 й 1C11 розщеплення SNAP-25197 відбувалося більше ніж на 80 %. Обчислені значення EC50 становили відповідно $5,7 \pm 0,5$, $6,7 \pm 1$ й $8,6 \pm 2$ нМ.

[012] На Фіг. 5 показано, що поліклональні антитіла проти ноцицептину здатні блокувати поглинання ендopeптидази зі зміненою націленістю Noc/A у клітинних лініях клону №3, клону №22 SK-N-DZ і клону №6 AGN P33 ORL-1. Клітини розсівали на 96-лункові планшети, покриті полі-D-лізином, у СБС RPMI+N2+B27+NGF й обробляли протягом 22 годин середовищем без сироватки, що містить поліклональні антитіла проти ноцицептину в різних розведеннях (0-3 мкг/мл) і 1 нМ Noc/A.

[013] На Фіг. 6 показані клітини клону AF4 SiMa і стабільної клітинної лінії PC-12, оброблені ендopeптидазою зі зміненою націленістю Dyn/A у концентрації від 0,017 нМ до 1 мкМ, як представлено на зображенні Вестерн блоту. В обох клітинних лініях спостерігали дозозалежне поглинання.

[014] На Фіг. 7 показані нормовані криві аналізу методом поверхневого плазменного резонансу SPR BIAcore з використанням 7,8 нМ антитіл 2E2A6, 1D3B8, 3C1A5 й 2C9B10 і комерційних MC-6050 й MC-6053. На Фіг. 7A показані нормовані дані за швидкістю асоціації для кожного антитіла. На Фіг. 7B показані нормовані дані за швидкістю дисоціації для кожного антитіла.

Детальний опис винаходу

[015] Згідно із даним винаходом запропоновані нові тести для аналізу присутності або відсутності в зразку активної ендopeптидази зі зміненою націленістю й для аналізу активності ендopeптидази зі зміненою націленістю. Нові клітинні тести, описані в даній заявці, ґрунтуються на клітинах, реагентах і способах детектування, завдяки яким дані тести можна використовувати для детектування наномольних кількостей ендopeптидази зі зміненою націленістю в зразку. Клітинні тести, що описані в даній заявці, призначені для аналізу множинних функцій ендopeптидази зі зміненою націленістю, а саме, зв'язування ендopeптидази зі зміненою націленістю з рецептором на поверхні клітини, інтерналізації комплексу ендopeптидаза-рецептор, транслокації ферментативного домену в цитоплазму й розщеплення субстрату ферментативним доменом. Як більш детально обговорюється нижче, нові способи й композиції можна використовувати для аналізу як неопрацьованих й об'єднаних зразків, так і високоочищених дволанцюгових ендopeптидаз зі зміненою націленістю й складів на основі ендopeптидаз зі зміненою націленістю, а також у форматі автоматизованого високопродуктивного аналізу.

[016] Таким чином, відповідно до одного аспекту даного винаходу запропоновані композиції, що викликають імунну відповідь, для одержання анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Композиції, що викликають імунну відповідь, можуть включати ад'ювант і композиції, що викликають імунну відповідь, включаючи антиген SNAP-25, носій, пов'язаний з антигеном SNAP-25, або носій, пов'язаний із гнучким спейсером, у свою чергу пов'язаним з антигеном SNAP-25, де між антигеном SNAP-25 і носієм поміщений гнучкий лінкер. Припускається, що всі без винятку антигени SNAP-25, які викликають імунну відповідь, яка призводить до вироблення анти-SNAP-25 антитіл, здатних вибірково зв'язуватися з епітопом SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, можуть бути придатні як антигени SNAP-25, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: антигени

SNAP-25, одержані із природного SNAP-25, антигени SNAP-25, одержані з SNAP-25, що не зустрічається в природі, і антигени SNAP-25, що включають імунореактивні фрагменти SNAP-25, SNAP-25 із природного SNAP-25 або SNAP-25, що не зустрічається в природі. Антигени SNAP-25, придатні для одержання анти-SNAP-25 антитіл, здатних вибірково зв'язуватися з епітопом SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, включають, без обмеження, антигени SNAP-25, що включають пептид SNAP-25, на С-кінці якого знаходиться карбоксильований залишок глутаміну, пов'язаний з пептидом-носієм, включаючи, без обмеження, SEQ ID NO: 38. Інші композиції, що викликають імунну відповідь, придатні для одержання анти-SNAP-25 антитіл, здатних вибірково зв'язуватися з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, включають, без обмеження, композиції, що викликають імунну відповідь, які містять носій, пов'язаний із гнучким лінкером, у свою чергу пов'язаним з антигеном SNAP-25-карбоксильованим С-кінцевим глутаміном, причому гнучкий лінкер поміщений між антигеном SNAP-25 і носієм. Припускається, що в такій композиції, яка викликає імунну відповідь, можуть застосовуватися будь-які ад'юванти, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: поліетиленгліколь (ПЕГ), монометоксиполіетиленгліколь (мПЕГ), полівінілалкоголь (ПВА), повний і неповний ад'ювант Фрейнда.

[017] Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропоновані способи одержання анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом, що містить продукт розщеплення SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A. Аспекти даного способу включають етапи (а) введення тваринам композиції, що викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, яка описана в даній заявці; (б) відбір у тварин зразка, що містить анти-SNAP-25 антитіло або клітину, що продукує анти-SNAP-25 антитіло; і (в) виділення анти-SNAP-25 антитіла зі зразка. Описані способи придатні для одержання моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом, що містить продукт розщеплення SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, або поліклональних анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом, що містить продукт розщеплення SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A.

[018] Відповідно до ще одного аспекту даного винаходу запропоновані анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом, що містить SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A. Такі анти-SNAP-25 антитіла включають як природні антитіла, так і антитіла, що не зустрічаються в природі, а також поліклональні антитіла або поліклональні анти-SNAP-25 антитіла. Моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, придатні як анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з антигеном SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, включають, без обмеження, моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, одержані в гібридомних клітинних лініях 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 й 3C3E2.

[019] Відповідно до ще одного аспекту даного винаходу запропоновані імунологічні способи детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю. Аспекти даного способу включають етапи (а) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії зразком, що містить ендопептидазу зі зміненою націленістю, причому клітина зі стабільної клітинної лінії чутлива до активності ендопептидази зі зміненою націленістю; (б) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A; (в) приведення компонента SNAP-25 у контакт із анти-SNAP-25 антитілами, описаними в даній заявці; і (г) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A; при цьому детектування з використанням комплексу антитіло-антиген є показником активності ендопептидази зі зміненою націленістю. Анти-SNAP-25 антитіла з етапу (в) можуть бути пов'язані із твердофазною підкладкою.

[020] Відповідно до ще одного аспекту даного винаходу запропоновані імунологічні способи детектування активності опіоїдно-TVEMP. Аспекти даного способу включають етапи (а) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії зразком, що містить ендопептидазу зі зміненою націленістю, причому клітина зі стабільної клітинної лінії має здатність до поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю; (б) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті

розщеплення токсином BoNT/A; (в) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілами, описаними в даній заявці; і (г) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A; при цьому детектування з використанням комплексу антитіло-антиген є показником активності ендопептидази зі зміненою націленістю. Анти-SNAP-25 антитіла з етапу (в) можуть бути пов'язані із твердофазною підкладкою.

[021] Відповідно до подальшого аспекту даного винаходу запропоновані способи визначення імунної резистентності ссавців стосовно ендопептидази зі зміненою націленістю. Аспекти даного способу включають етапи (а) додавання ендопептидази зі зміненою націленістю до тестуємого зразка, одержаного з організму ссавця, досліджуваного на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл проти ендопептидази зі зміненою націленістю; (б) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії тестувальним зразком, причому клітина зі стабільної клітинної лінії чутлива до активності ендопептидази зі зміненою націленістю; (в) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A; (г) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілами, описаними в даній заявці; (д) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A; (е) повторення етапів а-д зі зразком для негативного контролю замість тестувального зразка; (ж) порівняння кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі (д), з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованою на етапі (е), при цьому детекція меншої кількості комплексу антитіло-антиген, детектованої на етапі (д), у порівнянні з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованою на етапі (е), свідчить про присутність нейтралізуючих антитіл проти ендопептидази зі зміненою націленістю. Анти-SNAP-25 антитіла з етапу (г) можуть бути пов'язані із твердофазною підкладкою. Контрольний зразок з етапу (е) може також включати зразок для позитивного контролю на додаток до зразка для негативного контролю.

[022] Токсини клостридій, що виробляються *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium baratii* й *Clostridium butyricum*, є найбільш широко використовуваними в терапевтичних і косметичних цілях у людини й інших ссавців. Штами *C. botulinum* виробляють сім імунологічно відмінних серотипів ботулінічних токсинів (BoNTs), які були виявлені при дослідженні спалахів ботулізму в людини (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E й BoNT/F), тварин (BoNT/C1 й BoNT/D) або були ізольовані із ґрунту (BoNT/G). Хоча всі сім серотипів ботулінічного токсину мають подібну структуру й біологічні властивості, кожен з них також демонструє гетерогенні характеристики, такі як, наприклад, різні фармакологічні властивості. Навпаки, токсин правця (TeNT) виробляє однорідна група *C. tetani*. Два інші види *Clostridia*, *C. baratii* й *C. butyricum*, також виробляють токсини, подібні відповідно BoNT/F й BoNT/E.

[023] Кожен з токсинів клостридій транслюється у виді одного поліланцюга масою приблизно 150 кДа, який згодом протеолітично розрізається в межах дисульфідної петлі природною протеазою, такою як, наприклад, ендогенна протеаза токсину клостридій або природною протеазою, що виробляється в навколишньому середовищі. Цей посттрансляційний процесінг призводить до утворення молекули, яка складається із двох ланцюгів і включає легкий ланцюг (LC) масою приблизно 50 кДа й важкий ланцюг (HC) масою приблизно 100 кДа, що втримуються разом єдиним дисульфідним зв'язком і нековалентними взаємодіями. Кожна зріла дволанцюгова молекула включає три функціонально відмінних домени: 1) ферментативний домен, розташований в LC, який включає металопротеазну область, що має цинк-залежну ендопептидазну активність, специфічною мішенню якої є основні компоненти апарату вивільнення нейромедіатора; 2) транслокаційний домен, який міститься в межах аміно-кінцевої половини HC (HN) і полегшує вивільнення LC із внутрішньоклітинних пухирців у цитоплазму клітини-мішені; і 3) зв'язуючий домен, що знаходиться в межах карбокси-кінцевої половини HC (HC), який визначає зв'язуючу активність і специфічність зв'язування токсину з рецепторним комплексом, розташованим на поверхні клітини-мішені.

[024] Зв'язуюча, транслокаційна й ферментативна активності цих трьох функціональних domenів є необхідними для токсичності. Хоча деталі цього процесу ще не відомі повністю, загальні механізми клітинної інтоксикації, завдяки яким токсини клостридій проникають у нейрон й інгібують вивільнення нейромедіатора, є подібними, незалежно від серотипу або підтипу. Хоча заявники не мають на увазі, що даний опис буде обмежувати даний винахід, механізм інтоксикації можна описати як такий, що включає щонайменше чотири етапи: 1) зв'язування рецептора, 2) інтерналізація комплексу, 3) транслокація легкого ланцюга й 4) ферментативна

модифікація мішені (ФІГ. 1). Процес починається, коли домен НС токсину клостридій зв'язується з токсин-специфічною рецепторною системою, розташованою на поверхні плазматичної мембрани клітини-мішені. Специфічність зв'язування рецепторного комплексу, як припускають, частково забезпечується певними комбінаціями гангліозидів і білкових рецепторів, які, очевидно, включають кожен окремий рецепторний комплекс токсину клостридій. Після утворення комплексу токсин/рецептор він інтерналізується за механізмом ендоцитозу, а інтерналізовані пухирці направляються за визначеними внутрішньоклітинними маршрутами. Припускають, що етап транслокації ініціюється закисненням компартменту пухирця. Цей процес, очевидно, ініціює важливі залежні від рН структурні перебудови, які збільшують гідрофобність, сприяють формуванню пори й полегшують розділення важких і легких ланцюгів токсину. Після розділення ендopeптидаза легкого ланцюга токсину вивільняється із внутрішньоклітинного пухирця в цитозоль, де, як припускають, її специфічними мішенями є основні компоненти апарату вивільнення нейромедіатора. Ці основні білки, зв'язаний з пухирцем мембранний білок (VAMP, vesicle-associated membrane protein)/синаптобrevін, зв'язаний із синапсомомою білок масою 25 кДа (SNAP-25, synaptosomal-associated protein of 25 kDa) і Синтаксин, необхідні для стикування синаптичних пухирців й злиття в нервовому закінченні і є членами родини розчинних білкових рецепторів прикріплення N-етилmaleimід-чутливого фактора (SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein-receptor). BoNT/A й BoNT/E розщеплюють SNAP-25 у карбокси-кінцевій області, вивільняючи фрагмент, що складається відповідно з дев'яти або двадцяти шести амінокислот, а BoNT/C1 також розщеплює SNAP-25 близько карбоксильного кінця, вивільняючи фрагмент, що складається з восьми амінокислот. Ботулінічні серотипи BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F й BoNT/G і токсин правця впливають на консервативну центральну частину VAMP і вивільняють аміно-кінцеву частину VAMP у цитозоль. BoNT/C1 розщеплює синтаксин у єдиному місці близько поверхні цитоплазматичної мембрани. Вибірковий протеоліз синаптичних білків SNARE призводить до блокування вивільнення нейромедіатора, що викликається токсинами клостридій *in vivo*. Мішені токсинів клостридій, білки SNARE, характерні для екзоцитозу у великій кількості типів клітин, які не відносяться до нейронів; у цих клітинах, як і у нейронах, пептидазна активність легкого ланцюга інгібує екзоцитоз, див., 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).

[025] Ендopeптидази зі зміненою націленістю зазвичай заміщують сайт розщеплення природних дволанцюгових протеаз із петлевою структурою сайтом розщеплення екзогенних протеаз. Див. наприклад, Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, патент США 7419676, включений у дану заявку за допомогою посилання. Хоча ендopeптидази зі зміненою націленістю варіюють згідно загальної молекулярної масі через розмір націлюючого домену, процес активації та його залежність від розщеплення за екзогенним сайтом розщеплення з утворенням дволанцюгової молекули є, по суті, тим же самим, як і для токсинів клостридій. Див., наприклад, Steward, L.E. et al., Activatable Clostridial Toxins, публікація заявки на патент США 2009/0005313; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США 11/776,075; 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, зміст кожного з яких включено в дану заявку за допомогою посилання.

[026] Частина аспектів даного опису включає композицію, що викликає імунну відповідь, для одержання анти-SNAP-25 антитіл, здатних вибірково зв'язуватися з SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A. У даній заявці термін "композиція, що викликає імунну відповідь" відноситься до композиції, що включає антиген SNAP-25, який при введенні тварині стимулює імунну відповідь стосовно антигену SNAP-25, тим самим призводячи до утворення анти-SNAP-25 антитіл, здатних вибірково зв'язуватися з SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A... Термін "імунна відповідь" відноситься до будь-якої відповіді імунної системи тварини на композицію, що викликає імунну відповідь. Приклади імунних відповідей включають, але не обмежуються перерахованими: клітинний, а також місцевий і системний гуморальний імунітет, такі як, наприклад, відповіді цитолітичних лімфоцитів, включаючи антиген-специфічну індукцію CD8 + цитолітичних лімфоцитів, відповіді Т-клітин-хелперів, включаючи проліферативні відповіді Т-клітин і вивільнення цитокінів, і відповіді В-клітин, включаючи, наприклад, відповідь утворення антитіл.

Термін "стимуляція імунної відповіді" відноситься до введення композиції, що викликає імунну відповідь або полінуклеотиду, який кодує композицію, що викликає імунну відповідь, при якій затронута імунна відповідь, тобто вона стимулюється, ініціюється або індукується.

[027] Композиція, що викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, включає антиген SNAP-25. У даній заявці термін "антиген" відноситься до молекули, що викликає імунну відповідь і включає, але не обмежуються перерахованими: пептиди, полісахариди й кон'югати ліпідів, такі як, наприклад, ліпопротеїни й гліколіпіди. У даній заявці термін "антиген SNAP-25" відноситься до будь-якого антигену, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, здатному викликати імунну відповідь. Антиген SNAP-25, що використовується у складі композиції, що викликає імунну відповідь, повинен бути досить великим для того, щоб його послідовність була по суті унікальною, щоб забезпечити зниження ймовірності одержання антитіл, які мають перехресну націленість стосовно антигенів, відмінних від SNAP-25. Крім того, антиген SNAP-25, що використовується у складі композиції, яка викликає імунну відповідь, повинен бути досить невеликим для того, щоб викликати імунну відповідь істотної інтенсивності тільки проти SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, для підвищення ймовірності одержання анти-SNAP-25 антитіл, здатних відрізнати SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, від SNAP-25, на карбоксильному кінці якого відсутній залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Крім того, дуже бажано також одержати з хорошим виходом анти-SNAP-25 антитіла однієї амінокислотної послідовності, які відтворювано вибірково й зв'язуються із прийнятною авідністю, щоб уможливити розробку високочутливого тесту.

[028] Послідовність, що оточує сайт розщеплення BoNT/A, присутній в SNAP-25, позначена 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' означає розрізуваний зв'язок. Після розщеплення ендопептидазою зі зміненою націленістю, продукти розщеплення, що утворюються, містять фрагмент, що включає послідовність $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1'$, і фрагмент, що включає $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$. Таким чином, у даній заявці термін "SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A" відноситься до будь-якого SNAP-25, у якого карбокси-кінцевою амінокислотою є залишок P_1 . Наприклад, Q₁₉₇-R₁₉₈ SNAP-25 людини (SEQ ID NO: 5) являє собою розрізуваний зв'язок P_1-P_1' сайту розщеплення BoNT/A. У зв'язку із цим "SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться глутамін розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A" є будь-який продукт розщеплення SNAP-25, у якого карбокси-кінцевою амінокислотою є глутамін, причому глутамін являє собою Q₁₉₇ розрізаного зв'язку. Як інший приклад можна навести K₂₀₄-H₂₀₅ SNAP-25 Torpedo marmorata (SEQ ID NO: 16), що являє собою розрізуваний зв'язок P_1-P_1' сайту розщеплення BoNT/A. У зв'язку із цим "SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться лізин розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A" є будь-який продукт розщеплення SNAP-25, у якого карбокси-кінцевою амінокислотою є лізин, причому лізин являє собою K₂₀₄ розрізаного зв'язку.

[029] Антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, можна модифікувати з підвищенням імуногенності антигену SNAP-25, гаптену або будь-якої іншої антигенної сполуки, яка під час відсутності модифікації є імуногенною, неімуногенною або слабоімуногенною. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, карбокси-кінцевий залишок P_1 розрізаного зв'язку антигену SNAP-25 може карбоксилюватися. Карбоксилювання збільшує бажані імуногенні властивості антигену SNAP-25 у двох відношеннях. По-перше, оскільки заряджені амінокислоти збільшують імуногенність, додавання COO--групи до карбокси-кінцевого залишку збільшить загальну імуногенність антигену SNAP-25. По-друге, оскільки залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A знаходиться в зарядженому стані після розщеплення, додавання COO--групи до карбокси-кінцевого залишку підвищить подібність даного антигену до вихідного антигену, для вибіркового зв'язування з яким розроблені анти-SNAP-25 антитіла, описані в даній заявці.

[030] Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, аміно-кінцевий залишок антигену SNAP-25 може бути модифікований шляхом додавання амінокислоти, пристосованої для приєднання антигену SNAP-25 до білка-носія, такого як, наприклад, гемоціанін фісурели (KLH), овальбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий інгібітор трипсину (STI) або пептид множинного прикріплення (MAP). Наприклад, залишок цистеїну може бути поміщений на N-кінець для того, щоб приєднати білок-носіє KLH.

[031] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, довжина антигену SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення

BoNT/A, може становити, наприклад, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9, щонайменше 10, щонайменше 11, щонайменше 12, щонайменше 13, по меншій мері 14, щонайменше 15, щонайменше 16, щонайменше 17, щонайменше 18, щонайменше 19, щонайменше 20, щонайменше 25 або щонайменше 30 амінокислот. Відповідно до іншого варіанта реалізації, довжина антигену SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може становити, наприклад, якнайбільше 5, якнайбільше 6, якнайбільше 7, якнайбільше 8, якнайбільше 9, якнайбільше 10, якнайбільше 11, якнайбільше 12, якнайбільше 13, якнайбільше 14, якнайбільше 15, якнайбільше 16, якнайбільше 17, якнайбільше 18, якнайбільше 19, якнайбільше 20, якнайбільше 25 або якнайбільше 30 амінокислот. Згідно ще одного варіанту реалізації, довжина антигену SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може знаходитися, наприклад, у межах 7-12 амінокислот, у межах 10-15 амінокислот або в межах 13-18 амінокислот.

[032] Відповідно до іншого варіанту реалізації, антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, включає SEQ ID NO: 33. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, включає SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 або SEQ ID NO: 39. Відповідно до подальшого варіанта реалізації, антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, включає SEQ ID NO: 40.

[033] Згідно ще одного варіанту реалізації, антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, включає SEQ ID NO: 41. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, включає SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46. Відповідно до подальшого варіанта реалізації, антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, включає SEQ ID NO: 47.

[034] Припускається, що всі без винятку антигени SNAP-25, які викликають імунну відповідь, що призводить до вироблення анти-SNAP-25 антитіл, здатних вибірково зв'язуватися з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, можуть бути придатні як антигени SNAP-25. Таким чином, варіанти амінокислотних послідовностей, що включають 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: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 або SEQ ID NO: 46, можуть бути придатні як антигени SNAP-25, які викликають імунну відповідь, що призводить до вироблення анти-SNAP-25 антитіл, здатних вибірково зв'язуватися з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, антиген SNAP-25 може містити щонайменше 1, щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4 або щонайменше 5 замін, делецій або інсерцій в амінокислотних послідовностях антигенів SNAP-25, що включають 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: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 або SEQ ID NO: 46. Згідно ще одного варіанту реалізації, антиген SNAP-25 може бути щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентичний згідно послідовності амінокислот антигенам SNAP-25, що включають 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: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 або SEQ ID NO: 46.

[035] Припускається, що з антигеном SNAP-25 може бути зв'язаний один або декілька носіїв, які забезпечують підвищення імуногенності антигену SNAP-25, який є імуногенним, неімуногенним або слабоімуногенним у не пов'язаному з носієм виді. Необмежуючі приклади включають, наприклад, гемоціанін фісурели (KLH), овальбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий інгібітор трипсину (STI) або пептид множинного прикріплення (MAP). Як добре відомо в даній галузі техніки, неантигенний або слабоантигенний антиген може бути перетворений в антигенний шляхом зв'язування антигену з носієм. Велика кількість інших носіїв і способів зв'язування антигену з носієм добре відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Harlow and Lane, див. вище, 1998a; Harlow and Lane, див. вище, 1998b; і David W. Waggoner, Jr. et al., Immunogenicity-enhancing carriers and compositions thereof and methods of

using the same, публікація заявки на патент США №20040057958 (25 березня 2004 р.). Епітоп також може бути одержаний шляхом експресії епітопа в складі химерного білка. Способи експресії химерних поліпептидів добре відомі фахівцям у даній галузі техніки, як описано, наприклад, в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999). Оскільки на карбоксильному кінці антигену SNAP-25 повинен знаходитися залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, носій повинен бути приєднаний до N-кінця антигену SNAP-25.

[036] Припускається, що з антигеном SNAP-25 може бути зв'язаний один або декілька гнучких спейсерів, які підвищують імуногенність антигену SNAP-25, який є імуногенним, неімуногенним або слабоімуногенним у не пов'язаному із гнучкими лінкерами виді. Гнучкий спейсер збільшує загальну довжину пептиду антигену SNAP-25 і забезпечує гнучкість, тим самим полегшуючи належну презентацію антигену SNAP-25 імуноцитам. Як необмежуючий приклад, композиція, що викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, може включати антиген SNAP-25, пов'язаний з одним або декількома гнучкими спейсерами в тандемі для кращої презентації антигену SNAP-25 імуноцитам, тим самим полегшуючи імунну відповідь.

[037] Гнучкий спейсер, що містить пептид, становить у довжину щонайменше одну амінокислоту й включає незаряджені амінокислоти з невеликими групами бічних ланцюгів (R), такі як, наприклад, гліцин, аланін, валін, лейцин або серин. Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, довжина гнучкого спейсера може становити, наприклад, щонайменше 1, щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9 або щонайменше 10 амінокислот. Відповідно до іншого варіанта реалізації, довжина гнучкого спейсера може становити, наприклад, щонайменше 1, якнайбільше 2, якнайбільше 3, якнайбільше 4, якнайбільше 5, якнайбільше 6, якнайбільше 7, якнайбільше 8, якнайбільше 9 або якнайбільше 10 амінокислот. Згідно ще одного варіанту реалізації, довжина гнучкого спейсера може знаходитися, наприклад, у межах 1-3 амінокислот, у межах 2-4 амінокислот, у межах 3-5 амінокислот, у межах 4-6 амінокислот або в межах 5-7 амінокислот. Необмежуючі приклади гнучкого спейсера включають, наприклад, G-спейсери, такі як GGG, GGGG (SEQ ID NO: 57) і GGGGS (SEQ ID NO: 58), або A-спейсери, такі як AAA, AAAA (SEQ ID NO: 59) і AAAAV (SEQ ID NO: 60). Гнучкий спейсер пов'язаний з антигеном SNAP-25 в одній рамці читування в складі химерного білка.

[038] Як відзначалося вище, гнучкий спейсер частково використовують для збільшення загальної довжини пептиду антигену SNAP-25. Наприклад, загальну довжину антигену SNAP-25 з 5-10 амінокислот можна збільшити шляхом приєднання гнучкого спейсера довжиною 3-5 амінокислот до N-кінця антигену SNAP-25. Як інший приклад, загальну довжину антигену SNAP-25 з 5-10 амінокислот можна збільшити шляхом приєднання гнучкого спейсера довжиною 4-6 амінокислот до N-кінця антигену SNAP-25. Як інший приклад, загальну довжину антигену SNAP-25 з 5-10 амінокислот можна збільшити шляхом приєднання гнучкого спейсера довжиною 7-10 амінокислот до N-кінця антигену SNAP-25. Як інший приклад, загальну довжину антигену SNAP-25 з 7-12 амінокислот можна збільшити шляхом приєднання гнучкого спейсера довжиною 1-3 амінокислот до N-кінця антигену SNAP-25. Як інший приклад, загальну довжину антигену SNAP-25 з 7-12 амінокислот можна збільшити шляхом приєднання гнучкого спейсера довжиною 4-6 амінокислот до N-кінця антигену SNAP-25. Збільшення довжини, що забезпечується гнучким спейсером, дозволяє вибрати антиген SNAP-25 невеликого розміру, тим самим збільшуючи ймовірність того, що антиген SNAP-25 викликає імунну відповідь істотної інтенсивності тільки проти SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, таким чином підвищуючи можливість одержання анти-SNAP-25 антитіл, здатних відрізняти SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, від SNAP-25, на карбоксильному кінці якого відсутній залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A.

[039] Припускається, що композиція, яка викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, яка описана в даній заявці, може включати антиген SNAP-25, описаний у даній заявці, і один або декілька ад'ювантів. У даній заявці термін "ад'ювант" стосовно композиції, що викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, відноситься до будь-якої речовини або суміші речовин, які збільшують або урізноманітнюють імунну відповідь на антиген SNAP-25. Ад'ювант, що викликає імунну відповідь може, наприклад, служити для зниження числа імунізацій або кількості антигену, необхідного для захисної імунізації. Добре відоме використання ад'ювантів, що викликають імунну відповідь, у складі композиції, яка викликає імунну відповідь. Основним призначенням цих ад'ювантів є збільшення імунної відповіді. Необмежуючі приклади ад'ювантів включають, наприклад, ліпосоми, масляні фази, включаючи, без обмеження, ад'юванти типу Фрейнда, такі як, наприклад, повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ); неповний ад'ювант Фрейнда

(НАФ); глікозиди сапогеніну, такі як, наприклад, сапоніни; карбопол; N-ацетилмураміл-L-аланіл-D-ізоглутамін (зазвичай названий мурамідпептид або "МДП"); і ліпополісахариди (ЛПС). Такі ад'юванти зазвичай використовують у формі емульсії, яка містить водну фазу, або частіше можуть складатися з не розчинних у воді неорганічних солей. Ці неорганічні солі можуть складатися, наприклад, з гідроксиду алюмінію, сульфату цинку, колоїдного гідроксиду заліза, фосфату кальцію або хлориду кальцію. Гідроксид алюмінію ($\text{Al}(\text{OH})_3$) є таким, що широко використовується ад'ювантом. У цей час єдиним ад'ювантом, схваленим FDA для використання у людей, є солі алюмінію (Alum), які використовуються для "депонування" антигенів за допомогою їх преципітації. Зазначені вище ад'юванти наведені просто як приклади. Фактично, будь-який ад'ювант, що викликає імунну відповідь, можна використовувати в складі композиції, що викликає імунну відповідь, описаної в даній заявці, за умови, що ад'ювант має характеристики, необхідні для того, щоб викликати імунну відповідь.

[040] Носій, описаний у даній заявці, може також діяти як ад'ювант. Конкретні ад'юванти й способи їхнього одержання й використання 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 Using the Same, публікація патенту США №20040057958 (25 березня 2004 р.). Додаткові ад'юванти включають будь-які сполуки, описані в 7 главі (стр. 141-227) "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell, M. F. and Newman, M. J.) Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Plenum Press (New York). Приклади із цього довідника включають мурамідпептид (МДП) і Монтанід 720. Молекули, такі як поліінозин:цитозин (poly:C) або плазмідна ДНК, що містить мотиви CpG, можна також вводити як ад'юванти у комбінації з антигенами, залученими в мікрочастинки. В іншому прикладі ад'ювант являє собою агент, який полегшує проникнення антигенної сполуки в цитоплазму клітини, такої як лістеріолізін, стрептолізін або їхня суміш.

[041] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, композиція, що викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, включає антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться карбоксильований залишок глутаміну, пов'язаний з пептидом-носієм. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться карбоксильований залишок глутаміну, включає 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: 38 або SEQ ID NO: 39. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, антиген SNAP-25 включає SEQ ID NO: 40. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, пептид-носіє являє собою гемоціанін фісурели (KLH), овальбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий інгібітор трипсину (STI) або пептид множинного прикріплення (MAP).

[042] Відповідно до іншого варіанта реалізації, композиція, що викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, включає антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться карбоксильований залишок лізину, пов'язаний з пептидом-носієм. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться карбоксильований залишок лізину, включає SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 або SEQ ID NO: 46. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, антиген SNAP-25 включає SEQ ID NO: 47. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, пептид-носіє являє собою гемоціанін фісурели (KLH), овальбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий інгібітор трипсину (STI) або пептид множинного прикріплення (MAP).

[043] Згідно ще одного варіанту реалізації, композиція, що викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, включає антиген SNAP-25, на C-кінці якого знаходиться карбоксильований залишок глутаміну, пов'язаний з одним або декількома гнучкими лінкерами й пептидом-носієм, причому гнучкі лінкери поміщені між антигеном SNAP-25 і пептидом-носієм. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться карбоксильований залишок глутаміну, включає 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: 38 або SEQ ID NO: 39. Відповідно до іншого варіанта реалізації, антиген SNAP-25 включає SEQ ID NO: 46. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, пептид-носіє являє собою гемоціанін фісурели (KLH), овальбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий інгібітор трипсину (STI) або пептид множинного прикріплення (MAP). Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, гнучкий лінкер являє собою G-спейсер або A-спейсер.

[044] Згідно ще одного варіанту реалізації, композиція, що викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, включає антиген SNAP-25, на C-кінці якого знаходиться карбоксильований залишок лізину, пов'язаний із гнучким лінкером і пептидом-носієм, причому гнучкий лінкер

поміщений між антигеном SNAP-25 і пептидом-носієм. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, антиген SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться карбоксильований залишок лізину, включає SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 або SEQ ID NO: 46. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, антиген SNAP-25 включає SEQ ID NO: 47. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, пептид-носії являє собою гемоціанін фісурели (KLH), овальбумін (OVA), тиреоглобулін (THY), бичачий сироватковий альбумін (BSA), соєвий інгібітор трипсину (STI) або пептид множинного прикріплення (MAP). Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, гнучкий лінкер являє собою G-спейсер або A-спейсер.

[045] Частина аспектів даного опису включає спосіб одержання анти-SNAP-25 антитіл, здатних вибірково зв'язуватися з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, можна одержати великою кількістю способів, добре відомих у даній галузі техніки. Конкретні протоколи для одержання й використання антитіл, а також для детектування й вимірювання специфічності зв'язування, афінності зв'язування й авідності зв'язування антитіл відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998a); *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. 1* (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2001; *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004; David Anderson et al., *Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use*, патент США 7034132 (25 квітня 2005 р.); i Beatriz M. Carreno et al., *Antibodies Against CTLA4*, патент США 7034121 (25 квітня 2006 р.).

[046] Як необмежуючий приклад можна навести поліклональні анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, які можуть бути одержані шляхом введення тваринам, таким як, наприклад, кролик, коза, миша або інші ссавці, однієї або декількох ін'єкцій композиції, що викликає імунну відповідь, описану в даній заявці. Як інший необмежуючий приклад можна навести поліклональні анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, які можуть бути одержані шляхом введення в яйце, таке як, наприклад, куряче яйце, однієї або декількох ін'єкцій композиції, що викликає імунну відповідь, описану в даній заявці. Титр антитіл у імунізованій тварини можна контролювати із часом стандартними методами, такими як твердофазний імуноферментний аналіз (твердофазний ІФА) з використанням іммобілізованого антигену або тест на активність у клітинах. За бажанням, як анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, можна використовувати поліклональні антитіла, які можна виділити із ссавців (наприклад, із крові) і далі очистити з використанням добре відомих методів, таких як афінна хроматографія за допомогою білка А для одержання фракції IgG, або з використанням афінного очищення за допомогою пептиду, використовуюваного для одержання антитіл.

[047] Як інший необмежуючий приклад можна навести моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, які можна одержати з використанням гібридомного способу. Див., наприклад, Chapter 6 *Monoclonal Antibodies*, pp. 196-244, Harlow & Lane, див. вище, 1998a; i Chapter 7 *Growing Hybridomas*, pp. 245-282, Harlow & Lane, див. вище, 1998a; i Goding, pp. 59-103, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986). Відповідно до цього способу, тварину-хазяїна, таку як, наприклад, миша, хом'як або іншу підходящу тварину-хазяїна, зазвичай піддають одній або декільком ін'єкціям антигену SNAP-25, описаного в даній заявці, для стимуляції утворення лімфоцитів, які виробляють або здатні виробляти анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Титр антитіл в імунізованій тварини можна контролювати із часом стандартними методами, такими як твердофазний імуноферментний аналіз (твердофазний ІФА) з використанням іммобілізованого антигену або тест на активність у клітинах. Як альтернатива, лімфоцити можна імунізувати *in vitro* з використанням підходящої лінії клітинної культури. У підходящий час після імунізації, наприклад, коли титр антитіл є найвищим, клітини, які виробляють антитіла, виділяють із тварини. У цілому, використовують або лімфоцити периферичної крові, якщо потрібні клітини людського походження, або клітини селезінки або

клітини лімфатичного вузла, якщо як джерела необхідні ссавці, відмінні від людини. Виділені клітини, які виробляють антитіла, поєднують з іморталізованою клітинною лінією, використовуючи підходящий агент, який стимулює злиття клітин, такий як поліетиленгліколь, з одержанням клітини гібридами. Іморталізовані клітинні лінії зазвичай являють собою трансформовані клітини ссавців, зокрема клітини мієломи гризунів, великої рогатої худоби й людини. Як правило, клітинну лінію мієломи миші поєднують зі спленоцитами, зібраними з відповідним чином імунізованої миші, для одержання гібридами. Переважні іморталізовані клітинні лінії являють собою клітинні лінії мієломи миші, які чутливі до культурального середовища, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (ГАТ). Кожну з великої кількості клітинних ліній мієломи можна використовувати як партнер для злиття відповідно стандартних методів, наприклад, лінії мієломи P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 або Sp2/O-Ag14. Клітини гібридами, що утворюються в результаті злиття, потім відбирають за допомогою середовища ГАТ, на якому гинуть клітини мієломи, які не пройшли злиття або пройшли непродуктивне злиття (спленоцити), що не пройшли злиття гинуть у культурі після декількох днів, оскільки вони не трансформовані). Культуральне середовище, в якому вирощують клітини гібридами, можна потім протестувати на присутність моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Наприклад, можна провести скринінг супернатантів гібридами з використанням α-SNAP-25-позитивних середовищ шляхом імунопреципітації, аналізу зв'язування *in vitro*, такого як, наприклад, радіоімунологічний аналіз (PIA) або твердофазний імуоферментний аналіз (твердофазний ІФА), або тесту на активність у клітинах. Подібні методи й тести відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Chapter 11 Immunoprecipitation, pp. 421-470, Harlow & Lane, див. вище, 1998a; Chapter 12 Immunoblotting, pp. 471-510, Harlow & Lane, див. вище, 1998a; Chapter 14 Immunoassays, pp. 553-612, Harlow & Lane, див. вище, 1998a. Потім можна провести додаткові дослідження, щоб визначити, чи відсутня у антитіл реактивність також стосовно SNAP-25, на карбоксильному кінці якого відсутній залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Можна також визначити афінність зв'язування моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, наприклад, за допомогою аналізу Скетчарда. Див., 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 шуканих клітин гібридами використовують метод граничних розведень для ізоляції клонів, що виходять з одної клітини, до одержання клональної клітинної лінії, що експресує необхідні моноклональні антитіла. Ці антитіла, які проявляють істотну вибірковість стосовно SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, і зв'язуються з досить високою авідністю, відбирають для подальшої характеристики й дослідження.

[048] Іншою альтернативою для одержання моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, є скринінг рекомбінантної комбінаторної бібліотеки імуноглобулінів, такої як, наприклад, бібліотека антитіл на основі фагового дисплею, за допомогою пептиду SNAP-25 й ідентифікація компонентів бібліотеки імуноглобулінів, які зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Набори для конструювання й скринінга бібліотек на основі фагового дисплею комерційно доступні, наприклад, Рекомбінантна Фагова Система Антитіл (Amersham GE Healthcare, Пискетей, Нью-Джерсі) і Набір для Фагового Дисплея SurfZAP™ (Stratagene, Ла-Хойя, Каліфорнія). Крім того, приклади способів і реагентів, що підходять для одержання й скринінга бібліотеки антитіл на основі дисплею, 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, зміст кожного з яких повністю включено в дану заявку за допомогою посилання.

[049] Частина аспектів даного опису включає збір зразка, що містить анти-SNAP-25 антитіла або клітини, які виробляють анти-SNAP-25 антитіла. У даній заявці термін "зразок, що містить анти-SNAP-25 антитіла або клітини, які виробляють анти-SNAP-25 антитіла", відноситься до будь-якого біологічного матеріалу, що містить або потенційно містить щонайменше одне антитіло α-SNAP-25, яке вибірково зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Припускається, що всі без винятку зразки, які можуть містити анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок

P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, можна використовувати в цьому способі, включаючи, без обмеження, кров, плазму, сироватку й лімфатичну рідину. Також припускається, що будь-яка клітина, здатна виробляти анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, можна використовувати в цьому способі, включаючи, без обмеження, клітини CD8, клітини ЦТЛ, Т-клітини-хелпери й В-клітини. Для одержання з особини зразка, що містить анти-SNAP-25 антитіла або клітини, які виробляють анти-SNAP-25 антитіла, можна використовувати велику кількість добре відомих способів, див., наприклад, Harlow & Lane, див. вище, 1998a; і Harlow & Lane, див. вище, 1998b. Подібним чином, велику кількість добре відомих способів можна використовувати для обробки зразка з метою виділення анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Процедура збору зразка можна вибрати виходячи з типу антитіл, які необхідно виділити. Як необмежувачий приклад, при виділенні поліклональних анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, зразок, що підходить, може являти собою зразок крові, що містить такі анти-SNAP-25 антитіла, тоді як при виділенні моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, зразок, що підходить, може являти собою клітину, яка виробляє анти-SNAP-25 антитіла, таку як клітина селезінки або гібридома.

[050] Частина аспектів даного опису включає виділення зі зразка анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Способи виділення таких анти-SNAP-25 антитіл, таких як, наприклад, поліклональні анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, або моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, добре відомі фахівцям у даній галузі техніки. Див., наприклад, Harlow and Lane, див. вище, 1998a; і Harlow and Lane, див. вище, 1998b. Наприклад, такі поліклональні анти-SNAP-25 антитіла можна виділити зі зразка за допомогою добре відомих методів, таких як, наприклад, афінна хроматографія з використанням білка А або білка G, який дозволяє виділити головним чином фракцію IgG імунної сироватки. Згодом, або як альтернатива, конкретний антиген SNAP-25 можна іммобілізувати на колонці або магнітних кульках для очищення поліклональних анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, за допомогою імуноафінної хроматографії. Моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, можна виділити з культурального середовища або асцитної рідини за допомогою звичайних процедур для очищення імуноглобулінів, таких як, наприклад, білок А-сефароза, хроматографія з гідроксилапатитом, гель-електрофорез, діаліз або афінна хроматографія.

[051] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, спосіб одержання анти-SNAP-25 антитіл, які здатні вибірково зв'язуватися з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, включає етапи (а) введення тварині композиції, яка викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, яка включає антиген SNAP-25, на С-кінці якого знаходиться карбоксильований залишок глутаміну, пов'язаний з пептидом-носієм; (б) добір у тваринного зразка, що містить анти-SNAP-25 антитіла або клітини, які виробляють анти-SNAP-25 антитіла; і (в) виділення компонентів анти-SNAP-25 антитіл зі зразка. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які здатні вибірково зв'язуватися з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, є поліклональними антитілами. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які здатні вибірково зв'язуватися з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, є моноклональними антитілами. Відповідно до подальшого аспекту даного варіанта реалізації, одержувані моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, які здатні вибірково зв'язуватися з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, відносяться до підтипу IgG. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, композиція, що викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, додатково містить ад'ювант, такий як, наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ), монометоксиполіетиленгліколь (мПЕГ) або полівінілалкоголь (ПВА).

[052] Відповідно до іншого варіанта реалізації, спосіб одержання анти-SNAP-25 антитіл, які здатні вибірково зв'язуватися з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, включає етапи (а) введення тварині композиції, що викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, яка включає пептид SNAP-25, на С-кінці якого знаходиться карбоксильований залишок глутаміну, пов'язаний із гнучким лінкером і пептидом-носієм, причому гнучкий лінкер поміщений між пептидом SNAP-25 і пептидом-носієм; (б) добір у тваринного зразка, що містить анти-SNAP-25 антитіла або клітини, які виробляють анти-SNAP-25 антитіла; і (в) виділення анти-SNAP-25 антитіл зі зразка. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які здатні вибірково зв'язуватися з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, є поліклональними антитілами. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які здатні вибірково зв'язуватися з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, є моноклональними антитілами. Відповідно до подальшого аспекту даного варіанта реалізації, одержувані моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, які здатні вибірково зв'язуватися з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, відносяться до підтипу IgG. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, композиція, що викликає імунну відповідь стосовно SNAP-25, додатково містить ад'ювант, такий як, наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ), монометоксиполіетиленгліколь (мПЕГ) або полівінілалкоголь (ПВА).

[053] Частина аспектів даного опису включає ізольовані анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. У даній заявці термін "антитіло" відноситься до молекули, що виробляється імунною системою, яка продукується у відповідь на певний антиген й яка специфічно зв'язується із цим антигеном, і охоплює як природні антитіла, так і антитіла, що не зустрічаються в природі. У даній заявці термін "ізольований" відноситься до виділення молекули з її природного оточення в результаті втручання людини. Наприклад, антитіло може бути поліклональним антитілом, моноклональним антитілом, димером, мультимером, мультиспецифічним антитілом, гуманізованим антитілом, химерним антитілом, біфункціональним антитілом, пов'язаним із клітиною антитілом, як ІГ рецептор, лінійним антитілом, діатілом або мініантитілом, якщо фрагмент демонструє бажану біологічну активність, та їхніми похідними, що складаються з одного ланцюга. Антитіло може являти собою повнорозмірну молекулу імуноглобуліну, включаючи домени V_H й V_L , а також константний домен легкого ланцюга (C_L) і константні домени важкого ланцюга, C_{H1} , C_{H2} й C_{H3} , або імунологічно активний фрагмент повнорозмірної молекули імуноглобуліну, такої як, наприклад, Fab-фрагмент, $F(ab')_2$ -фрагмент, Fc-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент. Антитіло може бути одержане від будь-яких видів хребетних (наприклад, людини, кози, коня, осла, миші, пацюка, кролика або курки) і може належати до будь-якого типу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD й IgA), класу (наприклад, IgA, IgD, IgE, IgG й IgM) або підкласу (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 й IgA2). Загальний опис структури природних антитіл, антитіл, що не зустрічаються в природі, та їхніх фрагментів, що зв'язують сполуки антигенів можна знайти, наприклад, в Pluckthun в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg й Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrabeck, Antibody Engineering, 2d ed. (Oxford University Press 1995), зміст кожного з яких повністю включено в дану заявку за допомогою посилання.

[054] Природні антитіла зазвичай являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни масою близько 150000 дальтон, які складаються з двох ідентичних легких (L) ланцюгів і двох ідентичних важких (H) ланцюгів. Кожен легкий ланцюг пов'язаний з важким ланцюгом одним ковалентним дисульфідним зв'язком, при цьому число дисульфідних зв'язків варіює для важких ланцюгів різних імуноглобулінових ізотипів. Кожен важкий і легкий ланцюг також містить розташовані з рівними інтервалами дисульфідні містки всередині ланцюга. На одному кінці кожного важкого ланцюга знаходиться варіабельний домен (V_H), за яким йде декілька константних доменів. У кожного легкого ланцюга на одному кінці знаходиться варіабельний домен (V_L), а на іншому кінці - константний домен. Константний домен легкого ланцюга розташований напроти першого константного домена важкого ланцюга, а варіабельний домен легкого ланцюга розташований навпроти варіабельного домена важкого ланцюга. Певні залишки амінокислот, як припускають, формують область контакту між варіабельними доменами легкого й важкого ланцюга.

[055] Повні антигенрозпізнавальна й антигензв'язуюча області містяться в межах варіабельних доменів антитіла, тобто Fv-фрагмента. Цей фрагмент включає димер одного варіабельного домена важкого ланцюга (V_H) і одного варіабельного домена легкого ланцюга

(V_L), які знаходяться у щільній нековалентній взаємодії. Кожен домен включає чотири каркасні області (FR), які в значній мірі приймають конфігурацію β-шарів, зв'язані трьома гіперваріабельними ділянками, які формують петлі, що з'єднують й у деяких випадках є частиною β-шарової структури. Кожна гіперваріабельна ділянка включає послідовність амінокислот, що відповідає ділянці, яка визначає компліментарність (CDR). У сукупності, ця тривимірна конфігурація шести CDR формує антигензв'язуючу ділянку на поверхні димера V_H-V_L, що визначає специфічність зв'язування антигену. Див., 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), кожен з яких повністю включений у дану заявку за допомогою посилання. Константні домени антитіл безпосередньо не беруть участь у зв'язуванні антитіла з антигеном, але демонструють різні ефекторні функції, такі як участь антитіла в антитілозалежній клітинно-опосередкованій цитотоксичності.

[056] Антиген-мішень зазвичай має одну або декілька ділянок зв'язування, також називаних епітопами, які розпізнаються антигензв'язуючими ділянками, утвореними CDR. У даній заявці термін "епітон" є синонімом терміна "антигенна детермінанта" і відноситься до ділянки антигену-мішені, такого як, наприклад, пептиду, полісахариду або ліпідвмісної молекули, здатного специфічно зв'язуватися з імуноглобуліном або рецептором Т-лімфоцитів або іншим способом взаємодіючи з молекулою. Антитіла, які специфічно зв'язуються з різними епітопами, мають різну структуру. Таким чином, одному антигену може відповідати більше одного антитіла.

[057] Термін "поліклональні антитіла" відноситься до гетерогенної популяції молекул антитіл, яка містить щонайменше два види антитіл, здатних зв'язуватися з конкретним антигеном. Згідно визначенню, поліклональні антитіла включають два різних антитіла, які зв'язуються щонайменше із двома різними епітопами. У даній заявці терміни "моноклональне антитіло" або "моноклональні антитіла" відносяться до по суті гомогенного ступеня популяції молекул антитіл, що містить тільки один вид антитіл, здатних зв'язуватися з конкретним антигеном, тобто індивідуальні антитіла, що становлять популяцію, є ідентичними, за винятком можливих природних мутацій, які можуть бути присутніми у малих кількостях. Згідно визначенню, моноклональні антитіла зв'язуються з єдиним епітопом. Моноклональні антитіла високоспецифічні й направлені проти однієї ділянки антигену. Більше того, на відміну від поліклональних антитіл, кожне моноклональне антитіло направлене проти єдиної антигенної детермінанти. Крім специфічності, перевагою моноклональних антитіл є можливість синтезувати їх під час відсутності забруднення іншими антитілами. Визначення "моноклональні" відображає особливість даних антитіл, яка полягає в тому, що вони одержані з гомогенної в значній мірі популяції антитіл, і не повинно мати на увазі як вимогу, щоб антитіла були одержані яким-небудь конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла для застосування відповідно до даної заявки можна одержати гібридомним способом, вперше описаним Kohler et al (1975) Nature 256:495, або за допомогою способу, оснований на використанні технології рекомбінантної ДНК (див., наприклад, патент США № 4816567; патент США № 5807715). Моноклональні антитіла також можна виділити з фагових бібліотек антитіл з використанням методів, описаних, наприклад, в Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597.

[058] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла включають варіабельний домен важкого ланцюга (V_H) і варіабельний домен легкого ланцюга (V_L), які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, варіабельний домен важкого ланцюга (V_H) являє собою SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82 або SEQ ID NO: 133. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, варіабельний домен легкого ланцюга (V_L) являє собою SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 або SEQ ID NO: 92.

[059] Відповідно до іншого варіанта реалізації, послідовність нуклеїнової кислоти кодує анти-SNAP-25 антитіла, що включають варіабельний домен важкого ланцюга (V_H) і варіабельний домен легкого ланцюга (V_L), які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, варіабельний домен важкого ланцюга (V_H) кодує послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81 або SEQ ID NO: 132. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, варіабельний домен важкого ланцюга (V_H) кодує послідовність нуклеїнової кислоти, яка щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на

97 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентична SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81 або SEQ ID NO: 132. Згідно ще одного аспекту даного варіанта реалізації, варіабельний домен легкого ланцюга (V_L) кодує SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 або SEQ ID NO: 91. Згідно ще одного

аспекту даного варіанта реалізації, варіабельний домен легкого ланцюга (V_L) кодує послідовність нуклеїнової кислоти, яка щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентична SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 або SEQ ID NO: 91.

[060] Відповідно до іншого варіанту реалізації, анти-SNAP-25 антитіла включають ділянки CDR1, CDR2 й CDR3 варіабельного домена важкого ланцюга (V_H) або будь-які їх комбінації, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, ділянка CDR1 варіабельного домена важкого ланцюга (V_H) являє собою 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. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, ділянка CDR2 варіабельного домена важкого ланцюга (V_H) являє собою 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. Згідно ще одного аспекту даного варіанта реалізації, ділянка CDR3 варіабельного домена важкого ланцюга (V_H) являє собою SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 134 або SEQ ID NO: 135.

[061] Відповідно до іншого варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла включають ділянки CDR1, CDR2 й CDR3 варіабельного домена легкого ланцюга (V_L) або будь-які їхні комбінації, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, ділянка CDR1 варіабельного домена легкого ланцюга (V_L) являє собою 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. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, ділянка CDR2 варіабельного домена легкого ланцюга (V_L) являє собою SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 або SEQ ID NO: 112. Згідно ще одного аспекту даного варіанта реалізації, ділянка CDR3 варіабельного домена легкого ланцюга (V_L) являє собою SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 або SEQ ID NO: 117.

[062] Згідно ще одного варіанту реалізації, анти-SNAP-25 антитіла специфічно зв'язуються з епітопом, що містить SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, епітоп включає SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 або SEQ ID NO: 37. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, епітоп включає 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.

[063] Як обговорювалося вище, послідовність, що оточує сайт розщеплення BoNT/A, присутній в SNAP-25, позначена 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' означає розрізаний зв'язок. Після розщеплення BoNT/A продукти розщеплення, що утворюються, містять фрагмент, що включає послідовність $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$, і фрагмент, що включає $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$. У даній заявці термін "анти-SNAP-25 антитіла, які специфічно зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A" відноситься до антитіл α -SNAP-25, які специфічно зв'язуються з будь-яким фрагментом продукту розщеплення SNAP-25, що містить послідовність $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$, але не з будь-яким фрагментом продукту розщеплення SNAP-25, що містить послідовність $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$, або будь-яким SNAP-25, у якого є присутнім в інтактному виді розрізаний зв'язок P_1-P_1' у сайті розщеплення BoNT/A. У даній заявці термін "анти-SNAP-25 антитіла197" відноситься до антитіл, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 , який відповідає глутаміну 197 з SEQ ID NO: 5. У даній заявці термін "анти-SNAP-25 антитіла204" відноситься до антитіл, які вибірково зв'язуються з SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 , який відповідає лізину 204 з SEQ ID NO: 16.

[064] У даній заявці термін "вибірково" відноситься до унікального ефекту або впливу або здатності реагувати тільки одним певним чином або тільки з одним певним партнером. У даній заявці термін "вибірково зв'язується" або "вибіркоче зв'язування" стосовно антитіл відноситься до селективного зв'язування антитіл із зазначеним епітопом-мішенню, такого, що антитіла істотно не проявляють перехресної реактивності стосовно епітопів, які не є мішенями.

Відповідно до даної заявки мінімальний розмір пептидного епітопа становить близько п'яти амінокислот, і пептидний епітоп, як правило, містить щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9, щонайменше 10, щонайменше 15 або щонайменше 20 амінокислот. Пептидний епітоп може бути переривчастим, тобто містити залишки амінокислот, які розташовані не поруч один з одним у первинній структурі пептиду, але об'єднані в епітоп за допомогою вторинної, третинної або четвертинної структури пептиду. Крім того, відзначають, що епітоп може включати частину молекули, яка не є послідовністю амінокислот, як, наприклад, вуглеводну групу, ліпідну групу, як у ліпопротеїнів або гліколіпідів, або хімічно модифіковану амінокислотну групу, наприклад, фосфорильовану амінокислоту.

Відповідно до деяких аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, здатні вибірково зв'язуватися з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, який включає щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9, щонайменше 10, щонайменше 15 або щонайменше 20 амінокислот. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, здатні вибірково зв'язуватися з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, який включає якнайбільше 5, якнайбільше 6, якнайбільше 7, якнайбільше 8, якнайбільше 9, якнайбільше 10, якнайбільше 15 або якнайбільше 20 амінокислот.

[065] Вибіркове зв'язування включає такі властивості зв'язування, як наприклад афінність зв'язування, специфічність зв'язування й авідність зв'язування. Див. David J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, pp. 240 (1998). Афінність зв'язування відноситься до тривалості знаходження антитіла в сайті зв'язування відповідного епітопа, і її можна розглядати як силу, з якою антитіло зв'язується зі своїм епітопом. Афінність зв'язування можна описати за допомогою рівноважної константи дисоціації антитіла (KD), яка визначається як співвідношення Kd/Ka у стані рівноваги, де Ka являє собою константу швидкості асоціації антитіла, а Kd - константу швидкості дисоціації антитіла. Афінність зв'язування визначається як асоціацією, так і дисоціацією, і окремо ні високий ступінь асоціації, ні низький ступінь дисоціації не може гарантувати високу афінність. Константа швидкості асоціації (Ka), або константа швидкості прямої реакції (Kon), є мірою числа подій зв'язування за одиницю часу або схильності антитіла й антигену піддаватися оборотній асоціації з утворенням комплексу антитіло-антиген. Константа швидкості асоціації виражається в $M^{-1}s^{-1}$ і позначається таким чином: $[Ab]x[Ag]xKon$. Чим більше константа швидкості асоціації, тим швидше антитіло зв'язується з антигеном або тим вище афінність зв'язування між антитілом й антигеном. Константа швидкості дисоціації (Kd), або константа швидкості зворотної реакції ($Koff$), є мірою числа подій дисоціації за одиницю часу або схильності комплексу антитіло-антиген оборотно розділятися (дисоціювати) на молекулярні компоненти, а саме антитіло й антиген. Константа швидкості дисоціації виражається в s^{-1} і позначається таким чином: $[Ab+Ag]xKoff$. Чим менше константа швидкості дисоціації, тим більш міцно антитіло пов'язане з антигеном або тим вище афінність зв'язування між антитілом й антигеном. Рівноважна константа дисоціації (KD) є мірою швидкості, з якої утворюються нові комплекси антитіло-антиген, й дорівнює швидкості, з якою комплекси антитіло-антиген піддаються дисоціації, у рівноважному стані. Рівноважна константа дисоціації виражається в M і визначається як $Koff/Kon=[Ab]x[Ag]/[Ab+Ag]$, де $[Ab]$ відповідає молярній концентрації антитіла, $[Ag]$ відповідає молярній концентрації антигену, а $[Ab+Ag]$ відповідає молярній концентрації комплексу антитіло-антиген, при цьому всі концентрації відповідають рівноважному стану. Чим менше рівноважна константа дисоціації, тим більш міцно антитіло зв'язане з антигеном або тим вище афінність зв'язування між антитілом й антигеном.

[066] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися константою швидкості асоціації, що становить, наприклад, менше $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, менше $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, менше $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ або менше $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. Відповідно до іншого варіанта реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися константою швидкості асоціації, що становить, наприклад, більше $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, більше $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, більше $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ або більше $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. Відповідно до інших аспектів, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які

вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися константою швидкості асоціації, що знаходиться в діапазоні від $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, від $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, від $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ або від $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

5 [067] Відповідно до іншого варіанта реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися константою швидкості дисоціації, що становить менше $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, менше $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ або менше $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися константою швидкості дисоціації, що становить, наприклад, менше $1,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше $2,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше $3,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше $4,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше $5,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше $6,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше $7,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менше $8,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ або менше $9,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$. Відповідно до іншого варіанта реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися константою швидкості дисоціації, що становить, наприклад, більше $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, більше $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ або більше $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися константою швидкості дисоціації, що становить, наприклад, більше $1,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більше $2,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більше $3,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більше $4,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більше $5,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більше $6,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більше $7,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, більше $8,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ або більше $9,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$.

25 [068] Відповідно до іншого варіанта реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися рівноважною константою дисоціації, що становить менше 0,500 нМ. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися рівноважною константою дисоціації, що становить, наприклад, менше 0,500 нМ, менше 0,450 нМ, менше 0,400 нМ, менше 0,350 нМ, менше 0,300 нМ, менше 0,250 нМ, менше 0,200 нМ, менше 0,150 нМ, менше 0,100 нМ або менше 0,050 нМ. Відповідно до іншого варіанта реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися рівноважною константою дисоціації, що становить більше 0,500 нМ. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися рівноважною константою дисоціації, що становить, наприклад, більше 0,500 нМ, більше 0,450 нМ, більше 0,400 нМ, більше 0,350 нМ, більше 0,300 нМ, більше 0,250 нМ, більше 0,200 нМ, більше 0,150 нМ, більше 0,100 нМ або більше 0,050 нМ.

45 [069] Згідно ще одного варіанту реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися константою швидкості асоціації для інтактного SNAP-25, що становить, наприклад, менше $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менше $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менше $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менше $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ або менше $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Відповідно до іншого варіанта реалізації, афінність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, може характеризуватися константою швидкості асоціації для інтактного SNAP-25, що становить, наприклад, не більше $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, не більше $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, не більше $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, не більше $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ або не більше $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

55 [070] Специфічність зв'язування являє собою здатність антитіл відрізняти молекули, які містять епітоп даного антитіла, від молекул, які не містять цей епітоп. Одним зі способів вимірювання специфічності зв'язування є порівняння швидкості асоціації антитіла K_{on} для молекули, що містить епітоп даного антитіла, зі швидкістю асоціації антитіла K_{on} для молекули, що не містить цей епітоп. Наприклад, порівняння константи швидкості асоціації (K_a) анти-SNAP-25 антитіл для епітопа SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1

розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, з SNAP-25, що не містить цей епітоп, таким як, наприклад, епітоп SNAP-25, на карбоксильному кінці якого відсутній залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, або епітоп SNAP-25, що містить інтактний розрізуваний зв'язок P₁–P₁' у сайті розщеплення BoNT/A. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, характеризуються константою швидкості асоціації (K_a) для SNAP-25, який не містить відповідний епітоп(и), що становить, наприклад, менше $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, менше $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, менше $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, менше $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ або менше $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, характеризуються константою швидкості асоціації (K_a) для SNAP-25, який не містить відповідний епітоп(и), що становить, наприклад, не більше $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, не більше $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, не більше $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, не більше $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ або не більше $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[071] Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, характеризуються константою швидкості асоціації (K_a) для відповідного їм епітопа, яка, наприклад, щонайменше в 2 рази, щонайменше в 3 рази, щонайменше в 4 рази, щонайменше в 5 раз, щонайменше в 6 раз, щонайменше в 7 раз, щонайменше в 8 раз або щонайменше в 9 раз більша в порівнянні зі значенням для SNAP-25, який не містить цей епітоп. Відповідно до подальших аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, характеризуються константою швидкості асоціації (K_a) для відповідного їм епітопа, яка, наприклад, щонайменше в 10 раз, щонайменше в 100 раз, щонайменше в 1000 раз або щонайменше в 10000 раз більше у порівнянні зі значенням для SNAP-25, який не містить цей епітоп. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, характеризуються константою швидкості асоціації (K_a) для відповідного їм епітопа, яка, наприклад, не більше ніж однократно, не більше ніж в 2 рази, не більше ніж в 3 рази, не більше ніж в 4 рази, не більше ніж в 5 разів, не більше ніж в 6 разів, не більше ніж в 7 разів, не більше ніж в 8 разів або не більше ніж в 9 разів перевищує значення для SNAP-25, який не містить цей епітоп. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, характеризуються константою швидкості асоціації (K_a) для відповідного їм епітопа, яка, наприклад, не більше ніж в 10 раз, не більше ніж в 100 раз, не більше ніж в 1000 раз або не більше ніж в 10000 раз перевищує значення для SNAP-25, який не містить цей епітоп.

[072] Специфічність зв'язування анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, можна також охарактеризувати як співвідношення, з яким дані анти-SNAP-25 антитіла здатні відрізняти відповідний їм епітоп SNAP-25 від SNAP-25, який не містить цей епітоп, таких як, наприклад, епітоп SNAP-25, на карбоксильному кінці якого відсутній залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, або епітоп SNAP-25, який містить інтактний розрізуваний зв'язок P₁–P₁' у сайті розщеплення BoNT/A. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, характеризуються співвідношенням специфічності зв'язування відповідного епітопа SNAP-25 у порівнянні зі зв'язуванням SNAP-25, який не містить цей епітоп, що становить, 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. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, характеризуються співвідношенням специфічності зв'язування відповідного епітопа SNAP-25 у порівнянні зі зв'язуванням SNAP-25, на карбоксильному кінці якого відсутній залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, що становить, 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. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, характеризуються співвідношенням специфічності зв'язування відповідного епітопа SNAP-25 у порівнянні зі зв'язуванням SNAP-25, який містить інтактний розрізаний зв'язок P1-P1" у сайті розщеплення BoNT/A, що становить, 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.

[073] Авідність зв'язування, також відома як функціональна афінність, відноситься до сумарної загальної сили функціонального зв'язування антигену мультивалентним антитілом. Молекули антитіла можуть мати більше однієї ділянки зв'язування (наприклад, 2 у випадку IgG, 10 у випадку IgM), і багато антигенів містять більше однієї антигенної ділянки. У той час як авідність антитіла залежить від афінностей зв'язування індивідуальних ділянок зв'язування антитіла, авідність зв'язування перевищує афінність зв'язування, тому що для повної дисоціації антитіла від антигену необхідний одночасний розрив всіх взаємодій антитіло-антиген. Припускається, що анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, здатні вибірково зв'язуватися всіма без винятку епітопами, які відповідають даним антитілам.

[074] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла являють собою анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла являють собою анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться глутамін, або анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться лізин. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла являють собою анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁, що відповідає глутаміну 197 з SEQ ID NO: 5, або анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁, що відповідає лізину 204 з SEQ ID NO: 16. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, анти-SNAP-25 антитіла являють собою анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться послідовність амінокислот з 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: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 або SEQ ID NO: 46.

[075] Частина аспектів даного опису включає імунологічний спосіб детектування ендопептидаз зі зміненою націленістю. Імунологічні способи, описані в даній заявці, можна оцінювати за допомогою декількох параметрів, включаючи, наприклад, погрішність, розкид результатів, межу детектування (МД), межі кількісного вимірювання (МКВ), діапазон, специфічність, вибірковість, лінійність, надійність і придатність системи. Погрішність способу є мірою точності аналітичного методу або близькості відповідності між обмірюваним значенням і значенням, що прийняте як дійсне значення або опорне значення. Розкид результатів способу являє собою ступінь відповідності між результатами індивідуальних тестів, повторно проведених на багаторазових пробах, взятих з гомогенного зразка. У зв'язку із цим, розсіювання результатів є оцінкою 1) мінливості в межах одного тесту; 2) мінливості в межах одного дня (повторюваності); і 3) мінливості між різними днями (внутрілабораторної погрішності); і 4) міжлабораторної мінливості (відтворюваності). Коефіцієнт варіації (CV%) є кількісним показником розкиду результатів, вираженим стосовно спостережуваного або теоретичного середнього значення.

[076] Імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, повинен бути здатним детектувати присутність комплексу антитіло α -SNAP-25-антиген, що включає SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, з урахуванням фону. Межа детектування (МД) способу відноситься до концентрації аналізованої речовини, яка викликає появу сигналу, що значно відрізняється від негативного контролю або холостої проби й відповідної найменшої концентрації аналізованої речовини, яку можна відрізнити від фону.

[077] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, здатний детектувати МД ендопептидази зі зміненою націленістю в кількості, що значно відрізняється від негативного контролю або холостої проби. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МД, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МД, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до подальших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МД, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МД, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МД, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю.

[078] Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МД, наприклад, 100 нМ або менше, 90 нМ або менше, 80 нМ або менше, 70 нМ або менше, 60 нМ або менше, 50 нМ або менше, 40 нМ або менше, 30 нМ або менше, 20 нМ або менше, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МД, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МД, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МД, наприклад, 10 пМ або менше ендопептидази зі зміненою націленістю, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю.

[079] Межі кількісного вимірювання (МКВ) являють собою найменші й найбільші концентрації аналізованої речовини в зразку або препараті, які можна виміряти із припустимим рівнем погрішності й розкиду результатів. Нижня межа кількісного вимірювання відноситься до найменшої дози, яку метод детектування здатний одномоментно вимірювати на рівні фону. Верхня межа кількісного вимірювання являє собою найбільшу дозу, яку метод детектування здатний одномоментно вимірювати до настання насичення сигналу. Лінійний діапазон способу являє собою область між нижньою й верхньою межею кількісного вимірювання. Лінійний діапазон обчислюють шляхом вирахування нижньої межі кількісного вимірювання з верхньої межі кількісного вимірювання. У даній заявці термін "співвідношення сигналу до шуму для нижньої асимптоти" відноситься до сигналу, що детектується даним способом на нижній межі детектування, поділеному на фоновий сигнал. У даній заявці термін "співвідношення сигналу до шуму для верхньої асимптоти" відноситься до сигналу, що детектується даним способом на верхній межі детектування, поділеному на фоновий сигнал.

[080] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, здатний детектувати МКВ ендопептидази зі зміненою націленістю в кількості, яка значно відрізняється від негативного контролю або холостої проби. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МКВ, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МКВ, 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

5 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до подальших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МКВ, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб,

10 описаний у даній заявці, характеризується МКВ, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МКВ,

15 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 ендопептидази зі зміненою націленістю.

[081] Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МКВ, наприклад, 100 нМ або менше, 90 нМ або менше, 80 нМ або менше, 70 нМ або менше, 60 нМ або менше, 50 нМ або менше, 40 нМ або менше, 30 нМ або менше, 20 нМ або менше, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МКВ, наприклад, 900 пМ або менше, 800 пМ або менше, 700 пМ або менше,

20 600 пМ або менше, 500 пМ або менше, 400 пМ або менше, 300 пМ або менше, 200 пМ або менше або 100 пМ або менше ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МКВ, 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

25 або менше або 10 пМ або менше ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується МКВ, наприклад, 10 пМ або менше ендопептидази зі зміненою націленістю, 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 ендопептидази зі зміненою націленістю.

30

35

[082] В імунологічному тесті, що підходить для застосування в практичному аспекті описаних способів, повинен спостерігатися розкид результатів, що не перевищує 50 %. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, в імунологічному тесті спостерігається розкид результатів, що не перевищує 50 %, що не перевищує 40 %, що не перевищує 30 % або що не перевищує

40 20 %. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, в імунологічному тесті спостерігається розкид результатів, що не перевищує 15 %, що не перевищує 10 % або що не перевищує 5 %. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, в імунологічному тесті спостерігається розкид результатів, що не перевищує 4 %, що не перевищує 3 %, що не перевищує 2 % або що не перевищує 1 %.

[083] Імунологічний тест, що підходить для застосування в здійсненні описаних способів, повинен мати точність щонайменше 50 %. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний тест має точність щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 % або щонайменше 80 %. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний тест має точність щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або щонайменше 95 %. Відповідно до інших

45 аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний тест має точність щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 %.

50

[084] Імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, повинен характеризуватися статистично значимим співвідношенням сигналу до шуму для нижньої асимптоти й статистично значимим співвідношенням сигналу до шуму для верхньої асимптоти. Відповідно до аспектів даного

55 варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, характеризується співвідношенням сигналу до шуму для нижньої асимптоти, що становить, наприклад, 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 або щонайменше 20:1. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, імунологічний спосіб характеризується

60 співвідношенням сигналу до шуму для верхньої асимптоти, що становить, 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.

[085] Специфічність способу визначає здатність способу вимірювати аналізовану речовину, яка являє собою інтерес, за винятком інших супутніх компонентів, таких як, наприклад, частково активна або неактивна аналізована речовина. Селективність способу описує здатність аналітичного методу розрізняти різні речовини в зразку. Лінійність способу відповідає його здатності давати результати, які прямо, або за допомогою однозначно визначеного математичного перетворення, пропорційні концентрації аналізованої речовини в зразку. Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, імунологічний спосіб, описаний у даній заявці, здатний відрізнити повністю активну ендопептидазу зі зміненою націленістю від частково активної ендопептидази зі зміненою націленістю, 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 активної ендопептидази зі зміненою націленістю.

[086] Надійність способу являє собою відтворюваність результатів тесту, одержаних для ідентичних зразків при нормальних (але змінюваних) умовах тесту. Стійкість процедури є мірою її здатності залишатися несприйнятливою стосовно невеликих, але навмисних змін параметрів способу і являє собою показник його надійності при нормальному використанні. Таким чином, у той час як надійність оцінює неминучі зміни, стійкість оцінює навмисні зміни. Типові параметри, оцінювані за допомогою показників надійності й стійкості, включають ефекти заморожування/відтавання, часу інкубації, температури інкубації, довговічності реагенту, приготування зразка, зберігання зразка, числа клітинних пасажів, партії ендопептидази зі зміненою націленістю, мінливості між очищеннями й мінливості між реакціями розщеплення. Параметри стійкості для клітинних тестів включають банк клітин (початок, середина й кінець заморожування), рівень клітинного пасажу, щільність висіву клітин, щільність маткового розчину клітин (кількість днів у культурі), вік клітин у флаконі (час очікування до висіву), час інкубації, розходження між планшетами, надмірні кількості сироватки й джерело реагентів. Придатність системи даного способу визначає експлуатаційні якості тесту в часі, включаючи експлуатаційні якості реагентів й інструментів, шляхом аналізу еталонного стандарту або еталонної молекули. Придатність системи в керівництві FDA виділена в тому відношенні, що устаткування, електроніка, експлуатаційні якості тесту й зразки для аналізу становлять єдину систему. Придатність системи можна оцінити шляхом аналізу на паралелізм, який полягає в тому, що при побудові графіка залежності відповіді від логарифма дози кривих графіків серійних розведень еталона й серійних розведень зразків повинні бути паралельними.

[087] Частина аспектів даного опису відноситься до клітини зі стабільної клітинної лінії. У даній заявці термін "клітина" відноситься до будь-якої еукаріотичної клітини, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, або будь-якої еукаріотичної клітини, яка здатна поглинати ендопептидази зі зміненою націленістю. Термін "клітина" охоплює клітини з великої кількості організмів, такі як, наприклад, клітини мишей, пацюків, свиней, великої рогатої худоби, коней, приматів і людину; з великої кількості типів клітин, таких як, наприклад, нервові й такі, що не відносяться до нервових; і клітини, які можуть бути ізольовані з гетерогенної популяції клітин, тканини або організму (цілого або їх частини). У даній заявці термін "стабільна клітинна лінія" є синонімом термінів "іморталізована клітинна лінія" або "трансформована клітинна лінія" і відноситься до культури клітин, відібраних для необмеженого розділення з популяції клітин, одержаної з організму, тканини або органа-джерела. Згідно визначенню, стабільна клітинна лінія не включає клітинну культуру первинних клітин. У даній заявці термін "первинні клітини" включає клітини, зібрані безпосередньо зі свіжих тканин або органів і такі, що не мають потенціалу необмеженого розділення. Стабільна клітинна лінія може включати гетерогенну популяцію клітин або однорідну популяцію клітин. Стабільна клітинна лінія, одержана з єдиної клітини, називається клональною клітинною лінією. Стабільна клітинна лінія може являти собою лінію клітин, які ендегенно експресують всі компоненти, необхідні для функціонування всього клітинного механізму, за допомогою якого ендопептидаза зі зміненою націленістю протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25 і який включає зв'язування ендопептидази зі зміненою націленістю з відповідним рецептором, інтерналізацію комплексу ендопептидаза/рецептор, транслокацію легкого ланцюга ендопептидази зі зміненою націленістю із внутрішньоклітинного пухирця в цитоплазму й протеолітичне розщеплення SNAP-25. Як альтернатива, стабільна клітинна лінія може являти собою лінію клітин, у які із зовнішнього

джерела був введений щонайменше один із компонентів, необхідний для повного функціонування клітинного механізму, за допомогою якого ендопептидаза зі зміненою націленістю протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25 і який включає зв'язування ендопептидази зі зміненою націленістю з відповідним рецептором, інтерналізацію комплексу ендопептидаза/рецептор, транслокацію легкого ланцюга ендопептидази зі зміненою націленістю із внутрішньоклітинного пухирця в цитоплазму й протеолітичне розщеплення SNAP-25. Клітини такої стабільної клітинної лінії, також названої генетично модифікованою клітинною лінією, можуть, наприклад, експресувати екзогенну ендопептидазу зі зміненою націленістю, таку як, наприклад, екзогенний ORL1, екзогенний DOR, екзогенний KOR, екзогенний MOR, екзогенний рецептор Галаніну 1, екзогенний рецептор Галаніну 2, екзогенний рецептор Галаніну 3 або будь-яку їх комбінацію.

[088] Частина аспектів даної заявки включає клітину зі стабільної клональної клітинної лінії, чутливу до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю. У даній заявці термін "клітина(и)", чутливі до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю", "клітина(и), чутливі до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю за допомогою ендопептидаз зі зміненою націленістю" або "клітина(и) зі стабільної клональної клітинної лінії, чутливі до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю" відносяться до клітин(и), у яких може повністю функціонувати клітинний механізм, за допомогою якого ендопептидаза зі зміненою націленістю протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25, що призводить до інгібування екзоцитозу, і який включає зв'язування ендопептидази зі зміненою націленістю з відповідним рецептором, інтерналізацію комплексу ендопептидаза/рецептор, транслокацію ланцюга ендопептидази зі зміненою націленістю, що забезпечує її активність, із внутрішньоклітинного пухирця в цитоплазму й протеолітичне розщеплення SNAP-25. Згідно визначенню, клітина(и), чутлива(і) до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, повинна(і) експресувати, або бути сконструйована(ими) із забезпеченням експресії, щонайменше один рецептор ендопептидази зі зміненою націленістю й щонайменше один субстрат SNAP-25. У даній заявці терміни "клітина(и)", здатна поглинати ендопептидази зі зміненою націленістю" або "клітина(и), що включає стабільну клональну клітинну лінію, яка може поглинати ендопептидази зі зміненою націленістю" відносяться до клітин, у яких може повністю функціонувати клітинний механізм, за допомогою якого ендопептидаза зі зміненою націленістю протеолітично розщеплює субстрат SNAP-25, тим самим інгібуючи екзоцитоз, і який включає зв'язування ендопептидази зі зміненою націленістю з відповідним рецептором, інтерналізацію комплексу ендопептидаза/рецептор, транслокацію легкого ланцюга ендопептидази зі зміненою націленістю із внутрішньоклітинного пухирця в цитоплазму й протеолітичне розщеплення SNAP-25. Згідно визначенню, клітина(и), здатна поглинати ендопептидази зі зміненою націленістю, повинна експресувати, або бути сконструйована із забезпеченням експресії, щонайменше один рецептор ендопептидази зі зміненою націленістю й щонайменше один субстрат SNAP-25.

[089] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії чутливі до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю. Відповідно до деяких аспектів цього варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії чутливі до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю при концентрації ендопептидази зі зміненою націленістю, наприклад, близько 100 нМ або нижче, близько 90 нМ або нижче, близько 80 нМ або нижче, близько 70 нМ або нижче, близько 60 нМ або нижче, близько 50 нМ або нижче, близько 40 нМ або нижче, близько 30 нМ або нижче, близько 20 нМ або нижче або близько 10 нМ або нижче. Відповідно до інших аспектів, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії чутливі до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю при концентрації ендопептидази зі зміненою націленістю, наприклад, близько 9 нМ або нижче, близько 8 нМ або нижче, близько 7 нМ або нижче, близько 6 нМ або нижче, близько 5 нМ або нижче, близько 4 нМ або нижче, близько 3 нМ або нижче, близько 2 нМ або нижче або близько 1 нМ або нижче. Згідно інших аспектів, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії чутливі до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю при концентрації ендопептидази зі зміненою націленістю, наприклад, близько 0,9 нМ або нижче, близько 0,8 нМ або нижче, близько 0,7 нМ або нижче, близько 0,6 нМ або нижче, близько 0,5 нМ або нижче, близько 0,4 нМ або нижче, близько 0,3 нМ або нижче, близько 0,2 нМ або близько 0,1 нМ або нижче. У даній заявці термін "близько" або "приблизно" при кількісній характеристиці згадуваного об'єкта, числа, відсотка або терміна відноситься до діапазону плюс або мінус десять відсотків зазначеного значення кількісної характеристики цього об'єкта, відсотка, параметра або терміна.

[090] Відповідно до іншого варіанта реалізації, клітини, що включають стабільну клональну клітинну лінію, здатні поглинати ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до аспектів

цього варіанта реалізації, клітини, що включають стабільну клональну клітинну лінію, здатні поглинати, наприклад, близько 100 нМ або менше, близько 90 нМ або менше, близько 80 нМ або менше, близько 70 нМ або менше, близько 60 нМ або менше, близько 50 нМ або менше, близько 40 нМ або менше, близько 30 нМ або менше, близько 20 нМ або менше, близько 10 нМ або менше ендopeптидази з зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів, клітини, що включають стабільну клональну клітинну лінію, мають здатність поглинати близько 9 нМ або менше, близько 8 нМ або менше, близько 7 нМ або менше, близько 6 нМ або менше, близько 5 нМ або менше, близько 4 нМ або менше, близько 3 нМ або менше, близько 2 нМ або менше або близько 1 нМ або менше ендopeптидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів, клітини, що включають стабільну клональну клітинну лінію, мають здатність поглинати близько 0,9 нМ або менше, близько 0,8 нМ або менше, близько 0,7 нМ або менше, близько 0,6 нМ або менше, близько 0,5 нМ або менше, близько 0,4 нМ або менше, близько 0,3 нМ або менше, близько 0,2 нМ або менше або близько 0,1 нМ або менше ендopeптидази зі зміненою націленістю.

[091] Частина аспектів даного опису відноситься до клітин зі стабільної клітинної лінії, що демонструє вибіркове зв'язування ендopeптидаз зі зміненою націленістю, описаних у даній заявці. У даній заявці термін "вибіркovo зв'язується" або "вибіркovo зв'язування" стосовно ендopeптидаз зі зміненою націленістю відноситься до виняткового зв'язування ендopeптидази зі зміненою націленістю із зазначеним рецептором-мішенню, такого, що ендopeптидаза зі зміненою націленістю істотно не зв'язується з рецепторами, які не є мішенями. Ступінь, з якого клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють вибіркovo зв'язування ендopeптидаз зі зміненою націленістю, можна виміряти за допомогою ступеня, з якого ці клітини демонструють невибіркovo поглинання молекул, у яких відсутній націлюючий домен ендopeптидаз зі зміненою націленістю. Одним зі способів оцінки невибіркового поглинання молекул, у яких відсутній націлюючий домен ендopeптидаз зі зміненою націленістю, є вимірювання невибіркового поглинання фрагмента LHN. Фрагмент LHN містить транслокаційний домен токсину клостридій і ферментативний домен токсину клостридій, але не містить якого-небудь націлюючого домена. Необмежуючі приклади фрагментів LHN включають фрагмент LHN/A, фрагмент LHN/B, фрагмент LHN/C, фрагмент LHN/D, фрагмент LHN/E, фрагмент LHN/F і фрагмент LHN/G. Прикладом фрагмента LHN/A є SEQ ID NO: 146, який кодується молекулою полінуклеотида SEQ ID NO: 147.

[092] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють вибіркovo зв'язування ендopeптидаз зі зміненою націленістю. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють вибіркovo зв'язування ендopeптидази зі зміненою націленістю, що відповідає, наприклад, щонайменше 75 % загальної активності, виявленої в тесті, щонайменше 80 % загальної активності, виявленої в тесті, щонайменше 85 % загальної активності, виявленої в тесті, щонайменше 90 % загальної активності, виявленої в тесті, або щонайменше 95 % загальної активності, виявленої в тесті. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють вибіркovo зв'язування ендopeптидази зі зміненою націленістю, що відповідає, наприклад, приблизно від 75 % до 100 % загальної активності, виявленої в тесті, приблизно від 80 % до 100 % загальної активності, виявленої в тесті, приблизно від 85 % до 100 % загальної активності, виявленої в тесті, приблизно від 90 % до 100 % загальної активності, виявленої в тесті.

[093] Відповідно до іншого варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють мінімальне невибіркovo поглинання фрагмента LHN. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють невибіркovo поглинання фрагмента LHN, що становить, наприклад, не більше 25 % загального поглинання, виявленого в тесті, не більше 20 % загального поглинання, виявленого в тесті, не більше 15 % загального поглинання, виявленого в тесті, не більше 10 % загального поглинання, виявленого в тесті, або не більше 5 % загального поглинання, виявленого в тесті. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють невибіркovo поглинання фрагмента LHN, що становить, наприклад, приблизно від 0 % до 25 % загального поглинання, виявленого в тесті, приблизно від 0 % до 20 % загального поглинання, виявленого в тесті, приблизно від 0 % до 15 % загального поглинання, виявленого в тесті, або приблизно від 0 % до 5 % загального поглинання, виявленого в тесті.

[094] Згідно ще одного варіанту реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють мінімальне невибіркovo поглинання фрагмента LHN/A. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють невибіркovo поглинання фрагмента

LHN/A, що становить, наприклад, не більше 25 % загального поглинання, виявленого в тесті, не більше 20 % загального поглинання, виявленого в тесті, не більше 15 % загального поглинання, виявленого в тесті, не більше 10 % загального поглинання, виявленого в тесті, або не більше 5 % загального поглинання, виявленого в тесті. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють невибіркове поглинання фрагмента LHN/A, що становить, наприклад, приблизно від 0 % до 25 % загального поглинання, виявленого в тесті, приблизно від 0 % до 20 % загального поглинання, виявленого в тесті, приблизно від 0 % до 15 % загального поглинання, виявленого в тесті, приблизно від 0 % до 10 % загального поглинання, виявленого в тесті, або приблизно від 0 % до 5 % загального поглинання, виявленого в тесті.

[095] Частина аспектів даного опису відноситься до клітин зі стабільної клітинної лінії, що експонує достатнє число рецепторних ділянок зв'язування на плазматичній мембрані, що забезпечує чутливе й вибіркове зв'язування ендопептидаз зі зміненою націленістю. У тесті зв'язування з рівноважним насиченням вимірюють повне й неспецифічне зв'язування ліганду при різних концентраціях. Рівноважна константа дисоціації (K_d) ліганду й максимальне число рецепторних ділянок зв'язування, B_{max} , можна обчислити на основі даних згідно специфічного зв'язування з використанням нелінійного регресійного аналізу. Специфічне зв'язування обчислюють шляхом вирахування неспецифічного зв'язування ліганду зі спостережуваного загального зв'язування. K_d являє собою концентрацію ліганду, необхідну для досягнення половини максимального значення зв'язування, і вимірюється в одиницях молярної концентрації. B_{max} являє собою максимальне число ділянок зв'язування, що є присутнім на плазматичній мембрані, і вимірюється в одиницях пмоль/мг, пмоль/клітина, фмоль/клітина або сайти/клітина.

[096] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії експонують достатнє число рецепторних сайтів зв'язування на плазматичній мембрані, що забезпечує чутливе й вибіркове зв'язування ендопептидаз зі зміненою націленістю. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють значення B_{max} , що становить, наприклад, щонайменше 0,1 фмоль/клітину, щонайменше 0,2 фмоль/клітину, щонайменше 0,3 фмоль/клітину, щонайменше 0,4 фмоль/клітину, щонайменше 0,5 фмоль/клітину, щонайменше 0,6 фмоль/клітину, по меншій мері 0,7 фмоль/клітину, щонайменше 0,8 фмоль/клітину, щонайменше 0,9 фмоль/клітину або щонайменше 1,0 фмоль/клітину для напрямку ліганду ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії демонструють значення B_{max} , що становить, наприклад, щонайменше 1 фмоль/клітину, щонайменше 2 фмоль/клітину, щонайменше 3 фмоль/клітину, щонайменше 4 фмоль/клітину, щонайменше 5 фмоль/клітину, щонайменше 6 фмоль/клітину, щонайменше 7 фмоль/клітину, щонайменше 8 фмоль/клітину, щонайменше 9 фмоль/клітину або щонайменше 10 фмоль/клітину для напрямку ліганду ендопептидази зі зміненою націленістю.

[097] Частина аспектів даного опису включає клітини зі стабільної клональної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, які більш стабільні, ніж клітини з батьківської клітинної лінії, з якої була одержана клональна клітинна лінія. У даній заявці термін "стабільний" відноситься до клітин зі стабільної клональної клітинної лінії, які після певної кількості пасажів демонструють відносно EC_{50} , чутливість, ефективність, чітко виражену верхню асимптоту та/або чітко виражену криву доза-ефект активності ендопептидази зі зміненою націленістю, подібні зі значеннями стосовної EC_{50} , чутливості, ефективності, чітко вираженої верхньої асимптоти та/або чітко виражених кривої доза-ефект, що демонструються клітинами з батьківської клітинної лінії, з якої була одержана клональна клітинна лінія, після рівної або близької кількості пасажів, причому в обох тестах використовуються ідентичні умови й ідентичні ендопептидази зі зміненою націленістю.

[098] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії більш стабільні, ніж клітини з батьківської клітинної лінії, з якої була одержана клональна клітинна лінія. Відповідно до одного аспекту цього варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії більш стабільні, ніж батьківська клітинна лінія SK-N-DZ. Відповідно до інших аспектів цього варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії більш стабільні ніж батьківська клітинна лінія SK-N-DZ ATCC CRL-2149. Відповідно до інших аспектів цього варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії більш стабільні протягом, наприклад, щонайменше ще 5 пасажів, щонайменше ще 10 пасажів, щонайменше ще 15 пасажів, щонайменше ще 20 пасажів, щонайменше ще 25 пасажів або щонайменше ще 30 пасажів у порівнянні із клітинами з батьківської клітинної лінії, з якої була одержана клональна клітинна лінія.

[0099] Частина аспектів даного опису включає клітини зі стабільної клональної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, які стабільні протягом великої кількості клітинних пасажів. У даній заявці термін "стабільний" відноситься до клітин зі стабільної клональної клітинної лінії, які після певної кількості пасажів демонструють відносну

5 ЕС₅₀, чутливість, ефективність, чітко виражену верхню асимптоту та/або чітко виражену криву доза-ефект активності ендопептидази зі зміненою націленістю, подібні значенням відносної ЕС₅₀, чутливості, ефективності, чітко вираженої верхньої асимптоти та/або чітко вираженої кривої доза-ефект, що демонструється клітинами з тієї ж самої стабільної клональної клітинної лінії, але з попереднього пасажу або пасажів, причому в обох тестах використовуються

10 ідентичні умови й ідентичні ендопептидази зі зміненою націленістю.

[0100] Клітини зі стабільної клітинної лінії, описані в даній заявці, здатні демонструвати стійку чутливість до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю протягом великої кількості клітинних пасажів. У даній заявці термін "чутливість до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю" відноситься до найнижчої дози, яка може бути стабільно вимірювана в тесті і яка

15 перевищує рівень сигналу, вимірюваного в неопрацьованому контролі, або фонового сигналу.

[0101] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії демонструють чутливість до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю для будь-яких даних пасажів, що становить, наприклад, 100 нМ або нижче, близько 80 нМ або нижче, близько 70 нМ або нижче, близько 60 нМ або нижче, близько 50 нМ або

20 нижче, близько 40 нМ або нижче, близько 30 нМ або нижче, близько 20 нМ або нижче, близько 10 нМ або нижче, близько 1 нМ або нижче, близько 0,9 нМ або нижче, близько 0,8 нМ або нижче, близько 0,7 нМ або нижче, близько 0,6 нМ або нижче, близько 0,5 нМ або нижче, близько 0,4 нМ або нижче, близько 0,3 нМ або нижче, близько 0,2 нМ або нижче або близько 0,1 нМ або нижче. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної

25 клітинної лінії демонструють чутливість до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю для будь-яких даних пасажів, що становить, наприклад, приблизно від 0,01 нМ до 100 нМ, приблизно від 0,01 нМ до 75 нМ, приблизно від 0,01 нМ до 50 нМ, приблизно від 0,01 нМ до 25 нМ, приблизно від 0,01 нМ до 20 нМ, приблизно від 0,01 нМ до 15 нМ, приблизно від 0,01 нМ до 10 нМ, приблизно від 0,01 нМ до 5 нМ, приблизно від 0,001 нМ до 100 нМ, приблизно від 0,001

30 нМ до 75 нМ, приблизно від 0,001 нМ до 50 нМ, приблизно від 0,001 нМ до 25 нМ, приблизно від 0,001 нМ до 20 нМ, приблизно від 0,001 нМ до 15 нМ, приблизно від 0,001 нМ до 10 нМ або приблизно від 0,001 нМ до 5 нМ.

[0102] Відповідно до іншого варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії демонструють чутливість до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, що становить близько 100 нМ або нижче, близько 75 нМ або нижче, близько 50 нМ або нижче, близько 25 нМ або нижче, близько 20 нМ або нижче, близько 15 нМ або нижче, близько 10 нМ

35 або нижче або близько 1 нМ або нижче, протягом, наприклад, 5 або більше клітинних пасажів, 10 або більше клітинних пасажів, 15 або більше клітинних пасажів, 20 або більше клітинних пасажів, 25 або більше клітинних пасажів, 30 або більше клітинних пасажів, 35 або більше клітинних пасажів, 40 або більше клітинних пасажів, 45 або більше клітинних пасажів або 50 або

40 більше клітинних пасажів. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії демонструють чутливість до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, що становить близько 100 нМ або нижче, близько 75 нМ або нижче, близько 50 нМ або нижче, близько 25 нМ або нижче, близько 20 нМ або нижче, близько 15 нМ

45 або нижче, близько 10 нМ або нижче або близько 1 нМ або нижче, протягом, наприклад, приблизно від 15 до 60 пасажів, приблизно від 20 до 60 пасажів, приблизно від 25 до 60 пасажів, приблизно від 30 до 60 пасажів, приблизно від 35 до 60 пасажів, приблизно від 40 до 60 пасажів, приблизно від 45 до 60 пасажів, приблизно від 50 до 60 пасажів, приблизно від 15 до 50 пасажів, приблизно від 20 до 50 пасажів, приблизно від 25 до 50 пасажів, приблизно від 30 до 50 пасажів,

50 приблизно від 35 до 50 пасажів, приблизно від 40 до 50 пасажів, приблизно від 15 до 40 пасажів, приблизно від 20 до 40 пасажів, приблизно від 25 до 40 пасажів або приблизно від 30 до 40 пасажів.

[0103] Клітини зі стабільної клітинної лінії, описані в даній заявці, здатні демонструвати стійку відносну ефективність поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю або активність

55 ендопептидаз зі зміненою націленістю протягом великої кількості клітинних пасажів. У даній заявці термін "відносна ефективність" відноситься до ступеня збігу верхньої асимптоти активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, детектованою у поточному тесті, з верхньою асимптотою активності ендопептидаз зі зміненою націленістю в еталонному стандарті, еталонній молекулі або еталонному числі пасажів, використовуваному в даному тесті. У даній

60 заявці термін "співвідношення сигналу до шуму для верхньої асимптоти" відноситься до

сигналу, детектованому в тесті на верхній межі детектування, поділеному на сигнал, детектований у неопрацьованому контролі, або фоновий сигнал. Верхня межа детектування являє собою найвищу дозу, яка може бути стійко вимірювана в тесті до настання насичення сигналу.

5 [0104] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, описані в даній заявці, здатні демонструвати чітко виражену верхню асимптоту протягом великої кількості клітинних пасажів і підтримувати співвідношення сигналу до шуму, яке стійке й адекватне для тесту. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, описані в даній заявці, повинні мати чітко виражене співвідношення сигналу до шуму для верхньої асимптоти активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, що становить, наприклад, 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, 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, протягом, наприклад, 5 або більше клітинних пасажів, 10 або більше клітинних пасажів, 15 або більше клітинних пасажів, 20 або більше клітинних пасажів, 25 або більше клітинних пасажів, 30 або більше клітинних пасажів, 35 або більше клітинних пасажів, 40 або більше клітинних пасажів, 45 або більше клітинних пасажів або 50 або більше клітинних пасажів. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, описані в даній заявці, повинні мати чітко виражене співвідношення сигналу до шуму для верхньої асимптоти активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, що становить, наприклад, 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, 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, протягом, наприклад, приблизно від 15 до 60 пасажів, приблизно від 20 до 60 пасажів, приблизно від 25 до 60 пасажів, приблизно від 30 до 60 пасажів, приблизно від 35 до 60 пасажів, приблизно від 40 до 60 пасажів, приблизно від 45 до 60 пасажів, приблизно від 50 до 60 пасажів, приблизно від 15 до 50 пасажів, приблизно від 20 до 50 пасажів, приблизно від 25 до 50 пасажів, приблизно від 30 до 50 пасажів, приблизно від 35 до 50 пасажів, приблизно від 40 до 50 пасажів, приблизно від 15 до 40 пасажів, приблизно від 20 до 40 пасажів, приблизно від 25 до 40 пасажів або приблизно від 30 до 40 пасажів.

[0105] Клітини зі стабільної клітинної лінії, описані в даній заявці, здатні демонструвати чітко виражену криву доза-ефект для активності ендопептидаз зі зміненою націленістю протягом великої кількості клітинних пасажів. У даній заявці термін "крива доза-ефект" відноситься до ступеня відповідності вихідних даних обраної статистичної моделі для даного тесту. Як необмежуючий приклад можна навести сигмоїдальну криву з логістичним підбором на основі чотирьох параметрів, яка являє собою криву доза-ефект для експериментів згідно аналізу ферментативної активності, таких як, наприклад, тест на активність. Як інший необмежуючий приклад можна навести криву насичення для зв'язування ліганду з одним сайтом, що являє собою криву доза-ефект для експериментів згідно зв'язуванню ліганду/антитіла.

[0106] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, описані в даній заявці, демонструють чітко виражену криву доза-ефект для активності ендопептидаз зі зміненою націленістю протягом великої кількості клітинних пасажів. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, описані в даній заявці, демонструють чітко виражену криву доза-ефект для активності ендопептидаз зі зміненою націленістю протягом, наприклад, 5 або більше клітинних пасажів, 10 або більше клітинних пасажів, 15 або більше клітинних пасажів, 20 або більше клітинних пасажів, 25 або більше клітинних пасажів, 30 або більше клітинних пасажів, 35 або більше клітинних пасажів, 40 або більше клітинних пасажів, 45 або більше клітинних пасажів або 50 або більше клітинних пасажів. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, описані в даній заявці, демонструють чітко виражену криву доза-ефект для активності ендопептидаз зі зміненою націленістю протягом, наприклад, приблизно від 15 до 60 пасажів, приблизно від 20 до 60 пасажів, приблизно від 25 до 60 пасажів, приблизно від 30 до 60 пасажів, приблизно від 35 до 60 пасажів, приблизно від 40 до 60 пасажів, приблизно від 45 до 60 пасажів,

приблизно від 50 до 60 пасажів, приблизно від 15 до 50 пасажів, приблизно від 20 до 50 пасажів, приблизно від 25 до 50 пасажів, приблизно від 30 до 50 пасажів, приблизно від 35 до 50 пасажів, приблизно від 40 до 50 пасажів, приблизно від 15 до 40 пасажів, приблизно від 20 до 40 пасажів, приблизно від 25 до 40 пасажів або приблизно від 30 до 40 пасажів.

5 [0107] Клітини зі стабільної клітинної лінії, описані в даній заявці, здатні демонструвати стійке відносне значення EC_{50} для активності ендопептидаз зі зміненою націленістю протягом великої кількості клітинних пасажів. У даній заявці термін "відносна EC_{50} " або "відносне значення EC_{50} " відноситься до значення EC_{50} для активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, нормованого відносно EC_{50} , розрахованої для еталонного стандарту, еталонної молекули або еталонного числа пасажів, використовуваного в даному тесті.

10 [0108] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії демонструють стійку відносну EC_{50} для активності ендопептидаз зі зміненою націленістю протягом великої кількості клітинних пасажів. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії демонструють стійку відносну EC_{50} для активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, яка, наприклад, становить близько $\pm 10\%$, близько $\pm 20\%$, близько $\pm 30\%$, близько $\pm 40\%$, близько $\pm 50\%$, близько $\pm 60\%$, близько $\pm 70\%$ або близько $\pm 75\%$ відносної EC_{50} для активності ендопептидаз зі зміненою націленістю протягом, наприклад, 5 або більше клітинних пасажів, 10 або більше клітинних пасажів, 15 або більше клітинних пасажів, 20 або більше клітинних пасажів, 25 або більше клітинних пасажів, 30 або більше клітинних пасажів, 35 або більше клітинних пасажів, 40 або більше клітинних пасажів, 45 або більше клітинних пасажів або 50 або більше клітинних пасажів. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клональної клітинної лінії демонструють відносну EC_{50} для активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, яка, наприклад, становить приблизно від $\pm 10\%$ до 75% , приблизно від $\pm 10\%$ до 70% , приблизно від $\pm 10\%$ до 60% , приблизно від $\pm 10\%$ до 50% , приблизно від $\pm 10\%$ до 40% , приблизно від $\pm 10\%$ до 30% або приблизно від $\pm 10\%$ до 20% відносної EC_{50} для активності ендопептидаз зі зміненою націленістю протягом, наприклад, 5 або більше клітинних пасажів, 10 або більше клітинних пасажів, 15 або більше клітинних пасажів, 20 або більше клітинних пасажів, 25 або більше клітинних пасажів, 30 або більше клітинних пасажів, 35 або більше клітинних пасажів, 40 або більше клітинних пасажів, 45 або більше клітинних пасажів або 50 або більше клітинних пасажів.

30 [0109] Частина аспектів даного опису включає ендопептидази зі зміненою націленістю. У даній заявці термін "ендопептидази зі зміненою націленістю" є синонімом "Білки-модулятори направленої везикулярного екзоцитозу" або "TVEMP". Необмежуючі приклади ендопептидаз зі зміненою націленістю описані, наприклад, в Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, патент США 6461617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, патент США 6632440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, патент США 6843998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, публікація патенту США 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, публікація патенту США 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, міжнародна публікація патенту WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, заявка на патент США № 11/376696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США № 11/776075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, заявка на патент США № 11/829475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, публікація міжнародної заявки WO 2006/059093; i Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, міжнародна публікація патенту WO 2006/059105, кожен з яких повністю включений у дану заявку за допомогою посилання. Необмежуючі приклади ендопептидаз зі зміненою націленістю включають SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 й SEQ ID NO: 131.

50 [0110] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, джерелом детектованої активності ендопептидази зі зміненою націленістю є ендопептидаза зі зміненою націленістю. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, джерелом детектованої активності ендопептидази зі зміненою націленістю є ендопептидаза зі зміненою націленістю, описана в Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, патент США 6461617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, патент США 6632440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The

Treatment Of Pancreatitis, патент США 6843998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, публікація заявки на патент США 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, публікація заявки на патент США 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al.,
 5 Re-targeted Toxin Conjugates, міжнародна публікація патенту WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, заявка на патент США № 11/376696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США № 11/776075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, заявка на патент США № 11/829475;
 10 Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, міжнародна публікація патенту WO 2006/059093; і Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, публікація міжнародної заявки WO 2006/059105, вміст кожного з яких повністю включено в дану заявку за допомогою посилання. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, ендопептидази зі зміненою націленістю являють собою SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 або SEQ ID NO: 131.

15 [0111] Відповідно до іншого варіанта реалізації, джерелом детектованої активності ендопептидази зі зміненою націленістю є ендопептидаза зі зміненою націленістю, яка, наприклад, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентична згідно послідовності амінокислот ендопептидази зі зміненою націленістю, описаної в Keith A. Foster et al., Clostridial
 20 Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, патент США 6461617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, патент США 6632440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, патент США 6843998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, публікація патенту США 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, публікація заявки на патент США 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, публікація міжнародної заявки WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, заявка на патент США № 11/376696; Steward, L.E. et al.,
 30 Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США № 11/776075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, заявка на патент США № 11/829475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, публікація міжнародної заявки WO 2006/059093; і Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, публікація міжнародної заявки WO 2006/059105, кожен з яких повністю включений у дану заявку за допомогою посилання. Відповідно до іншого варіанта реалізації, джерелом детектованої активності ендопептидази зі зміненою націленістю є ендопептидаза зі зміненою націленістю, яка, наприклад, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентична згідно послідовності амінокислот ендопептидази зі зміненою націленістю з SEQ ID
 40 NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 або SEQ ID NO: 131.

[0112] Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, джерелом детектованої активності ендопептидази зі зміненою націленістю є ендопептидаза зі зміненою націленістю, що включає підряд заміни, делеції або інсерції, що не йдуть підряд, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9
 45 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з ендопептидаз зі зміненою націленістю, описаних в Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, патент США 6461617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, патент США 6632440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, патент США 6843998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, публікація заявки на патент США 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, публікація заявки на патент США 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, публікація міжнародної заявки WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, заявка на патент США № 11/376696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США № 11/776,075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, заявка на патент США № 11/829,475; Foster, K.A. et al.,
 60 Fusion Proteins, публікація міжнародної заявки WO 2006/059093; і Foster, K.A. et al., Non-

Cytotoxic Protein Conjugates, публікація міжнародної заявки WO 2006/059105, вміст кожного з яких повністю включено в дану заявку за допомогою посилання. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, джерелом детектованої активності ендopeптидази зі зміненою націленістю є ендopeптидаза зі зміненою націленістю, що включає підряд заміни, делеції або інсерції, що не йдуть підряд, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з ендopeптидаз зі зміненою націленістю, описаних в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 або SEQ ID NO: 131.

[0113] Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, джерелом детектованої активності ендopeптидази зі зміненою націленістю є не варіант, що зустрічається в природі, ендopeптидази зі зміненою націленістю, що включає підряд заміни, делеції або інсерції, що йдуть підряд, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з ендopeптидаз зі зміненою націленістю, описаних в Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, патент США 6461617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, патент США 6632440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, патент США 6843998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, публікація патенту США 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, публікація заявки на патент США 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, міжнародна публікація патенту WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, заявка на патент США № 11/376696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США № 11/776075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, заявка на патент США № 11/829475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, публікація міжнародної заявки WO 2006/059093; i Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, публікація міжнародної заявки WO 2006/059105, вміст кожного з яких повністю включено в дану заявку за допомогою посилання. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, джерелом детектованої активності ендopeптидази зі зміненою націленістю є не варіант, що зустрічається в природі, ендopeптидази зі зміненою націленістю, що включає заміни, делеції або інсерції, що йдуть підряд, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з ендopeптидаз зі зміненою націленістю, описаних в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 або SEQ ID NO: 131.

[0114] Згідно ще одного варіанту реалізації, джерелом детектованої активності ендopeптидази зі зміненою націленістю є ендopeптидаза зі зміненою опіоїдною націленістю. Необмежуючі приклади ендopeптидази зі зміненою опіоїдною націленістю, або опіоїдно-TVEMP, описані, наприклад, в Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, патент США 7132259; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, патент США 7244437; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, патент США 7413742; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, патент США 7415338; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, патент США 7514088; Keith A. Foster, Fusion Proteins, публікація патенту США 2008/0064092; Keith A. Foster, Fusion Proteins, публікація патенту США 2009/0035822; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, публікація заявки на патент США 2009/0048431; Keith A. Foster, Non-Cytotoxic Protein Conjugates, публікація заявки на патент США 2009/0162341; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, публікація міжнародної заявки WO 2005/023309; i Lance E. Steward, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells, публікація міжнародної заявки WO 2008/008805; вміст кожного з яких повністю включено в дану заявку за допомогою посилання.

[0115] Згідно ще одного варіанту реалізації, джерелом детектованої активності ендopeптидази зі зміненою націленістю є ендopeптидаза зі зміненою галаніновою націленістю. Необмежуючі приклади ендopeптидаз зі зміненою галаніновою націленістю, або галанін-TVEMP,

описані, наприклад, в Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capability and Enhanced Targeting Activity, заявка на патент США № 11/776043 (11 липня 2007 р.); Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США № 11/776052 (11 липня 2007 р.); i Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США № 11/776075 (11 липня 2007 р.), вміст кожного з яких повністю включено в дану заявку за допомогою посилання.

[0116] Частина аспектів даного опису включає SNAP-25. У даній заявці термін "SNAP-25" відноситься до природного SNAP-25 або такого SNAP-25, що не зустрічається в природі, який переважно розщеплюється ендопептидазами зі зміненою націленістю. У даній заявці термін "переважно розщеплюється" відноситься до швидкості розщеплення SNAP-25 ендопептидазами зі зміненою націленістю, яка щонайменше на порядок перевищує швидкість розщеплення ендопептидазами зі зміненою націленістю якого-небудь іншого субстрату. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, швидкість розщеплення SNAP-25 ендопептидазами зі зміненою націленістю перевищує щонайменше на два порядки, щонайменше на три порядки, щонайменше на чотири порядки або щонайменше на п'ять порядків швидкість розщеплення ендопептидазами зі зміненою націленістю якого-небудь іншого субстрату.

[0117] У даній заявці термін "природний SNAP-25" відноситься до будь-якого SNAP-25, який утворюється в результаті природних процесів, включаючи, але не обмежуючись ними, ізоформи SNAP-25, що утворюються в результаті посттрансляційної модифікації, альтернативного сплайсинга транскрипта або спонтанної мутації, і підтипи SNAP-25. Природні SNAP-25 включають, але не обмежуються, 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 їх варіанти, у яких присутні заміни, делеції або інсерції, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше 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.

[0118] У даній заявці термін "SNAP-25, що не зустрічається в природі" відноситься до будь-якого SNAP-25, структура якого була змінена за допомогою діяльності людини, включаючи, але не обмежуючись, SNAP-25, одержаний за допомогою генної інженерії з використанням випадкового мутагенезу або раціонального дизайну, і SNAP-25, одержаний за допомогою хімічного синтезу in vitro. Необмежуючі приклади SNAP-25, що не зустрічається 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 заявки на патент США 2008/0160561, кожен з яких повністю включений у дану заявку за допомогою посилання. SNAP-25, що не зустрічається в природі, може містити заміни, делеції або інсерції, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше 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.

[0119] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, SNAP-25 являє собою природний SNAP-25. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, SNAP-25 являє собою ізоформу SNAP-25 або підтип SNAP-25. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, природний SNAP-25 являє собою природний 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. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, SNAP-25 являє собою природний SNAP-25, який, наприклад, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентичний згідно послідовності амінокислот 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.

[0120] Відповідно до іншого варіанта реалізації, SNAP-25 являє собою SNAP-25, що не зустрічається в природі. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, SNAP-25 являє собою SNAP-25, що не зустрічається в природі, який, наприклад, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентичний згідно послідовності амінокислот SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, SNAP-25 являє собою SNAP-25, що не зустрічається в природі, який включає заміни, делеції або інсерції, що не йдуть підряд, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше 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. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, SNAP-25 являє собою SNAP-25, що не зустрічається в природі, який включає заміни, делеції або інсерції, що йдуть підряд, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше 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.

[0121] SNAP-25 може являти собою ендогенний SNAP-25 або екзогенний SNAP-25. У даній заявці термін "ендогенний SNAP-25" відноситься до SNAP-25, природно присутнього в клітині в силу того, що він природно закодований у геномі клітини, і таким чином, у клітині первинно експресується SNAP-25, що знімає необхідність наявності зовнішнього джерела SNAP-25 або зовнішнього джерела генетичного матеріалу, що кодує SNAP-25. Експресія ендогенного SNAP-25 може відбуватися за участю стимуляції з боку навколишнього середовища, такої як, наприклад, клітинне диференціювання, або без нього. Згідно визначенню, ендогенним SNAP-25 може бути тільки природний SNAP-25 або його варіанти. Наприклад, у наступних стабільних клітинних лініях експресується ендогенний SNAP-25: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa, SK-N-DZ й SK-N-BE(2)-C.

[0122] У даній заявці термін "екзогенний SNAP-25" відноситься до SNAP-25, експресія якого в клітині досягається шляхом введення зовнішнього джерела SNAP-25 або зовнішнього джерела генетичного матеріалу, що кодує SNAP-25, у результаті діяльності людини. Експресія екзогенного SNAP-25 може відбуватися за участю стимуляції з боку навколишнього середовища, такої як, наприклад, клітинне диференціювання, або без нього. Як необмежуючий приклад, клітини зі стабільної клітинної лінії можуть експресувати екзогенний SNAP-25 у результаті тимчасової або стабільної трансфекції SNAP-25. Як інший необмежуючий приклад, клітини зі стабільної клітинної лінії можуть експресувати екзогенний SNAP-25 у результаті трансфекції білка SNAP-25. Екзогенним SNAP-25 може бути природний SNAP-25 або його варіанти, або SNAP-25, що не зустрічається в природі, або його варіанти.

[0123] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії експресують ендогенний SNAP-25. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, ендогенний SNAP-25, експресований клітинами зі стабільної клітинної лінії, являє собою природний SNAP-25. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, ендогенний SNAP-25, експресований клітинами зі стабільної клітинної лінії, являє собою 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. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, ендогенний SNAP-25, експресований клітинами зі стабільної клітинної лінії, являє собою природний SNAP-25, такий як, наприклад, ізоформа SNAP-25 або підтип SNAP-25. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, ендогенний SNAP-25, експресований клітинами зі стабільної клітинної лінії, являє собою природний SNAP-25, який, наприклад, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентичний згідно послідовності амінокислот 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.

[0124] Відповідно до іншого варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії екзогенного SNAP-25. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії природного SNAP-25. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії природного 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. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії природного SNAP-25, такого як, наприклад, ізоформа SNAP-25 або підтип SNAP-25. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії природного SNAP-25, який, наприклад, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентичний згідно послідовності амінокислот 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.

[0125] Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії SNAP-25, що не зустрічається в природі. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії SNAP-25, що не зустрічається в природі, який, наприклад, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентичний згідно послідовності амінокислот 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. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії SNAP-25, що не зустрічається в природі, що включає заміни, делеції або інсерції, що не йдуть підряд, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше 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. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії SNAP-25, що не зустрічається в природі, який включає заміни, делеції або інсерції, що йдуть підряд, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше 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.

[0126] Тести, що виявляють розщеплення SNAP-25 після контакту з ендопептидазами зі зміненою націленістю, можна використовувати для оцінки наявності в клітині експресії ендогенного або екзогенного SNAP-25. У цих тестах утворення продуктів розщеплення SNAP-25 буде спостерігатися в клітинах, що експресують SNAP-25, після обробки ендопептидазами зі зміненою націленістю. Необмежуючі приклади конкретного аналізу за допомогою Вестерн-блотінга, а також детально охарактеризовані реактиви, умови й протоколи можна знайти у комерційних постачальників, які включають, але не обмежуються, Amersham Biosciences, Піскетейуей, Нью-Джерсі; Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Каліфорнія; Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Іллінойс; Promega Corporation, Мадісон, Вісконсін, і Stratagene, Inc., Ла-Хойя,

Каліфорнія. Варто розуміти, що ці й подібні їм тести для розщеплення SNAP-25 можуть бути придатні для ідентифікації клітин, що експресують ендogenousний або екзогенний SNAP-25.

[0127] Як необмежуючі приклади, аналіз за допомогою Вестерн-блотінга з використанням антитіл, що розпізнають продукт розщеплення SNAP-25 або як розщеплені, так і нерозщеплені форми SNAP-25, можна використовувати для аналізу поглинання ендopeптидаз зі зміненою націленістю. Приклади анти-SNAP-25 антитіл, придатних для цих тестів, включають, але не обмежуються, мишачі моноклональні анти-SNAP-25 антитіла SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Лютервіль, Меріленд), мишачі моноклональні анти-SNAP-25 антитіла CI 71.1 (Synaptic Systems, Геттінген, Німеччина), мишачі моноклональні анти-SNAP-25 антитіла CI 71.2 (Synaptic Systems, Геттінген, Німеччина), мишачі моноклональні анти-SNAP-25 антитіла SP12 (Abcam, Кембридж, Массачусетс), кролячу поліклональну антисироватку α -SNAP-25 (Synaptic Systems, Геттінген, Німеччина), кролячу поліклональну антисироватку α -SNAP-25 (Abcam, Кембридж, Массачусетс) і кролячу поліклональну антисироватку α -SNAP-25 S9684 (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі).

[0128] Частина аспектів даного опису включає рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю. У даній заявці термін "рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю" відноситься або до природного рецептора ендopeптидаз зі зміненою націленістю або до рецептора ендopeптидаз зі зміненою націленістю, що не зустрічається в природі, який вибірково взаємодіє з ендopeптидазами зі зміненою націленістю таким чином, що відповідь на активність ендopeптидаз зі зміненою націленістю підсилюється. У даній заявці термін "вибірково взаємодіє" відноситься до такої рівноважної константи дисоціації (KD) ендopeптидази зі зміненою націленістю й рецептора ендopeптидази зі зміненою націленістю, що щонайменше на один порядок менше подібної величини для ендopeптидази зі зміненою націленістю й будь-якого іншого рецептора клітинної поверхні. Рівноважна константа дисоціації – це тип константи рівноваги, яка вимірює здатність комплексу ендopeптидази зі зміненою націленістю та рецептора ендopeптидази зі зміненою націленістю обернено розділятися (дисоціювати) на складові її молекули, а саме, ендopeптидазу зі зміненою націленістю й рецептор ендopeптидази зі зміненою націленістю, і визначається як $KD = K_a / K_d$ у стані рівноваги. Константа асоціації (K_a) визначається як $K_a = [C] / [L][R]$, а константа дисоціації (K_d) визначається як $K_d = [L][R] / [C]$, де $[L]$ дорівнює молярній концентрації ендopeптидази зі зміненою націленістю, $[R]$ - молярна концентрація рецептора ендopeптидази зі зміненою націленістю, а $[C]$ - молярна концентрація комплексу ендopeптидази зі зміненою націленістю й рецептора ендopeптидази зі зміненою націленістю, де концентрації всіх компонентів відповідають стану рівноваги системи. Чим менше константа дисоціації, тим більш міцно ендopeптидаза зі зміненою націленістю зв'язана зі своїм рецептором, або вище афінність зв'язування між ендopeптидазою зі зміненою націленістю й рецептором ендopeптидази зі зміненою націленістю. Відповідно до аспектів цього варіанта реалізації, константа дисоціації ендopeптидази зі зміненою націленістю й відповідним рецептором, щонайменше на два, три, чотири або п'ять порядків менше, ніж константа дисоціації ендopeптидази зі зміненою націленістю й будь-яким іншим рецептором. Відповідно до інших аспектів цього варіанта реалізації, афінність зв'язування ендopeптидази зі зміненою націленістю, яка вибірково взаємодіє з відповідним рецептором, може мати рівноважну константу дисоціації (KD), наприклад, 500 нМ або менше, 400 нМ або менше, 300 нМ або менше, 200 нМ, або менше, менше 100 нМ, або ще менше. Відповідно до інших аспектів цього варіанта реалізації, афінність зв'язування ендopeптидази зі зміненою націленістю, яка вибірково взаємодіє з відповідним рецептором, може мати рівноважну константу дисоціації (KD), наприклад, 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, менше 10 нМ, або ще менше. У даній заявці термін "підсилює відповідь на активність ендopeптидази зі зміненою націленістю", відноситься до здатності рецептора ендopeптидази зі зміненою націленістю взаємодіяти з ендopeптидазою зі зміненою націленістю, з формуванням комплексу ендopeптидаза/рецептор і наступною інтерналізацією цього комплексу в цитоплазму клітини.

[0129] У даній заявці термін "природний рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю" відноситься до будь-якого рецептора ендopeптидаз зі зміненою націленістю, що утворюється в результаті природних процесів, включаючи, але не обмежуючись, ізоформи рецептора ендopeптидаз зі зміненою націленістю, що утворюються в результаті посттрансляційної модифікації, альтернативного сплайсінга транскрипта або спонтанної мутації, і підтипи рецептора ендopeптидаз зі зміненою націленістю. Природні рецептори ендopeптидаз зі зміненою націленістю включають, але не обмежуються, природні опіоїдні рецептори, такі як опіоїдоподібний рецептор 1 (ORL1), δ -опіоїдний рецептор (DOR), κ -опіоїдний рецептор (KOR) і μ -опіоїдний рецептор (MOR), такі як описано в Christopher Evans et al., Opioid Receptor Genes,

патент США 6265563; Christopher Evans et al., Methods of Screening Modulators of Opioid Receptor Activity, патент США 6432652; Christopher Evans et al., Opioid Receptors and Methods of Use, патент США 7282563; і Christopher Evans et al., Delta Opioid Receptor Proteins, публікація заявки на патент США 2008/0219925, кожен з яких повністю включений у дану заявку за допомогою посилання. Інші приклади природних рецепторів ендопептидаз зі зміненою націленістю включають, але не обмежуються, рецептор галаніну 1, рецептор галаніну 2 і рецептор галаніну 3. У даній галузі техніки відомі природні опіоїдні рецептори з інших видів хребетних, таких як, наприклад, примати, корови, собаки, миші, пацюки, кури й риби, і їх можна використовувати відповідно до аспектів даної заявки.

[0130] Природний ORL1 включає, але не обмежується, SEQ ID NO: 25 й SEQ ID NO: 26 або їхні варіанти, у яких присутні заміни, делеції або інсерції, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з SEQ ID NO: 25 або SEQ ID NO: 26. Природний DOR включає, але не обмежується, SEQ ID NO: 27 й SEQ ID NO: 28 або їх варіанти, у яких присутні заміни, делеції або інсерції, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з SEQ ID NO: 27 або SEQ ID NO: 28. Природний KOR включає, але не обмежується, SEQ ID NO: 29 й SEQ ID NO: 30 або їх варіанти, у яких присутні заміни, делеції або інсерції, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з SEQ ID NO: 29 або SEQ ID NO: 30. Природний MOR включає, але не обмежується, SEQ ID NO: 31 або його варіанти, у яких присутні заміни, делеції або інсерції, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з SEQ ID NO: 31.

[0131] Природний рецептор галаніну 1 включає, але не обмежується, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 й SEQ ID NO: 138 або його варіанти, у яких присутні заміни, делеції або інсерції, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 або SEQ ID NO: 138. Природний рецептор галаніну 2 включає, але не обмежується, SEQ ID NO: 139 або його варіанти, у яких присутні заміни, делеції або інсерції, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з SEQ ID NO: 139. Природний рецептор галаніну 3 включає, але не обмежується, SEQ ID NO: 140 або його варіанти, у яких присутні заміни, делеції або інсерції, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з SEQ ID NO: 140.

[0132] У даній заявці термін "варіант рецептора ендопептидаз зі зміненою націленістю, що не зустрічається в природі" відноситься до будь-якого рецептора ендопептидаз зі зміненою націленістю, одержаного за допомогою людських модифікацій або побудов, включаючи, але не обмежуючись ними, рецептор ендопептидаз зі зміненою націленістю, одержаний методами генної інженерії, з використанням випадкового мутагенезу або раціонального дизайну, і рецептор ендопептидаз зі зміненою націленістю, одержаний хімічним синтезом. Необмежуючі приклади варіантів рецепторів ендопептидаз зі зміненою націленістю, що не зустрічаються в природі, включають, наприклад, консервативні варіанти рецептора ендопептидаз зі зміненою націленістю, неконсервативні варіанти рецептора ендопептидаз зі зміненою націленістю, химерні варіанти рецептора ендопептидаз зі зміненою націленістю й активні фрагменти рецептора ендопептидаз зі зміненою націленістю.

[0133] У даній заявці термін "рецептор ендопептидаз зі зміненою націленістю, що не зустрічається в природі" відноситься до будь-якого рецептора ендопептидаз зі зміненою націленістю, структура якого була змінена за допомогою діяльності людини, включаючи, але не обмежуючись, рецептор ендопептидаз зі зміненою націленістю, одержаний за допомогою генної інженерії з використанням випадкового мутагенезу або раціонального дизайну, і рецептор ендопептидаз зі зміненою націленістю, одержаний за допомогою хімічного синтезу in vitro. Рецептор ендопептидаз зі зміненою націленістю, що не зустрічається в природі, може містити заміни, делеції або інсерції, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше,

націленістю являє собою рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю, що не зустрічається в природі, який, наприклад, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентичний згідно послідовності амінокислот SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 або SEQ ID NO: 140. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю являє собою рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю, що не зустрічається в природі, який включає заміни, делеції або інсерції, що не йдуть підряд, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 або SEQ ID NO: 140. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю являє собою рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю, що не зустрічається в природі, який включає заміни, делеції або інсерції, що йдуть підряд, наприклад, 1 або більше, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 6 або більше, 7 або більше, 8 або більше, 9 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 30 або більше, 40 або більше, 50 або більше або 100 або більше амінокислот з SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 або SEQ ID NO: 140.

[0138] Рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю може бути ендogenous або екзogenous. У даній заявці термін "ендogenous рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю" відноситься до рецептора ендopeптидаз зі зміненою націленістю, природно присутнього в клітині, оскільки він природно закодований у геномі клітини, так, що в клітині первинно експресується рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю без необхідності в зовнішньому джерелі рецептора ендopeптидаз зі зміненою націленістю або зовнішньому джерелі генетичного матеріалу, що кодує рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю. Експресія ендogenous рецептора ендopeптидаз зі зміненою націленістю може відбуватися як при зовнішній стимуляції, так і без неї, як, наприклад, при диференціюванні клітини або активації промотору. Наприклад, наступні стабільні клітинні лінії експресують щонайменше один ендogenous рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю: AGN P33, Neuro-2a, SiMa й SK-N-DZ. Ендogenous рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю може бути тільки природним рецептором ендopeптидаз зі зміненою націленістю або його природними варіантами.

[0139] У даній заявці термін "екзogenous рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю" відноситься до рецептора ендopeптидаз зі зміненою націленістю, що експресується в клітині внаслідок введення зовнішнього джерела рецептора ендopeптидаз зі зміненою націленістю або зовнішнім джерелом генетичного матеріалу, що кодує рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю, внаслідок діяльності людини. Експресія екзogenous рецептора ендopeптидаз зі зміненою націленістю може відбуватися як при зовнішній стимуляції, так і без неї, як, наприклад, при диференціюванні клітини або активації промотору. Як необмежуючі приклади, клітини стабільних клітинних ліній можуть експресувати один або декілька екзogenous рецепторів ендopeптидаз зі зміненою націленістю внаслідок тимчасової або стабільної трансфекції молекулою полінуклеотиду, що кодує рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю, такий як, наприклад, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галаніну 1, рецептор галаніну 2 або рецептор галаніну 3. Як інший необмежуючий приклад, клітини стабільних клітинних ліній можуть експресувати один або більше екзogenous рецепторів ендopeптидаз зі зміненою націленістю за рахунок білкової трансфекції рецепторів ендopeптидаз зі зміненою націленістю, таких як, наприклад, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галаніну 1, рецептор галаніну 2 або рецептор галаніну 3. Екзogenous рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю може бути природним рецептором ендopeптидаз зі зміненою націленістю або його природними варіантами, або рецептором ендopeптидаз зі зміненою націленістю, що не зустрічається в природі, або його варіантами, що не зустрічаються в природі.

[0140] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії експресують ендogenous рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, ендogenous рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю, експресований клітинами зі стабільної клітинної лінії, являє собою природний рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, ендogenous рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю, експресований клітинами зі стабільної клітинної лінії, являє собою 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: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 або SEQ ID NO: 140. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, ендogenous рецептор ендopeптидаз зі зміненою націленістю, експресований

природних ORL1, DOR, KOR, MOR або будь-якої їх комбінації. Відповідно до інших аспектів цього варіанта реалізації, клітини стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії таких, що не зустрічаються в природі ORL1, DOR, KOR, MOR або будь-якої їх комбінації. Відповідно до інших аспектів цього варіанта реалізації, клітини стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії природних або таких, що не зустрічаються в природі ORL1, DOR, KOR, MOR або будь-якої їх комбінації.

[0144] Згідно ще одного варіанту реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії екзогенних рецептора галаніну 1, рецептора галаніну 2, рецептора галаніну 3 або будь-якої їх комбінації. Відповідно до аспектів цього варіанта реалізації, клітини стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії природних рецептора галаніну 1, рецептора галаніну 2, рецептора галаніну 3 або будь-якої їх комбінації. Відповідно до інших аспектів цього варіанта реалізації, клітини стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії рецептора галаніну 1, рецептора галаніну 2, рецептора галаніну 3, що не зустрічаються в природі або будь-якої їх комбінації. Відповідно до інших аспектів цього варіанта реалізації, клітини стабільної клітинної лінії тимчасово або стабільно модифіковані із забезпеченням експресії природних або таких, що не зустрічаються в природі, рецептора галаніну 1, рецептора галаніну 2, рецептора галаніну 3 або будь-якої їх комбінації.

[0145] Клітини, у яких експресуються один або декілька ендогенних або екзогенних рецепторів ендопептидаз зі зміненою націленістю, можна ідентифікувати звичайними методами, включаючи прямі й непрямі тести на поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю. Тести, що визначають параметри зв'язування або поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю, можна використовувати для оцінки наявності в клітині експресії рецептора ендопептидаз зі зміненою націленістю. Такі тести включають, але не обмежуються, досвіди з утворення поперечних міжмолекулярних зв'язків з використанням мічених ендопептидаз зі зміненою націленістю, таких як, наприклад, [125I] ендопептидаза зі зміненою націленістю, див., 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 CI, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes, 29(2) Toxicol 261-264 (1991); і 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 необмежуючі приклади тестів включають імуноцитохімічні тести для детектування зв'язування ендопептидаз зі зміненою націленістю з використанням мічених або немічених антитіл, див., 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 тести з використанням імунопреципітації, див., 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), для детектування зв'язаних ендопептидаз зі зміненою націленістю з використанням мічених або немічених антитіл. Антитіла, придатні для цих тестів, включають, але не обмежуються перерахованими: антитіла, відібрані проти ендопептидаз зі зміненою націленістю, та/або антитіла, відібрані проти рецепторів ендопептидаз зі зміненою націленістю, таких як, наприклад, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галаніну 1, рецептор галаніну 2 або рецептор галаніну 3. Якщо антитіла позначені, зв'язування молекули можна детектувати різними засобами, включаючи аналіз за допомогою Вестерн-блотінга, пряме мікроскопічне спостереження клітинної локалізації антитіла, вимірювання кількості пов'язаного із клітиною або із субстратом антитіла після етапу відмивання, проточну цитометрію, електрофорез або капілярний електрофорез, з використанням методів, добре відомих фахівцям у даній галузі техніки. Якщо антитіла не позначені, можна використовувати мічені вторинні антитіла для непрямого детектування зв'язаної молекули й проводити детектування таким же чином, як і для мічених антитіл. Варто розуміти, що ці й подібні їм тести для визначення властивостей або характеристик поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю можуть бути придатні для ідентифікації клітин, що експресують ендогенні або екзогенні рецептори ендопептидаз зі зміненою націленістю.

[0146] Тести, що визначають вивільнення молекули після контакту з ендопептидазами зі зміненою націленістю, можна також використовувати для оцінки того, чи експресується в клітині один або декілька ендогенних або екзогенних рецепторів ендопептидаз зі зміненою націленістю. У цих тестах інгібування вивільнення молекули буде відбуватися в тих клітинах, які експресують рецептор ендопептидаз зі зміненою націленістю, після обробки ендопептидазами зі зміненою

націленістю. Широко відомі тести включають способи вимірювання інгібування вивільнення радіоактивно міченого катехоламіну з нейронів, такого як, наприклад, вивільнення $[^3H]$ норадреналіну або $[^3H]$ допаміну, див., 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); i 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 способи вимірювання вивільнення катехоламіну за допомогою флуориметричних методів, див., 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); i 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 необмежуючі приклади включають тести для вимірювання інгібування вивільнення гормонів з ендокринних клітин, таких як, наприклад, клітини передньої частки гіпофіза або клітини яєчників. Варто розуміти, що ці й подібні їм тести на вивільнення молекул можуть бути придатні для ідентифікації клітин, що експресують ендогенні або екзогенні рецептори ендопептидаз зі зміненою націленістю.

[0147] Тести, що дозволяють детектувати розщеплення субстрату SNAP-25 після його обробки ендопептидазами зі зміненою націленістю, можна також використовувати для визначення, чи експресує клітина один або більше ендогенних або екзогенних рецепторів ендопептидаз зі зміненою націленістю. У цих тестах наробіток продукту розщеплення SNAP-25 або зникнення не модифікованого SNAP-25 детектується в клітинах, що експресують рецептор ендопептидаз зі зміненою націленістю після обробки ендопептидазами зі зміненою націленістю. Необмежуючі приклади специфічного Вестерн-блотінга, так само як і добре охарактеризовані реактиви, умови й протоколи можна легко придбати у комерційних виробників, які включають, але не обмежуються перерахованими: Amersham Biosciences, Піскетей, Нью-Джерсі; Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Каліфорнія; Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Іллінойс; Promega Corporation, Мадісон, Вісконсін, i Stratagene, Inc., Ла-Хойя, Каліфорнія. Варто розуміти, що ці й подібні тести на розщеплення SNAP-25 можна використовувати для ідентифікації клітин, що експресують ендогенні або екзогенні рецептори ендопептидаз зі зміненою націленістю.

[0148] Як необмежуючі приклади, Вестерн-блотінга із використанням антитіл, які розпізнають продукт розщеплення SNAP-25 або як і розщеплені, так і нерозщеплені форми SNAP-25, можна використовувати, для оцінки поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю. Приклади анти-SNAP-25 антитіл, використовуваних для цього тесту, включають, але не обмежуються перерахованими: мишачі моноклональні анти-SNAP-25 антитіла SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Лютервіль, Меріленд), мишачі моноклональні анти-SNAP-25 антитіла CI 71.1 (Synaptic Systems, Геттінген, Німеччина), мишачі моноклональні анти-SNAP-25 антитіла CI 71.2 (Synaptic Systems, Геттінген, Німеччина), мишачі моноклональні анти-SNAP-25 антитіла SP12 (Abcam, Кембридж, Масачусетс), поліклональну сироватку кролика α -SNAP-25 (Synaptic Systems, Геттінген, Німеччина), поліклональну сироватку кролика α -SNAP-25 S9684 (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі) і поліклональну сироватку кролика α -SNAP-25 (Abcam, Кембридж, Масачусетс).

[0149] Відповідно до одного аспекту даної заявки запропоновані клітини, які внаслідок генетичних маніпуляцій або рекомбінантної технології здобули здатність експресувати ендогенний SNAP-25 та/або один або декілька екзогенних рецепторів ендопептидаз зі зміненою націленістю. Клітини, придатні із забезпеченням експресії ендогенного SNAP-25 та/або одного або більше екзогенних рецепторів ендопептидаз зі зміненою націленістю внаслідок генетичних маніпуляцій або рекомбінантної технології, включають нервові й такі, що не відносяться до нервових, клітини, які можуть або не можуть експресувати ендогенний SNAP-25 та/або один або декілька ендогенних рецепторів ендопептидаз зі зміненою націленістю. Далі варто розуміти, що такі генетично модифіковані або сконструйовані за допомогою рекомбінантної технології клітини можуть експресувати екзогенний SNAP-25 й один або декілька екзогенних рецепторів ендопептидаз зі зміненою націленістю під контролем конститутивного тканиноспецифічного й специфічного для клітини або індукційного промоторного елемента, енансерного елемента або їх обох. Варто розуміти, що будь-яка клітина є придатною в тому випадку, якщо її можна генетично модифікувати або застосовувати до неї рекомбінантні технології з метою експресії екзогенного SNAP-25 та/або одного або більше екзогенних рецепторів ендопептидаз зі

зміненою націленістю, і ця клітина здатна піддаватися активності ендопептидаз зі зміненою націленістю.

[0150] Способи, придатні для введення в клітину екзогенних молекул полінуклеотидів, що кодують компоненти, необхідні для функціонування повного клітинного механізму, за допомогою якого ендопептидази зі зміненою націленістю протеолітично розщеплюють субстрат SNAP-25, такі як, наприклад, SNAP-25, ORL1, DOR, KOR або MOR, що включають, без обмеження, хімічні способи, наприклад, опосередковуваний фосфатом кальцію, опосередковуваний діетиламіноетилдекстраном (ДЕАЕ), опосередковуваний ліпідами, опосередковуваний поліетиленіміном (ПЕІ), опосередковуваний полілізином й опосередковуваний полібренном; фізично-опосередкованими способами доставки, такими як, наприклад, біолістична доставка частки, мікроін'єкція, злиття протопластів й електропорація; і опосередковуваними вірусом способами доставки, такими як, наприклад, ретровірус-опосередкована трансфекція, див., 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 в дану заявку за допомогою посилання. Фахівці в даній галузі техніки розуміють, що вибір певного способу введення молекули полінуклеотида в клітину частково залежить від того, стабільно або тимчасово клітина буде містити компонент, необхідний для функціонування всього клітинного механізму, за допомогою якого ендопептидази зі зміненою націленістю протеолітично розщеплюють субстрат SNAP-25. Нижче наведені необмежуючі приклади молекул полінуклеотидів, що кодують компоненти, необхідні для функціонування всього клітинного механізму, за допомогою якого ендопептидази зі зміненою націленістю протеолітично розщеплюють субстрат SNAP-25: молекули полінуклеотида ORL1 SEQ ID NO: 61 або SEQ ID NO: 62; молекули полінуклеотида DOR SEQ ID NO: 63 або SEQ ID NO: 64; молекули полінуклеотида KOR SEQ ID NO: 65 або SEQ ID NO: 66; і молекули полінуклеотида MOR SEQ ID NO: 67; молекули полінуклеотида рецептора галаніну 1 SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 або SEQ ID NO: 143, молекули полінуклеотида рецептора галаніну 2 SEQ ID NO: 144 або молекули полінуклеотида рецептора галаніну 3 SEQ ID NO: 145, або молекули полінуклеотида SNAP-25 SEQ ID NO: 68 або SEQ ID NO: 69.

[0151] Хімічно опосередковувані способи доставки добре відомі фахівцям у даній галузі техніки й 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 в дану заявку за допомогою посилання. Такі хімічно опосередковувані способи доставки можна виконати за допомогою стандартних процедур, які доступні комерційно, див., наприклад, Набір для Трансфекції CellPfect (Amersham Biosciences, Піскетейуей, Нью-Джерсі); Набір для Трансфекції клітин Ссавців, Фосфат кальцію й декстран ДЕАЕ (Stratagene, Inc., Ла-Хойя, Каліфорнія); Реактив для Трансфекції Lipofectamine™ (Invitrogen, Inc., Карлсбад, Каліфорнія); Набір для Трансфекції ExGen 500 (Fermentas, Inc., Ганновер, Меріленд), Набори для Трансфекції SuperFect й Effectene (Qiagen, Inc., Валенсія, Каліфорнія).

[0152] Фізично опосередковувані способи доставки добре відомі фахівцям у даній галузі техніки й 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 Biolistic 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 Field-Mediated Permeabilization, Gene Transfer, and Expression*, 33(2) *Methods* 126-135 (2004); і Oliver Greschet al., *New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells*, 33(2) *Methods* 151-163 (2004), кожна з яких включена в дану заявку за допомогою посилання.

[0153] Опосередковувані вірусом способи доставки добре відомі фахівцям у даній галузі техніки й описані наприклад, в Chooi M. Lai et al., *Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors*, 21(12) *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 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 № 5464758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, Methods for Regulating Gene Expression, патент США № 5814618; David S. Hogness, Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor 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 № 5364791; Elisabetta Vegeto et al., Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy, патент США № 5874534, вміст кожного з яких включено в дану заявку за допомогою посилання. Такі опосередковувані вірусом способи доставки можна здійснити за допомогою стандартних процедур, які доступні комерційно, див., наприклад, Аденовірусна Експресійна Система ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Карлсбад, Каліфорнія) і Посібник з Експлуатації Аденовірусної Експресійної Системи ViraPower™ 25-0543 версія А, Invitrogen, Inc., (Jul. 15, 2002); Аденовірусна Експресійна Система AdEasy™ (Stratagene, Inc., Ла-Хойя, Каліфорнія) і Посібник з Експлуатації Аденовірусної Експресійної Системи AdEasy™ 064004f, Stratagene, Inc. Крім того, такі вірусні системи доставки можна приготувати за допомогою стандартних процедур, які доступні комерційно, див., наприклад, Системи із забезпеченням експресії Генів BD™ Tet-Off й Tet-On (BD Biosciences-Clontech, Пало-Альто, Каліфорнія) і Керівництво Користувача до Системи із забезпеченням експресії Генів BD™ Tet-Off й Tet-On, PT3001-1, BD Biosciences Clontech, (14 березня 2003 р.), Система GeneSwitch™ (Invitrogen, Inc., Карлсбад, Каліфорнія) і Регульована Міфепристоном Експресійна Система GeneSwitch™ для Клітин Ссавців, версія D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (4 листопада 2002 р.); Лентивірусна Експресійна Система ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Карлсбад, Каліфорнія) і Посібник з Експлуатації Лентивірусної Експресійної Системи ViraPower™ 25-0501, версія Е, Invitrogen, Inc., (8 грудня 2003 р.); і Ретровірусна Індуцибельна Система Експресії для клітин Ссавців Complete Control® (Stratagene, Ла-Хойя, Каліфорнія) і Посібник з Експлуатації до Ретровірусної Індуцибельної Системи Експресії для клітин Ссавців Complete Control®, 064005e.

[0154] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, тимчасово містять полінуклеотидну молекулу, що кодує компонент, необхідний для функціонування всього клітинного механізму, за допомогою якого ендопептидази зі зміненою націленістю протеолітично розщеплюють субстрат SNAP-25. Відповідно до іншого варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, тимчасово містять полінуклеотидну молекулу, що кодує ряд компонентів, необхідних для функціонування всього клітинного механізму, за допомогою якого ендопептидази зі зміненою націленістю протеолітично розщеплюють субстрат SNAP-25. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, тимчасово містять полінуклеотидну молекулу, що кодує ORL1, DOR, KOR, MOR або SNAP-25. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, тимчасово містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 61 або SEQ ID NO: 62, що кодує ORL1. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, тимчасово містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 63 або SEQ ID NO: 64, що кодує DOR. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, тимчасово містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 65 або SEQ ID NO: 66, що кодує KOR. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, тимчасово містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 67, що кодує MOR.

[0155] Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, тимчасово містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 або SEQ ID NO: 143, що кодує рецептор галаніну 1. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, тимчасово містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 144, що кодує рецептор галаніну 2. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, тимчасово містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 145, що кодує рецептор галаніну 3. Відповідно до подальших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до

активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, тимчасово містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 68 або SEQ ID NO: 69, що кодує SNAP-25.

[0156] Відповідно до іншого варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, стабільно містять полінуклеотидну молекулу, що кодує компонент, необхідний для функціонування всього клітинного механізму, за допомогою якого ендопептидази зі зміненою націленістю протеолітично розщеплюють субстрат SNAP-25. Відповідно до іншого варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, стабільно містять полінуклеотидну молекулу, що кодує ряд компонентів, необхідних для функціонування всього клітинного механізму, за допомогою якого ендопептидази зі зміненою націленістю протеолітично розщеплюють субстрат SNAP-25. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, стабільно містять полінуклеотидну молекулу, що кодує ORL1, DOR, KOR, MOR або SNAP-25. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, стабільно містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 61 або SEQ ID NO: 62, що кодує ORL1. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, стабільно містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 63 або SEQ ID NO: 64, що кодує DOR. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, стабільно містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 65 або SEQ ID NO: 66, що кодує KOR. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, стабільно містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 67, що кодує MOR.

[0157] Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, стабільно містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 або SEQ ID NO: 143, що кодує рецептор галаніну 1. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, стабільно містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 144, що кодує рецептор галаніну 2. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, стабільно містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 145, що кодує рецептор галаніну 3. Відповідно до подальших аспектів даного варіанта реалізації, клітини зі стабільної клітинної лінії, чутливої до активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, стабільно містять полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 68 або SEQ ID NO: 69, що кодує SNAP-25.

[0158] Як відзначалося вище, екзогенний компонент, необхідний для функціонування повного клітинного механізму, за допомогою якого ендопептидаза зі зміненою націленістю протеолітично розщеплює субстрати SNAP-25, наприклад, такі як SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галаніну 1, рецептор галаніну 2 або рецептор галаніну 3, описані в даній заявці, може бути введений у клітину. Можна використовувати будь-який або всі способи, використовувані для введення такого екзогенного компонента за допомогою засобу доставки в клітинні популяції, за умови, що даний спосіб тимчасово вводить екзогенний компонент, описаний у даній заявці щонайменше в 50 % клітин даної клітинної популяції. Таким чином аспекти цього варіанта реалізації можуть включати популяції клітин, у яких, наприклад, щонайменше 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, або 90 % даної популяції клітин тимчасово містять екзогенний компонент, необхідний для функціонування повного клітинного механізму, за допомогою якого ендопептидаза зі зміненою націленістю протеолітично розщеплює субстрати SNAP-25, такі як, наприклад, SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галаніну 1, рецептор галаніну 2 або рецептор галаніну 3, описані в даному описі. У даній заявці, термін "засіб доставки" відноситься до будь-якої молекули, яка дозволяє або збільшує поглинання клітиною ковалентно зв'язаного, не ковалентного зв'язаного, або іншим способом асоційованого із цією молекулою поліпептиду. Таким чином термін "засіб доставки" охоплює, без обмеження, білки, пептиди, пептидоміметики, маленькі молекули, молекули полінуклеотидів, ліпосоми, ліпіди, віруси, ретровіруси й клітини, які, без обмежень, транспортують ковалентно або не ковалентно зв'язані молекули до клітинної мембрани, цитоплазми клітини або до ядра. Далі припускається, що термін "засіб доставки" охоплює молекули, які поглинаються клітиною згідно будь-якого механізму, включаючи засоби доставки, які функціонують через ендоцитоз, опосередковуваний рецептором, і які незалежні від ендоцитозу, опосередкованого рецептором.

[0159] Засіб доставки може також бути препаратом, що забезпечує або збільшує поглинання клітиною ковалентно зв'язаного компонента, такого як SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галаніну 1, рецептор галаніну 2 або рецептор галаніну 3, наприклад, за рахунок хімічного ковалентного зв'язування або створених генетично гібридних білків. Способи, у яких засоби доставки ковалентно зв'язуються й способи використання таких засобів описані, наприклад, в Steven F. Dowdy, Protein Transduction System and Methods of Use Thereof, міжнародна публікація WO 00/34308; Gérard 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, вміст кожного з яких включено в дану заявку за допомогою посилання.

[0160] Засіб доставки може також являти собою засіб, що забезпечує або збільшує поглинання клітиною нековалентно зв'язаного компонента, такого як SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галаніну 1, рецептор галаніну 2 або рецептор галаніну 3. Засоби, які працюють під час відсутності ковалентного зв'язку, і способи використання таких засобів, описані, наприклад, в Gilles Divita et al, Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use, патент США № 6,841,535; 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 заявки на патент США № 2004/0209797, вміст кожного з яких включено в дану заявку за допомогою посилання. Такі засоби доставки пептидів можна приготувати й використовувати згідно стандартних процедур, які доступні комерційно, див., наприклад, Реактив CHARIOT™ (Active Motif, Карлсбад, Каліфорнія); Реактив BIO-PORTER® (Gene Therapy Systems, Inc., Сан Дієго, Каліфорнія), Реактив для Доставка Білка BIO TREK™ (Stratagene, Ла-Хойя, Каліфорнія), і Реактив для Білкової Трансфекції PRO-JECT™ (Pierce Biotechnology Inc., Рокфорд, Іллінойс).

[0161] Частина аспектів даної заявки включає зразок, що містить ендопептидази зі зміненою націленістю. У даній заявці термін "зразок, що містить ендопептидази зі зміненою націленістю" відноситься до будь-якого біологічного матеріалу, що містить або потенційно містить активні ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до способу, описаного в даній заявці, можна тестувати різні зразки, включаючи, без обмеження, очищені, частково очищені або неочищені ендопептидази зі зміненою націленістю; рекомбінантні ендопептидази зі зміненою націленістю, що містять один або два ланцюги, із природною послідовністю або послідовністю, що не зустрічається в природі; рекомбінантні ендопептидази зі зміненою націленістю, які мають модифіковану протеазну націленість; рекомбінантні ендопептидази зі зміненою націленістю, що мають змінену клітинну націленість; масові зразки ендопептидаз зі зміненою націленістю; склади на основі ендопептидаз зі зміненою націленістю; і клітини або неопрацьовані, фракціоновані або частково очищені клітинні лізати, джерелами яких є, наприклад, бактерії, дріжджі, комахи або ссавці; кров, плазма або сироватка; сирі, частково приготовані, приготовані або оброблені харчові продукти; напої; корми для тварин; зразки ґрунту; зразки води; ставкові донні відкладення; лосьйони; косметика; і клінічні препарати. Варто розуміти, що термін "зразок" включає зразки тканин, включаючи, без обмеження, зразки тканин ссавців, зразки тканин домашньої худоби, такі як зразки тканин овець, корів і свиней; зразки тканин приматів; і зразки тканин людини. Такі зразки включають, без обмеження, шлунково-кишкові зразки, такі як шлунково-кишкові зразки, взяті у дітей, і зразки тканин, одержані з рани. Як необмежуючі приклади, спосіб детектування пікомолярних кількостей активності ендопептидаз зі зміненою націленістю може бути придатний для визначення присутності або активності ендопептидаз зі

зміненою націленістю в зразках харчових продуктів або напоїв; для аналізу зразків, взятих у людини або тварин, наприклад, що контактували з ендопептидазами зі зміненою націленістю або що демонструють один або декілька симптомів ботулізму; для контролю за активністю при виробництві й очищенні масових зразків ендопептидаз зі зміненою націленістю; для аналізу складу на основі ендопептидаз с зміненою націленістю, що використовується для фармакологічних або косметичних цілей; або для аналізу сироватки крові суб'єкта на присутність або відсутність нейтралізуючих антитіл проти ендопептидази зі зміненою націленістю.

[0162] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, зразком, що містить ендопептидази зі зміненою націленістю, є зразок, що містить будь-які кількості ендопептидаз зі зміненою націленістю. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, зразок, що містить ендопептидази зі зміненою націленістю, 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 ендопептидаз зі зміненою націленістю. Відповідно до інших аспектів даного варіанта реалізації, зразок, що містить ендопептидази зі зміненою націленістю, містить приблизно 1 мкМ або менше, приблизно 100 нМ або менше, приблизно 10 нМ або менше, приблизно 1 нМ або менше, приблизно 100 нМ або менше, приблизно 10 нМ або менше, приблизно 1 нМ або менше ендопептидаз зі зміненою націленістю.

[0163] Частина аспектів даної заявки включає виділення з обробленої клітини компонента SNAP-25, що містить SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. У даній заявці термін "компонент SNAP-25, що містить SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A" відноситься до клітинного компонента, що містить продукт розщеплення SNAP-25. Припускається, що придатним є будь-який спосіб, що підходить для збагачення або виділення компонента SNAP-25, включаючи, без обмеження, протоколи для лізування клітин, протоколи для очищення на спін-колонках, імунопреципітацію, афінне очищення й хроматографію білків.

[0164] Частина аспектів даної заявки включає анти-SNAP-25 антитіла, іммобілізовані на твердофазній підкладці. У даній заявці термін "твердофазна підкладка" є синонімом терміна "тверда фаза" і відноситься до будь-якої матриці, яку можна використовувати для іммобілізації анти-SNAP-25 антитіл, описаних у даній заявці. Необмежуючі приклади твердофазних підкладок включають, наприклад, пробірку; чашку; колонку; палички або "тест-смужки"; магнітні частки, кульки або інше хроматографічне середовище сферичної або нитчастої форми, таке як, наприклад, агароза, сефароза, силікагель або пластик; і листи або мембрани, такі як, наприклад, нітроцелюлоза або полівініліденфторид (ПВДФ). Твердофазну підкладку можна сконструювати з використанням різноманітних матеріалів, таких як, наприклад, скло, вуглець, полістирол, полівінілхлорид, поліпропілен, поліетилен, декстран, нейлон, діазоцелюлоза або крохмаль. Обрана твердофазна підкладка може мати фізичні властивості, які дозволяють легко відокремлювати її від розчинного або незв'язаного матеріалу й у цілому дозволяють відокремлювати або іншим способом видаляти (наприклад, за допомогою відмивання, фільтрації, центрифугування й т.д.) незв'язані матеріали, такі як, наприклад, надлишкові реактиви, побічні продукти реакції або розчинники, від компонента тесту, пов'язаного із твердофазною підкладкою. Необмежуючі приклади виготовлення й використання твердофазних підкладок описані, наприклад, в Molecular Cloning, A Laboratory Manual, див. вище, (2001); і Current Protocols in Molecular Biology, див. вище, (2004), кожен з яких включений у дану заявку за допомогою посилання.

[0165] Частина аспектів даної заявки включає детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, і продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Припускається, що для здійснення на практиці аспектів описаного імунологічного способу можна використовувати будь-яку систему детектування за умови, що співвідношення сигналу до шуму дозволяє в статистично значимому ступені відрізнити сигнал комплексу антитіло-антиген від фонового сигналу. Необмежуючі приклади імунологічних систем детектування включають імуноблот-аналіз, такий як Вестерн-блотінг і дот-блотінг, аналіз за допомогою імунопреципітації, твердофазний імуоферментний аналіз (твердофазний ІФА) і "сендвіч"-метод твердофазного ІФА. Детектування сигналу можна досягти за допомогою використання авторадіографії з одержанням зображення або формуванням зображення на люмінесцентному фосфорному покритті (AU), хемілюмінесценції (CL), електрохемілюмінесценції (ECL), біоломінесценції (BL), флуоресценції,

резонансного перенесення енергії, лінійної поляризації, колориметричних методів або проточної цитометрії (FC). Описи імунологічних систем детектування наведені, 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. Fahrnich, 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), кожен з яких повністю включений у дану заявку за допомогою посилання.

[0166] "Сендвіч"-метод твердофазного ІФА (або "сендвіч"-метод імунологічного аналізу) являє собою метод, оснований на двох антитілах, які зв'язуються з різними епітопами на антигені. Імобілізоване, що має високу специфічність зв'язування стосовно антигену, що цікавить, пов'язане із твердою поверхнею. Потім додають антиген, після чого додають друге антитіло, назване детектуючим антитілом. Детектуюче антитіло зв'язується з епітопом антигену, відмінним від епітопа, з яким зв'язується іммобілізоване антитіло. Таким чином, антиген і два антитіла, між якими він знаходиться, являють собою "сендвіч". Афіність зв'язування антитіл з антигеном зазвичай є головним чинником, який визначає чутливість імунологічного аналізу. Зі збільшенням концентрації антигену збільшується й кількість детектуючих антитіл, що призводить до збільшення вимірюваної відповіді. Для кількісного визначення ступеню зв'язування можна використовувати різні репортерні системи, такі як, наприклад, фермент, зв'язаний із вторинними антитілами, і субстрат-репортер, де ферментативна реакція формує показання детектованого сигналу. Вироблений сигнал є пропорційним кількості антигену-мішені, який присутній у зразку. Субстрат-репортер, що використовується для вимірювання подій зв'язування, визначає спосіб детектування. Спектрофотометричний сканер планшетів використовується для колориметричного детектування. Були розроблені хемілюмінесцентні й електрохемілюмінесцентні субстрати, які забезпечують подальше посилення сигналу, і одержання зображення від таких субстратів можна проводити на люмінесцентному сканері. Репортер також може бути пристосований для флуоресцентного сканера таким чином, що ферментативний етап тесту замінений флуорофором, і вимірювання сигналу можна проводити, використовуючи флуоресцентний сканер. Реагенти й протоколи, необхідні для проведення "сендвіч"-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілюмінесценцією, комерційно доступні, включаючи, без винятку, платформу MSD для електрохемілюмінесцентного "сендвіч"-методу твердофазного ІФА (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд).

[0167] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіла, які вибірково зв'язуються з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, і продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, можна проводити шляхом аналізу з використанням імуно-блотінга, аналізу з використанням імунопреципітації, твердофазного ІФА або "сендвіч"-методу твердофазного ІФА. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації, детектування проводять за допомогою аналізів AU, CL, ECL або BL з використанням імуно-блотінга, аналізів AU, CL, ECL, BL або FC з використанням імунопреципітації, аналізів AU, CL, ECL, BL або FC з використанням твердофазного ІФА або аналізів AU, CL, ECL, BL або FC з використанням "сендвіч"-методу твердофазного ІФА.

[0168] Аспекти даного опису можна здійснювати в одноканальному або багатоканальному режимі. Імунологічний спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, здійснюваний в одноканальному режимі, детектує лише присутність комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіла й продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Імунологічний спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, здійснюваний у багатоканальному режимі, одночасно детектує присутність двох або більше комплексів антитіло-антиген; один із яких являє собою комплекс антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіла й продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; а інший(і) з яких являє собою комплекс антитіло-антиген, що містить другий, третій, четвертий і т. д. білок, відмінний від вищезгаданого. Другий білок може використовуватися, наприклад, як внутрішній контроль для мінімізації мінливості між пробами шляхом нормування детектованої кількості комплексу антитіло/антиген α-SNAP-25/SNAP-25 відносно кількості комплексу антитіло/антиген,

детектованого для другого білка. У зв'язку із цим, як другий білок зазвичай використовують білок, конститутивно експресований у клітині, такий як білок домашнього господарства. Необмежуючі приклади підходящого другого білка включають, наприклад, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу (GAPDH), синтаксин, цитокіни. Способи проведення імунологічних тестів у багатоканальному режимі 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), кожен з яких повністю включений у дану заявку за допомогою посилання.

[0169] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, імунологічний спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю проводиться в одноканальному режимі шляхом детектування присутності лише комплексу антитіло-антиген, який включає анти-SNAP-25 антитіла й продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A. Відповідно до іншого варіанта реалізації, імунологічний спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю проводиться в багатоканальному режимі шляхом одночасного детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіла й продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, і щонайменше ще одного комплексу антитіло-антиген, що містить білок, відмінний від SNAP-25, такий як, наприклад, GAPDH або синтаксин.

[0170] Відповідно до частини аспектів даної заявки запропонований спосіб визначення імунної резистентності відносно ендопептидази зі зміненою націленістю. У даній заявці термін "імунна резистентність відносно ендопептидази зі зміненою націленістю" означає ссавця, який не демонструє повну відповідь на терапію за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю або демонструє знижений позитивний ефект від терапії за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю, оскільки імунна відповідь даної тварини, прямо або побічно, знижує ефективність такої терапії. Як необмежуючий приклад зниженої ефективності можна навести присутність у ссавця щонайменше одного виду нейтралізуючих антитіл проти ендопептидази зі зміненою націленістю, які зв'язуються з ендопептидазою зі зміненою націленістю таким чином, що специфічність або активність цієї ендопептидази зі зміненою націленістю знижується або попереджується. У даній заявці термін "терапія за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю" означає лікування, допомогу, виліковування, видужання, реабілітацію або будь-які інші міри протидії чому-небудь небажаному у ссавців, які потребують нейромодуляції з використанням ендопептидази зі зміненою націленістю, або введення ссавцеві однієї або декількох контрольованих доз лікарського засобу, препарату або суміші ендопептидази зі зміненою націленістю, що має лікарський, терапевтичний, лікувальний, косметичний, такий, що виліковує або інший корисний ефект. Терапія за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю включає, без обмеження, використання будь-якого її природного або модифікованого фрагмента, у будь-якому складі, у комбінації з будь-яким носієм або активним інгредієнтом і введення будь-яким шляхом.

[0171] Відповідно до частини аспектів даної заявки запропонований тестувальний зразок, одержаний з організму ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл проти ендопептидази зі зміненою націленістю. У даній заявці термін "тестувальний зразок" відноситься до будь-якого біологічного матеріалу, що містить або потенційно містить щонайменше одне антитіло проти ендопептидази зі зміненою націленістю. Антитіло проти ендопептидази зі зміненою націленістю може бути нейтралізуючим антитілом проти ендопептидази зі зміненою націленістю або не нейтралізуючим антитілом проти ендопептидази зі зміненою націленістю. У даній заявці термін "нейтралізуючі антитіла проти ендопептидази зі зміненою націленістю" означає будь-яке антитіло проти ендопептидази зі зміненою націленістю, яке при фізіологічних умовах зв'язується з ділянкою ендопептидази зі зміненою націленістю таким чином, що знижує або запобігає ефекту ендопептидази зі зміненою націленістю в терапії за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю. У даній заявці термін "не нейтралізуючі антитіла проти ендопептидази зі зміненою націленістю" означає будь-яке антитіло проти ендопептидази зі зміненою націленістю, яке при фізіологічних умовах зв'язується з ділянкою ендопептидази зі зміненою націленістю, але не запобігає ефекту ендопептидази зі зміненою націленістю в терапії за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю. Припускається, що всі без винятку зразки, які можуть містити антитіла проти ендопептидази зі зміненою

націленістю, можна використовувати в даному способі, включаючи, без обмеження, кров, плазму, сироватку й лімфатичну рідину. Крім того, всі без винятку організми, здатні виробляти антитіла проти ендopeптидази зі зміненою націленістю, можуть служити джерелами зразків, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: птахи та ссавці, включаючи мишей, пацюків, кіз, овець, коней, ослів, корів, приматів і людину. Необмежуючі приклади конкретних протоколів для збирання крові й приготування сироватки 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). Ці протоколи являють собою звичайні процедури, добре відомі фахівцям у даній галузі техніки й з відповідних програм навчання. Тестувальний зразок можна одержати з організму до контакту з ендopeптидазами зі зміненою націленістю, після однократної обробки ендopeптидазами зі зміненою націленістю, після багаторазових обробок ендopeптидазами зі зміненою націленістю, перед настанням резистентності до терапії за допомогою ендopeптидаз зі зміненою націленістю або після настання резистентності до терапії з використанням ендopeптидаз зі зміненою націленістю.

[0172] Відповідно до частини аспектів даної заявки запропонований контрольний зразок. У даній заявці термін "контрольний зразок" означає будь-який зразок, для якого відома присутність або відсутність тестувального зразка, і включає зразки як негативного, так і позитивного контролю. Відносно нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю, зразок негативного контролю можна одержати від суб'єкта, який ніколи не контактував з ендopeптидазою зі зміненою націленістю, і він може включати, без обмеження, зразок від того ж суб'єкта, у якого беруть тестувальний зразок, до проведення терапії за допомогою ендopeптидази зі зміненою націленістю; зразок, взятий від іншого суб'єкта, який ніколи не контактував з ендopeптидазою зі зміненою націленістю; об'єднаний зразок, взятий від декількох різних суб'єктів, які ніколи не контактували з BoNT/A. Відносно нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю, зразок позитивного контролю можна одержати від суб'єкта, який демонструє імунну резистентність до ендopeптидази зі зміненою націленістю, і він включає, без обмеження, суб'єкта, який демонструє позитивний результат у тесті для пацієнтів; суб'єкта, який демонструє позитивний результат у біотесті *in vivo*; і суб'єкта, який демонструє підвищений імунітет, наприклад, суб'єкта, вакцинованого ендopeптидазою зі зміненою націленістю.

[0173] Окрім того, припускається, що антитіла проти ендopeптидази зі зміненою націленістю можна очистити зі зразка. Антитіла проти ендopeптидази зі зміненою націленістю можна очистити зі зразка, використовуючи велику кількість процедур, включаючи, без обмеження, хроматографію з білком A/G й афінну хроматографію. Необмежуючі приклади конкретних протоколів для очищення антитіл зі 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*, див. вище, (2001), які включені в дану заявку за допомогою посилання. Крім того, приклади, що не обмежують способів очищення антитіл, як і детально охарактеризованих реагентів, умов і протоколів, можна легко одержати від комерційних постачальників, які включають, без обмеження, Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Іллінойс; і Zymed Laboratories, Inc., Південний Сан-Франциско, Каліфорнія. Ці протоколи й стандартні процедури добре відомі фахівцям у даній галузі техніки.

[0174] Таким чином, відповідно до одного варіанта реалізації, зразок включає кров. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, зразок включає кров мишей, кров пацюків, кров кіз, кров овець, кров коней, кров ослів, кров корів, кров приматів або людську кров. Відповідно до іншого варіанта реалізації, зразок включає плазму. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, тестувальний зразок включає плазму мишей, плазму пацюків, плазму кіз, плазму овець, плазму коней, плазму ослів, плазму корів, плазму приматів або людську плазму. Відповідно до іншого варіанта реалізації, зразок включає сироватку. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, зразок включає сироватку мишей, сироватку пацюків, сироватку кіз, сироватку овець, сироватку коней, сироватку ослів, сироватку корів, сироватку приматів і людську сироватку. Відповідно до іншого варіанта реалізації, зразок включає лімфатичну рідину. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, зразок включає лімфатичну рідину мишей, лімфатичну рідину пацюків, лімфатичну рідину кіз, лімфатичну рідину овець, лімфатичну рідину коней, лімфатичну рідину ослів, лімфатичну рідину корів, лімфатичну рідину приматів або лімфатичну рідину людини. Згідно ще одного варіанту реалізації, зразок являє собою тестувальний зразок. Згідно ще одного варіанту реалізації, зразок являє собою контрольний зразок. Відповідно до аспектів даного варіанта реалізації,

контрольний зразок являє собою зразок негативного контролю або зразок позитивного контролю.

[0175] Відповідно до частини аспектів даної заявки запропоноване порівняння кількості SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, детектованого на етапі (г), з кількістю SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, що детектований на етапі (д). Відповідно до одного варіанта реалізації, кількість продукту розщеплення SNAP-25 у тестувальному зразку більше, ніж кількість продукту розщеплення SNAP-25 у контрольному зразку. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, більша кількість продукту розщеплення SNAP-25 у тестувальному зразку в порівнянні зі зразком позитивного контролю свідчить про зниження або відсутність у ссавця імунної резистентності відносно ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, рівна кількість продукту розщеплення SNAP-25 у тестувальному зразку в порівнянні зі зразком негативного контролю свідчить про зниження або відсутність у ссавця імунної резистентності відносно ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до іншого варіанта реалізації, кількість продукту розщеплення SNAP-25 у тестувальному зразку менше, ніж кількість продукту розщеплення SNAP-25 у контрольному зразку. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, менша або рівна кількість продукту розщеплення SNAP-25 у тестувальному зразку в порівнянні зі зразком позитивного контролю свідчить про підвищення або присутність у ссавця імунної резистентності стосовно ендопептидази зі зміненою націленістю. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, менша кількість продукту розщеплення SNAP-25 у тестувальному зразку в порівнянні зі зразком негативного контролю свідчить про підвищення або присутність у ссавця імунної резистентності відносно ендопептидази зі зміненою націленістю.

[0176] Припускається, що всі без винятку умови тесту, що підходять для детектування присутності в зразку нейтралізуючих антитіл проти ендопептидази зі зміненою націленістю, придатні для способів, описаних у даній заявці, такі як, наприклад, лінійні умови тесту й нелінійні умови тесту. Відповідно до одного варіанта реалізації, умови тесту є лінійними. Відповідно до одного аспекту даного варіанта реалізації, присутня у тесті кількість ендопептидази зі зміненою націленістю є надлишковою. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, присутня у тесті кількість ендопептидази зі зміненою націленістю лімітує швидкість реакції. Відповідно до іншого аспекту даного варіанта реалізації, присутня у тесті кількість тестувальних зразків лімітує швидкість реакції.

[0177] Аспекти даної заявки можна також описати таким чином:

1. Спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, що включає етапи а) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії зразком, що містить ендопептидазу зі зміненою націленістю, причому клітина зі стабільної клітинної лінії чутлива до активності ендопептидази зі зміненою націленістю; б) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; в) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, причому анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25; і г) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25; при цьому детектування з використанням комплексу антитіло-антиген є показником активності ендопептидази зі зміненою націленістю.

2. Спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, що включає етапи а) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії зразком, що містить ендопептидазу зі зміненою націленістю, причому клітина зі стабільної клітинної лінії є чутливою до активності ендопептидази зі зміненою націленістю; б) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; в) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, іммобілізованим на твердофазній підкладці, причому анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25; і г) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25; при цьому детектування з використанням комплексу антитіло-антиген є показником активності ендопептидази зі зміненою націленістю.

3. Спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, що включає етапи а) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії зразком, що містить ендопептидазу зі зміненою

націленістю, причому клітина зі стабільної клітинної лінії чутлива до активності ендопептидази зі зміненою націленістю; б) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; в) іммобілізації компонента SNAP-25 на твердофазній підкладці; г) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, причому анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, з продукту розщеплення SNAP-25; і д) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25; при цьому детектування з використанням комплексу антитіло-антиген є показником активності ендопептидази зі зміненою націленістю.

4. Спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, який включає етапи а) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії зразком, що містить ендопептидазу зі зміненою націленістю, причому клітина зі стабільної клітинної лінії має здатність до поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю; б) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; в) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, причому анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25; і г) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25; при цьому детектування з використанням комплексу антитіло-антиген є показником активності ендопептидази зі зміненою націленістю.

5. Спосіб детектування активності ендопептидази зі зміненою націленістю, що включає етапи а) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії зразком, що містить ендопептидазу зі зміненою націленістю, причому клітина зі стабільної клітинної лінії має здатність до поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю; б) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; в) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, іммобілізованим на твердофазній підкладці, причому анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25; і г) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25; при цьому детектування з використанням комплексу антитіло-антиген є показником активності ендопептидази зі зміненою націленістю.

6. Спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, що включає етапи а) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії зразком, що містить ендопептидазу зі зміненою націленістю, причому клітина зі стабільної клітинної лінії має здатність до поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю; б) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; в) іммобілізації компонента SNAP-25 на твердофазній підкладці; г) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, причому анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25; і д) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25; при цьому детектування з використанням комплексу антитіло-антиген є показником активності ендопептидази зі зміненою націленістю.

7. Спосіб визначення імунної резистентності ссавців відносно ендопептидази зі зміненою націленістю, що включає етапи а) додавання ендопептидази зі зміненою націленістю до тестувального зразка, одержаного з ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл проти ендопептидази зі зміненою націленістю; б) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії тестувальним зразком, причому клітина зі стабільної клітинної лінії чутлива до активності ендопептидази зі зміненою націленістю; в) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; г) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, причому анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25; д) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й

продукт розщеплення SNAP-25; е) повторення етапів б-д зі зразком для негативного контролю замість тестувального зразка, причому зразок для негативного контролю містить ендopeптидазу зі зміненою націленістю й сироватку, відносно якої відомо, що вона не містить нейтралізуючі антитіла проти ендopeптидази зі зміненою націленістю; ж) порівняння кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі д, з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, при цьому детектування меншої кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі д, у порівнянні з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, свідчить про присутність нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю.

8. Спосіб визначення імунної резистентності ссавців відносно ендopeптидази зі зміненою націленістю, що включає етапи а) додавання ендopeптидази зі зміненою націленістю до тестувального зразка, одержаного із ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю; б) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії тестувальним зразком, причому клітина зі стабільної клітинної лінії чутлива до активності ендopeптидази зі зміненою націленістю; в) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; г) здійснення контакту SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, іммобілізованим на твердофазній підкладці, причому анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, з продукту розщеплення SNAP-25; д) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25; е) повторення етапів б-д зі зразком для негативного контролю замість тестувального зразка, причому зразок для негативного контролю містить ендopeптидазу зі зміненою націленістю й сироватку, стосовно якої відомо, що вона не містить нейтралізуючі антитіла проти ендopeптидази зі зміненою націленістю; ж) порівняння кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі д, з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, при цьому детектування меншої кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі д, у порівнянні з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, свідчить про присутність нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю.

9. Спосіб визначення імунної резистентності ссавців відносно ендopeптидази зі зміненою націленістю, що включає етапи а) додавання ендopeптидази зі зміненою націленістю до тестувального зразка, одержаного із ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю; б) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії тестувальним зразком, причому клітина зі стабільної клітинної лінії чутлива до активності ендopeптидази зі зміненою націленістю; в) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; г) іммобілізації компонента SNAP-25 на твердофазній підкладці; д) здійснення контакту SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, причому анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25; е) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25; ж) повторення етапів б-і зі зразком для негативного контролю замість тестувального зразка, причому зразок для негативного контролю містить ендopeптидазу зі зміненою націленістю й сироватку, стосовно якої відомо, що вона не містить нейтралізуючі антитіла проти ендopeптидази зі зміненою націленістю; з) порівняння кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі ж, при цьому детектування меншої кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, у порівнянні з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі ж, свідчить про присутність нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю.

10. Спосіб визначення імунної резистентності ссавців відносно ендopeптидази зі зміненою націленістю, що включає етапи а) додавання ендopeптидази зі зміненою націленістю до тестувального зразка, одержаного із ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю; б) обробки клітини із стабільної клітинної лінії тестувальним зразком, причому клітина із стабільної клітинної лінії має здатність до поглинання ендopeптидази зі зміненою націленістю; в) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; г) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, причому анти-SNAP-25

антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25; д) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25; е) повторення етапів б-д зі зразком для негативного контролю замість тестувального зразка, причому зразок для негативного контролю містить ендopeптидазу зі зміненою націленістю й сироватку, стосовно якої відомо, що вона не містить нейтралізуючі антитіла проти ендopeптидази зі зміненою націленістю; ж) порівняння кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі д, з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, при цьому детектування меншої кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі д, у порівнянні з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, свідчить про присутність нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю.

11. Спосіб визначення імунної резистентності ссавців відносно ендopeптидази зі зміненою націленістю, що включає етапи а) додавання ендopeптидази зі зміненою націленістю до тестувального зразка, одержаного із ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю; б) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії тестувальним зразком, причому клітина зі стабільної клітинної лінії має здатність до поглинання ендopeптидази зі зміненою націленістю; в) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; г) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, іммобілізованим на твердофазній підкладці, причому анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25; д) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25; е) повторення етапів б-д зі зразком для негативного контролю замість тестувального зразка, причому зразок для негативного контролю містить ендopeптидазу зі зміненою націленістю й сироватку, стосовно якої відомо, що вона не містить нейтралізуючі антитіла проти ендopeптидази зі зміненою націленістю; ж) порівняння кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі д, з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, при цьому детектування меншої кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі д, у порівнянні з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, свідчить про присутність нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю.

12. Спосіб визначення імунної резистентності ссавців відносно ендopeптидази зі зміненою націленістю, що включає етапи а) додавання ендopeптидази зі зміненою націленістю до тестувального зразка, одержаного із ссавця, тестованого на наявність або відсутність нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю; б) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії тестувальним зразком, причому клітина зі стабільної клітинної лінії має здатність до поглинання ендopeптидази зі зміненою націленістю; в) виділення з оброблених клітин компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A; г) іммобілізації компонента SNAP-25 на твердофазній підкладці; д) здійснення контакту компонента SNAP-25 з анти-SNAP-25 антитілом, причому анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом SNAP-25, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25; е) детектування присутності комплексу антитіло-антиген, що включає анти-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25; ж) повторення етапів б-і зі зразком для негативного контролю замість тестувального зразка, причому зразок для негативного контролю містить ендopeптидазу зі зміненою націленістю й сироватку, стосовно якої відомо, що вона не містить нейтралізуючі антитіла проти ендopeптидази зі зміненою націленістю; з) порівняння кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі ж, при цьому детектування меншої кількості комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі е, у порівнянні з кількістю комплексу антитіло-антиген, детектованого на етапі ж, свідчить про присутність нейтралізуючих антитіл проти ендopeптидази зі зміненою націленістю.

13. Спосіб за пп. 1-3 й 7-9, який відрізняється тим, що клітина чутлива до активності ендopeптидаз зі зміненою націленістю при концентрації ендopeптидази зі зміненою націленістю близько 500 nM або нижче, близько 400 nM або нижче, близько 300 nM або нижче, близько 200 nM або нижче, близько 100 nM або нижче.

14. Спосіб за пп. 4-6 й 10-12, який відрізняється тим, що клітина має здатність до поглинання ендopeптидаз зі зміненою націленістю при концентрації ендopeптидази зі зміненою націленістю

близько 500 нМ або нижче, близько 400 нМ або нижче, близько 300 нМ або нижче, близько 200 нМ або нижче, близько 100 нМ або нижче.

15. Спосіб за пп. 1-6, який відрізняється тим, що зразок містить приблизно 100 нг або менше, приблизно 10 нг або менше, приблизно 1 нг або менше, приблизно 100 фг або менше, приблизно 10 фг або менше або приблизно 1 фг або менше ендopeптидаз зі зміненою націленістю.

16. Спосіб за пп. 1-6, який відрізняється тим, що зразок містить приблизно 100 нМ або менше, приблизно 10 нМ або менше, приблизно 1 нМ або менше, приблизно 100 нМ або менше, приблизно 10 нМ або менше, приблизно 1 нМ або менше, приблизно 0,5 нМ або менше або приблизно 0,1 нМ або менше ендopeптидаз зі зміненою націленістю.

17. Спосіб за пп. 1-12, який відрізняється тим, що присутність комплексу антитіло-антиген детектують за допомогою аналізу з використанням імуноблотінгу, аналізу з використанням імунопреципітації, твердофазного ІФА або "сендвіч"-методу твердофазного ІФА.

18. Спосіб за пп. 1-12, який відрізняється тим, що спосіб характеризується співвідношенням сигналу до шуму для нижньої асимптоти, що складає щонайменше 3:1, щонайменше 5:1, щонайменше 10:1, щонайменше 20:1, щонайменше 50:1 або щонайменше 100:1.

19. Спосіб за пп. 1-12, який відрізняється тим, що спосіб характеризується співвідношенням сигналу до шуму для верхньої асимптоти, що складає 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. Спосіб за пп. 1-12, який відрізняється тим, що спосіб може детектувати активність EC_{50} , 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, по меншій мері 10 фг або щонайменше 5 фг ендopeптидаз зі зміненою націленістю.

21. Спосіб за пп. 1-12, який відрізняється тим, що спосіб може детектувати активність EC_{50} , наприклад, щонайменше 10 нМ, щонайменше 5 нМ, щонайменше 100 нМ, щонайменше 50 нМ, щонайменше 10 нМ, щонайменше 5 нМ, щонайменше 1 нМ, щонайменше 0,5 нМ або щонайменше 0,1 нМ ендopeптидаз зі зміненою націленістю.

22. Спосіб за пп. 1-12, який відрізняється тим, що спосіб характеризується МД, 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 ендopeптидази зі зміненою націленістю.

23. Спосіб за пп. 1-12, який відрізняється тим, що спосіб характеризується МД, наприклад, 100 нМ або менше, 90 нМ або менше, 80 нМ або менше, 70 нМ або менше, 60 нМ або менше, 50 нМ або менше, 40 нМ або менше, 30 нМ або менше, 20 нМ або менше або 10 нМ або менше ендopeптидази зі зміненою націленістю.

24. Спосіб за пп. 1-12, який відрізняється тим, що спосіб характеризується МКВ, 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 ендopeптидази зі зміненою націленістю.

25. Спосіб за пп. 1-12, який відрізняється тим, що спосіб характеризується МКВ, наприклад, 100 нМ або менше, 90 нМ або менше, 80 нМ або менше, 70 нМ або менше, 60 нМ або менше, 50 нМ або менше, 40 нМ або менше, 30 нМ або менше, 20 нМ або менше або 10 нМ або менше ендopeптидази зі зміненою націленістю.

26. Спосіб за пп. 1-12, який відрізняється тим, що спосіб може відрізнити повністю активну ендopeптидазу зі зміненою націленістю від частково активної ендopeптидази зі зміненою націленістю, 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 активної ендopeптидази зі зміненою націленістю А.

27. Спосіб за пп. 1-12, який відрізняється тим, що анти-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25.

28. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що анти-SNAP-25 антитіло характеризується константою швидкості асоціації для епітопа, на карбоксильному кінці якого відсутній глутамін розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25, що становить менше $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; і при цьому анти-SNAP-25 антитіло характеризується рівноважною константою дисоціації для епітопа, що становить менше 0,450 нМ.

29. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що ізольоване анти-SNAP-25 антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності, обрані із групи,

що складається з SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80 й SEQ ID NO: 82; і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності, обрані із групи, що складається з SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 й SEQ ID NO: 92.

5 30. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що ізольоване анти-SNAP-25 антитіло включає щонайменше CDR1 V_H з SEQ ID NO: 93, CDR1 V_H з SEQ ID NO: 94, CDR1 V_H з SEQ ID NO: 95, CDR1 V_H з SEQ ID NO: 118, CDR1 V_H з of SEQ ID NO: 119 або CDR1 V_H з of SEQ ID NO: 120.

32. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що ізольоване анти-SNAP-25 антитіло включає щонайменше CDR2 V_H з SEQ ID NO: 96, CDR2 V_H з SEQ ID NO: 97, CDR2 V_H з SEQ ID NO: 98, 10 CDR2 V_H з SEQ ID NO: 99, CDR2 V_H з SEQ ID NO: 121, CDR2 V_H з SEQ ID NO: 122 або CDR2 V_H з SEQ ID NO: 123.

33. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що ізольоване анти-SNAP-25 антитіло включає щонайменше CDR3 V_H з SEQ ID NO: 100, CDR3 V_H з SEQ ID NO: 101, CDR3 V_H з SEQ ID NO: 102 або CDR3 V_H з SEQ ID NO: 124.

15 34. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що ізольоване анти-SNAP-25 антитіло включає щонайменше CDR1 V_L з SEQ ID NO: 103, CDR1 V_L з SEQ ID NO: 104, CDR1 V_L з SEQ ID NO: 105, CDR1 V_L з SEQ ID NO: 106, CDR1 V_L з SEQ ID NO: 107, CDR1 V_L з SEQ ID NO: 125, CDR1 V_L з SEQ ID NO: 126, CDR1 V_L з SEQ ID NO: 127, CDR1 V_L з SEQ ID NO: 128 або CDR1 V_L з SEQ ID NO: 129.

20 35. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що ізольоване анти-SNAP-25 антитіло включає щонайменше CDR2 V_L з SEQ ID NO: 108, CDR2 V_L з SEQ ID NO: 109, CDR2 V_L з SEQ ID NO: 110, CDR2 V_L з SEQ ID NO: 111 або CDR2 V_L з SEQ ID NO: 112.

36. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що ізольоване анти-SNAP-25 антитіло включає щонайменше CDR3 V_L з SEQ ID NO: 113, CDR3 V_L з SEQ ID NO: 114, CDR3 V_L з SEQ ID NO: 115, 25 CDR3 V_L з SEQ ID NO: 116 або CDR3 V_L з SEQ ID NO: 117.

37. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що ізольоване анти-SNAP-25 антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 121 й SEQ ID NO: 100; і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110 й SEQ ID NO: 115.

30 38. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що ізольоване анти-SNAP-25 антитіло вибірково зв'язує епітоп SNAP-25 з 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.

39. Спосіб за п. 27, який відрізняється тим, що ізольоване анти-SNAP-25 антитіло вибірково зв'язує епітоп SNAP-25 з 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.

Приклади

Приклад I

Скринінг експресії ендogenous рецептора ендопептидази зі зміненою націленістю в клітинних лініях-кандидатах

40 [0178] Наведений нижче приклад демонструє, як проводити ідентифікацію стабільних клітинних ліній, що мають здатність до поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю, яка необхідна для розробки клітинного тесту на активність.

1. Культивування запасних культур клітинних ліній-кандидатів

45 [0179] Для культивування клітинних ліній, підходящу щільність клітин з тестувальної клітинної лінії засівали у флакони для культур тканин на 162 см², що містять 30 мл підходящого живильного середовища (див. Таблицю 1), і вирощували в інкубаторі при 37 °C і концентрації вуглекислого газу 5 % або 10 % до досягнення клітинами бажаної щільності.

Таблиця 1

Середовища, використовувані при скринінгу клітинних ліній.

Клітинна лінія	Склад живильного середовища з сироваткою
SiMa і клони SiMa	RPMI 1640, 10 % ембріональної бичачої сироватки, 1 % пеніцилін-стрептоміцин, 2 мМ L-глутамін
PC12	RPMI 1640, 5 % термоінактивованої ембріональної бичачої сироватки, 10 % кінської сироватки, 2 мМ GlutaMAX™, 10 мМ HEPES, 1 мМ пірувату натрію, 1 % пеніцилін-стрептоміцин

Таблиця 1

Середовища, використовувані при скринінгу клітинних ліній.

Клітинна лінія	Склад живильного середовища з сироваткою
N18 ND8/34 NG108-15	90 % DMEM, 10 % термоінактивованої ембріональної бичачої сироватки, 2 мМ глутаміну, 2 мМ глюкози
SK-N-DZ SK-N-F1 SK-N-SH	90 % DMEM, 10 % термоінактивованої ембріональної бичачої сироватки, 4 мМ глутаміну, 4 мМ глюкози, 0,1 мМ замінних амінокислот, 1,5 г/л NaHCO ₃
BE(2)-C SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM(11090-081, Gibco), Ham's F12 (11765-054, Gibco), 10 % термоінактивованої ембріональної бичачої сироватки, 2 мМ глутаміну, 0,1 мМ замінних амінокислот,
ND3, ND7, ND15	Середовище DMEM з 2 мМ глутаміну (Invitrogen, Cat #. 11885), 10 % ембріональної бичачої сироватки (Invitrogen, Cat #. 16140) і 1х антибіотик / фунгіцид
Neuro-2a	EMEM, 10 % термоінактивованої ембріональної бичачої сироватки, 2 мМ глутаміну, 0,1 мМ замінних амінокислот, 1,5 г/л NaHCO ₃ , 1 мм пірувату натрію

2. Скринінг клітин, що експресують рецептор-мішень на поверхні клітини

[0180] Проводили скринінг клітинних ліній на присутність бажаного рецептора-мішені, використовуючи проточну цитометрію та/або тести зв'язування ліганду. Хоча в наведених нижче прикладах реагенти використовували для ідентифікації опіоїдного або опіоїдоподібного рецептора в плазматичній мембрані, описані нижче підходи можна застосовувати для ідентифікації родинного рецептора для кожної з ендопептидаз зі зміненою націленістю.

а. Ідентифікація клітинних ліній з використанням проточної цитометрії

[0181] Для ідентифікації клітин, що включають стабільні клітинні лінії, які експресують рецепторів-мішені для ендопептидази зі зміненою націленістю на поверхні клітини, проводили аналіз за допомогою проточної цитометрії. Клітини з кожної клітинної лінії-кандидата вирощували як описано в Розділі 1, обробляли трипсином, промивали буфером для фарбування, що включає 1 х ФБР й 0,5 % BSA, і центрифугували при 1200 об/хв протягом 3 хвилин. Осаджені клітини ресуспендували в буфері для фарбування, і приблизно $2,0 \times 10^6$ клітин переносили в нові пробірки, по дві пробірки для кожного тестувального рецептора. Для проведення скринінгу на присутність опіоїдного або опіоїдоподібного рецептора, в одну пробірку поміщали приблизно 2,0-5,0 мкл α -ORL-1 RA14133 (Neuromics, Едина, Мінесота), кролячих поліклональних антитіл α -DOR RA10101 (Neuromics, Едина, Мінесота), кролячих поліклональних анти-KOR RA10103 антитіл (Neuromics, Едина, Мінесота) або кролячих поліклональних анти-MOR RA10104 антитіл (Neuromics, Едина, Мінесота) та інкубували суміш при 4 °C протягом 1 години. Другу пробірку інкубували при 4 °C протягом 1 години на відсутність яких-небудь антитіл і використовували як негативний контроль. Після інкубації з антитілами, 1,0 мл буфера для фарбування додавали до кожної пробірки й центрифугували при 1200 об/хв протягом 3 хвилин. Осад клітин ще раз промивали 1,0 мл буфера для фарбування. Осад клітин ресуспендували в 200 мкл буфера для фарбування, до кожної пробірки додавали 2,0 мкл козячих протикролячих антитіл IgG FITC й інкубували при 4 °C протягом 1 години у темряві. Після інкубації із вторинними антитілами, до кожної пробірки додавали 1,0 мл буфера для фарбування й центрифугували при 1200 об/хв протягом 3 хвилин. Осад клітин ще раз промивали 1,0 мл буфера для фарбування й ресуспендували в 500 мкл буфера для фарбування. Зразок аналізували за допомогою проточного цитометра й представляли дані у виді накладення фарбування за допомогою антитіл проти рецептора на фарбування за допомогою протикролячих антитіл IgG FITC.

[0182] Результати демонструють, що із протестованих клітинних ліній ORL-1 експресувався на поверхні приблизно 50 % клітин, що включають стабільні клітинні лінії SiMa, SiMa P>33, клон H10, ND7 й SK-N-DZ; експресувався на поверхні приблизно від 25 % до 50 % клітин, що включають стабільні клітинні лінії SH-SY5Y й ND15; і експресувався на поверхні менше ніж приблизно 25 % клітин, що включають стабільні клітинні лінії ND3, ND8, N18 й Neuro-2a (Таблиця 2). Результати також демонструють, що KOR експресувався на поверхні приблизно 50 % клітин, що включають стабільні клітинні лінії SH-SY5Y й ND7; експресувався на поверхні приблизно від 25 % до 50 % клітин, що включають стабільні клітинні лінії клону H10 SiMa, SiMa P>33, ND15 й Neuro-2a; і експресувався на поверхні менше ніж приблизно 25 % клітин, що

включають стабільні клітинні лінії ND3, ND8 й N18 (Таблиця 2). Результати також виявили, що MOR експресувався на поверхні приблизно 50 % клітин, що включають стабільні клітинні лінії ND7, ND15 й SiMa P>33; експресувався на поверхні приблизно від 25 % до 50 % клітин, що включають стабільні клітинні лінії SH-SY5Y, клон SiMa H10, ND8 й Neuro-2a; і експресувався на поверхні менше ніж приблизно 25 % клітин, що включають стабільні клітинні лінії ND3 й N18 (Таблиця 2). Кролячі поліклональні антитіла α -DOR RA10101 виявилися не здатні функціонувати належним чином і не дозволили одержати придатні до використання дані.

б. Ідентифікація клітинних ліній з використанням зв'язування ліганду

[0183] Для ідентифікації клітин, що включають стабільні клітинні лінії, які експресують рецептори-мішені ендopeптидаз зі зміненою націленістю на поверхні клітини, проводили аналіз за допомогою зв'язування ліганду. Клітини з тестувальних клітинних ліній-кандидатів інкубували в 96-лункових планшетах із чорно-прозорим дном протягом приблизно 4 годин для стимуляції прикріплення клітин до поверхні. Для проведення скринінга на присутність опіоїдних або опіодоподібних рецепторів, середовище з кожної лунки видаляли аспірацією й заміняли 50 мкл розчину ліганду, що містить 0 (неопрацьований контроль), 0,001 нМ, 0,01 нМ, 0,1 нМ або 1 нМ FAM-ноцицептину (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Берлінгейм, Каліфорнія); або 0 (неопрацьований контроль), 0,001 нМ, 0,01 нМ, 0,1 нМ або 1 нМ FAM-динорфіну А (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Берлінгейм, Каліфорнія). Клітини інкубували з розчином ліганду протягом 1 години на інкубаторі при 37 °C й 5 % вуглекислого газу. Клітини промивали для видалення ліганду, що не зв'язався шляхом трикратного промивання клітин 100 мкл 1 х ФБР. Планшет сканували на Турбооп (Ex 488 й Em 520 нм), а потім зчитували на сканері для планшетів M5 (Ex 495 й Em 520 нм) для сигналів ОФЕ. Результати демонструють, що клітини, які включають стабільні клітинні лінії клону SiMa H10, SH-SY5Y й SK-N-DZ, зв'язували ноцицептин, тоді як клітини, що включають клон SiMa H10, зв'язували також і динорфін (Таблиця 2)ю

Таблиця 2.

Клітинні лінії, що експресують рецептори-мішені на поверхні клітин

Рецептор-мішень	Ідентифіковані клітинні лінії				
	Проточна цитометрія			Зв'язування ліганду	
	Експресія більше 50 %	Експресія від 25 % до 50 %	Експресія менше 50 %	Ноцицептин	Динорфін А
ORL-1	AGN P33, SiMa, клон SiMa H10, ND7, SK-N-DZ	SH-SY5Y, ND15	ND3, ND8, N18, Neuro-2a	Клон SiMa H10, SH-SY5Y, SK-N-DZ	—
DOR	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
KOR	SH-SY5Y, ND7	Клон SiMa H10, AGN P33, ND15, Neuro-2a	ND3, ND8, N18	—	Клон SiMa H10
MOR	ND7, ND15, AGN P33	SH-SY5Y, клон SiMa H10, ND8, Neuro-2a	ND3, N18	Н. Д.	Н. Д.

[0184] Використовуючи подібний підхід, можна ідентифікувати клітинні лінії, що включають клітини, які мають родинні рецептори для інших ендopeптидаз зі зміненою націленістю, за допомогою FAM-мічення націлюючого домену для цих ендopeптидаз і скринінга клітинних ліній як описано вище.

3. Скринінг клітинних ліній-кандидатів при впливі одиначної дози ендopeптидази зі зміненою націленістю

[0185] Для визначення здатності клітинної лінії поглинати молекули відповідної ендopeптидази зі зміненою націленістю, щільність клітин, що підходить, із запасної культури тестувальної клітинної лінії засівали в лунки 24-лункових планшетів для культур тканин, що містять 1 мл відповідного живильного середовища з сироваткою (Таблиця 1). Клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C і концентрації вуглекислого газу 5 % до досягнення клітинами бажаної щільності (приблизно 18-24 години). Для оцінки поглинання ендopeптидази зі зміненою опіодною націленістю, живильне середовище з кожної лунки видаляли аспірацією й заміняли 1) свіжим живильним середовищем, що не містить ендopeптидази зі зміненою опіодною націленістю (неопрацьована клітинна лінія), або 2) свіжим живильним середовищем,

що містить 30 нМ ендопептидази зі зміненою ноцицептиною націленістю (Noc/A) або 100 нМ ендопептидази зі зміненою динорфіною націленістю (Dyn/A) (оброблена клітинна лінія). Після інкубації протягом ночі клітини промивали, видаляючи аспірацією живильне середовище і прополіскуючи кожну лунку 200 мкл 1 х ФБР. Для збирання клітин видаляли аспірацією 1 х ФБР, клітини лізували, додаючи 50 мкл 1 х ДСН буфера для завантаження, лізат переносили в нові пробірки й нагрівали зразки при 95 °С протягом 5 хвилин.

[0186] Для детектування як нерозщепленого субстрату SNAP-25, так і продуктів розщеплення SNAP-25, аліквоту від кожного зібраного зразка аналізували за допомогою Вестерн-блот аналізу. У ході такого аналізу 12 мкл аліквоти зібраних зразків розділяли в поліакриламідному гелі з MOPS з використанням готових 12 % Bis-Tris поліакриламідних блоків NuPAGE® Novex (Invitrogen Inc., Карлсбад, Каліфорнія) у денатуруючих умовах, що відновлюють. Розділені пептиди переносили з гелю на полівініліденфторидні (ПВДФ) мембрани (Invitrogen Inc., Карлсбад, Каліфорнія) шляхом Вестерн-блотінга з використанням апарату для електрофоретичного перенесення напівсухим способом TRANS-BLOT® SD (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Каліфорнія). ПВДФ мембрани блокували шляхом інкубації при кімнатній температурі протягом 2 годин у розчині, що містить трис-буферний розчин (TBS) (25 мМ 2-аміно-2-гідроксиметил-1,3-пропандіол соляна кислота (Трис-HCl) (рН 7,4), 137 мМ хлорид натрію, 2,7 мМ хлорид калію), 0,1 % Tween-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолаурат), 2 % бичачий сироватковий альбумін (BSA), 5 % знежирене сухе молоко. Блоковані мембрани інкубували при 4 °С протягом ночі в TBS, 0,1 % Tween-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолаурат), 2 % BSA, і 5 % знежиреному сухому молоці, що містить 1) розведення 1:5,000 мишачих моноклональних анти-SNAP-25 антитіл як первинні антитіла (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Лютервіль, Меріленд); або 2) розведення 1:5000 імунної сироватки S9684 з поліклональними кролячими анти-SNAP-25 антитілами як первинні антитіла (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі). Як мишачі моноклональні, так і поліклональні кролячі анти-SNAP-25 антитіла можуть впізнавати як нерозщеплений субстрат SNAP-25, так і продукт розщеплення SNAP-25, що дозволяє оцінювати загальну експресію SNAP-25 у кожній клітинній лінії й відсоток розщепленого SNAP-25 після обробки ендопептидазами зі зміненою націленістю як параметр для оцінки кількості поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю. Після зв'язування первинних антитіл блоти промивали три рази по 5 хвилин щоразу в TBS, Tween-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолаурат). Промиті мембрани інкубували при кімнатній температурі протягом 2 годин в TBS, 0,1 % Tween-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолаурат), 2 % BSA, і 5 % знежиреному сухому молоці, що містить 1) розведення 1:10000 поліклональних козячих протимишачих імуноглобулінів G, важких і легких ланцюгів (IgG, H+L) антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому (Zymed, Південний Сан-Франциско, Каліфорнія) як вторинні антитіла; або 2) розведення 1:10000 поліклональних козячих протикролячих імуноглобулінів G, важких і легких ланцюгів (IgG, H+L) антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому (Zymed, Південний Сан-Франциско, Каліфорнія) як вторинні антитіла. Після зв'язування вторинних антитіл блоти промивали три рази протягом 15 хвилин щоразу в TBS, 0,1 % Tween-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолаурат). Сигнал детектування мічених продуктів SNAP-25 візуалізували з використанням системи для посиленого хемілюмінесцентного детектування ECL Plus™ Western Blot Detection System (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Піскатауей, Нью-Джерсі), мембрани проявляли й проводили кількісну оцінку продуктів розщеплення SNAP-25 за допомогою пристрою для аналізу зображень Typhoon 9410 Variable Mode Imager і програми для аналізу зображень (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Піскатауей, Нью-Джерсі). Вибір розміру пікселя (від 100 до 200 пікселей) і настроювання напруги ФЕУ (від 350 до 600, як правило, 400) залежали від конкретного блота.

[0187] На основі детектування продукту розщеплення SNAP-25, наступні клітинні лінії демонстрували поглинання 30 нМ Noc/A: BE(2)-C, N18TG2, Neuro-2a, SiMa, SK-N-BE(2)-C й SK-N-DZ (Таблиця 3); у той час як наступні клітинні лінії демонстрували поглинання 100 нМ Dyn/A: N18TG2, Neuro-2a, PC12 й SiMa. Деякі із цих чутливих клітинних ліній тестували з більш низькими дозами сполук та/або на повнодозову відповідь.

Таблиця 3

Скринінг клітинних ліній-кандидатів при впливі одиної дози ендопептидаз зі зміненою націленістю Noc/A й Dyn/A

Клітинна лінія	Опис	Джерело	Поглинання 30 n Noc/A	Поглинання 100 n Dyn/A
BE(2) -C	Нейробластома людини	ATCC CRL-2268	Так	НТ
N18TG2	Нейробластома миші	DSMZ ACC 103	Так	Так
ND3	Нейробластома миші/первинний неонатальний гібрид DRG пацюка	ECACC 92090901	ДКВ	ДКВ
ND7/23	Нейробластома миші/первинний гібрид DRG пацюка	ECACC 92090903	Немає	Немає
ND8	Нейробластома миші/первинний неонатальний гібрид DRG пацюка	ECACC 92090904	ДКВ	ДКВ
ND15	Нейробластома миші/первинний неонатальний гібрид DRG пацюка	ECACC 92090907	Немає	Немає
Neuro-2a	Нейробластома миші	ATCC CCL-131	Так	Так
NG108-15	Нейробластома миші/гібрид гліоми пацюка	ECACC 88112302	Немає	НТ
PC12	Феохромоцитома пацюка	ATCC CRL-1721	НТ	Так
SH-SY5Y	Нейробластома людини	ATCC CRL-2266	Немає	НТ
SiMa	Нейробластома людини	DSMZ ACC 164	Так	Так
SK-N-BE(2) -C	Нейробластома людини	ATCC CRL-2271	Так	НТ
SK-N-DZ	Нейробластома людини	ATCC CRL-2149	Так	НТ
SK-N-F1	Нейробластома людини	ATCC CRL-2142	Немає	НТ
SK-N-SH	Нейробластома людини	ECACC 86012802	Немає	НТ

НТ: Не тестували.

ДКВ (детектована кількість відсутня): У даній клітинній лінії не було виявлено детектованої кількості SNAP-25.

- 5 [0188] Використовуючи подібний підхід, можна оцінювати поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю клітинними лініями, що включають клітини, які мають родинні рецептори для інших ендопептидаз зі зміненою націленістю.

Приклад II

Скринінг експресії ендогенного рецептора ендопептидази зі зміненою націленістю в клональних клітинних лініях-кандидатах

- 10 1. Скринінг клональних клітинних ліній-кандидатів, одержаних з батьківської клітинної лінії SiMa, при впливі одиної дози ендопептидази зі зміненою націленістю.

- 15 [0189] Родинна заявка на патент на ім'я Zhu Hong et al., Cell Lines Useful in Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, заявка на патент США Серійний Номер: 61/160199, описує клональні клітинні лінії, одержані з батьківської клітинної лінії SiMa, які використовували в тесті на активність BoNT/A, як описано в Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, заявка на патент США Серійний Номер: 12/403531, кожна з яких повністю включена в дану заявку за допомогою посилання. Для визначення, чи здатні ці клональні клітинні лінії до поглинання відповідної ендопептидази зі зміненою націленістю, кожен з них піддавали скринінгу за допомогою «сандвіч»-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілюмінесценцією.

[0190] Для приготування лізату, обробленого ендопептидазою зі зміненою націленістю, культуру з підходящою щільністю клітин з маткового розчину культури перевіреної клітинної лінії засівали на ніч у лунки 96-лункових планшетів для культур тканин, що містять 100 мкл відповідного живильного середовища на основі сироватки (Таблиця 1). Живильні середовища від засіяних клітин з кожної лунки видаляли аспірацією й заміняли свіжим середовищем, що містить 30 нМ ендопептидази зі зміненою націленістю Nos/A або 80 нМ ендопептидази зі зміненою націленістю Dyn/A. Після 24-годинної інкубації клітини відмивали аспірацією живильного середовища й обполіскували кожну лунку 200 мкл 1 х ФБР. Для збирання клітин, 1 х ФБР видаляли аспірацією, клітини лізували шляхом додавання в кожну лунку 30 мкл лізуючого буфера, що містить 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA, 1 % Тритон X-100, і інкубували планшет на струшувачі з обертанням при 500 об/хв протягом 30 хвилин при 4 °С. Для осадження залишків клітин планшет центрифугували при 4000 об/хв протягом 20 хвилин при 4 °С, після чого супернатант переносили в 96-лунковий планшет, покритий антитілами для захоплення для проведення етапу детекції.

[0191] Для приготування розчину анти-SNAP-25197 антитіл для захоплення, мишачі моноклональні анти-SNAP-25197 антитіла, що знаходяться у складі асцитної рідини, одержаної від гібридомної клітинної лінії 2E2A6 (Приклад XI), очищали, використовуючи стандартний протокол очищення з використанням білка А.

[0192] Для приготування розчину детектуючих анти-SNAP-25 антитіл, поліклональні антитіла кролика α -SNAP-25, S9684 (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі) кон'югували з реактивом для мічення - складним ефіром рутеній (II)-трис-біпіридин-(4-метисульфону) і N-ГС (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд) відповідно до інструкцій виробника (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд). Реакцію кон'югації проводили шляхом додавання 30 мкл розчину для розведення MSD SULFO-TAG™, розведеного в дистильованій воді, 200 мкл поліклональних анти-SNAP-25 антитіл у концентрації 2 мг/мл й інкубації реакційної суміші при кімнатній температурі протягом 2 годин у темряві. Позначені антитіла очищали, використовуючи стандартний протокол спіноколон, і концентрацію білка визначали з використанням стандартного колориметричного тесту на білок. Поглинаючи здатність кон'югатів анти-SNAP-25 антитіл/MSD SULFO-TAG™ вимірювали за допомогою спектрофотометра при 455 нМ для визначення концентрації в молях на літр. Розчин детектуючих антитіл зберігали при 4 °С до використання. Тривале зберігання невикористаних аліквот здійснювали при -20 °С.

[0193] Для приготування твердофазної підкладки α -SNAP-25, що містить анти-SNAP-25197 антитіла для захоплення, приблизно 5 мкл відповідного розчину моноклональних анти-SNAP-25197 антитіл (20 мкг/мл в 1 х ФБР) додавали до кожної лунки 96-лункового планшета MSD High Bind, і розчин сушили на повітрі в біологічно чистому приміщенні протягом 2-3 годин до випарювання рідини з розчину. Заблоковані планшети запечатували й зберігали при 4 °С до використання.

[0194] Для детектування розщепленого продукту SNAP-25 ECL "сендвіч"-методом твердофазного ІФА, лунки зі зв'язаними антитілами для захоплення блокували, додаючи 150 мкл блокуючого буфера, що містить 2 % блокуючого реактиву Amersham (GE Life Sciences, Піскетей, Нью-Джерсі) і 10 % козячої сироватки (VWR, Уест-Честер, Пенсільванія), й інкубували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Блокуючий буфер видаляли аспірацією й до кожної лунки додавали 25 мкл лізату клітин, оброблених ендопептидазою зі зміненою націленістю, і планшети інкубували при 4 °С протягом ночі. Лунки планшета трикратно промивали: видаляли аспірацією клітинний лізат і три рази обполіскували кожну лунку 200 мкл 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після відмивання, у кожну лунку додавали 25 мкл розчину детектуючих анти-SNAP-25 антитіл у концентрації 5 мкг/мл, що містить 2 % блокуючого реактиву Amersham в 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат), запечатували й інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години зі струшуванням. Після інкубації з детектуючими анти-SNAP-25 антитілами лунки трикратно промивали 200 мкл 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після відмивання в кожну лунку додавали 150 мкл 1 х буфера для зчитування (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд) і аналізували планшети, використовуючи пристрій для зчитування зображень SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд). Вихідні дані збирали, використовуючи пристрій для візуалізації ECL.

[0195] Результати демонструють, що батьківська клітинна лінія SiMa, як і клональна клітинна лінія H10, показала істотне поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю Nos/A (Таблиця 4). Крім того, ці результати показують, що багато клітинних ліній демонструють поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю Dyn/A (Таблиця 4). Три клональних клітинні лінії (1E11,

- 5 AF4, і DC4) продемонстрували істотне поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю Dyn/A; одинадцять клональних клітинних ліній (1E3, 2D2, 2D6, 3D8, 5C10, 5F3, BB10, BF8, CG8, CG10 й DE7) продемонстрували помірне поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю Dyn/A; і (3B8, 2B9, CE6, YB8, 4C8, 2F5, AC9, CD6, DD10, YF5) продемонстрували мінімальне поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю Dyn/A. Деякі із цих клітинних ліній-кандидатів досліджували в тесті на повнодозову відповідь із відповідною ендопептидазою зі зміненою націленістю.

Таблиця 4

Скринінг клональних клітинних ліній-кандидатів при впливі одиничної дози ендопептидаз зі зміненою націленістю Noc/A й Dyn/A

Клітинна лінія	Поглинання 30 нМ Noc/A	Поглинання 80 нМ Dyn/A
AGN P33	+++	HT
A10	–	HT
D11	–	HT
H1	–	–
H10	+++	–
1D4	HT	–
2E4	HT	–
3D5	HT	–
3G10	HT	–
4D3	HT	–
BB3	HT	–
CC11	HT	–
DF5	HT	–
YB7	HT	–
BE3	HT	–
4B5	HT	–
2B9	HT	+
2F5	HT	+
3B8	HT	+
4C8	HT	+
AC9	HT	+
CD6	HT	+
CE6	HT	+
DD10	HT	+
YB8	HT	+
YF5	HT	+
1E3	HT	++
2D2	HT	++
2D6	HT	++
3D8	HT	++
5C10	HT	++
5F3	HT	++

Таблиця 4

Скринінг клональних клітинних ліній-кандидатів при впливі одиничної дози ендопептидаз зі зміненою націленістю Noc/A й Dyn/A

Клітинна лінія	Поглинання 30 нМ Noc/A	Поглинання 80 нМ Dyn/A
BF8	НТ	++
BB10	НТ	++
CG8	НТ	++
CG10	НТ	++
DE7	НТ	++
1E11	НТ	+++
AF4	НТ	+++
DC4	НТ	+++

НТ: Не Тестували

-: немає поглинання; +: мінімальне поглинання; ++: помірне поглинання; +++: істотне поглинання

2. Скринінг клітинних ліній-кандидатів на повнодозову відповідь.

[0196] Стабільні клітинні лінії, ідентифіковані вище, згодом оцінювали, використовуючи повнодозову відповідь на відповідну ендопептидазу зі зміненою націленістю. Клітини з різних клітинних ліній висівали в 96-лункові планшети й піддавали впливу різних концентрацій Noc/A (0, 0,14 нМ, 0,4 нМ, 1,23 нМ, 3,7 нМ, 11,1 нМ, 33,3 нМ, і 100 нМ) або Dyn/A (0,017 нМ, 0,05 нМ, 0,15 нМ, 0,45 нМ, 1,4 нМ, 4,1 нМ, 12 нМ, 37 нМ, 111 нМ, 333 нМ, і 1000 нМ) протягом 24 годин. Середовище, що містить ендопептидазу зі зміненою націленістю, видаляли й замінювали новим повним середовищем. Планшети інкубували ще протягом 24 годин в атмосфері 5 % CO₂ при 37 °C для розщеплення SNAP-25. Клітини лізували в буфері для лізису (Таблиця 5) і центрифугували планшети для видалення залишків клітин. Лізати використовували у Вестерн-блотінгу або в "сендвіч"-методі твердофазного ІФА.

[0197] Для аналізу за допомогою Вестерн-блотінга зразки тестували як на наявність інтактної SNAP-25, так і на наявність продуктів розщеплення SNAP-25, як описано в Прикладі І.

[0198] Для "сендвіч"-методу твердофазного ІФА, планшети для твердофазного ІФА, покриті моноклональними антитілами 2E2A6, блокували 150 мкл блокуючого буфера при кімнатній температурі протягом 2 годин. Після видалення блокуючого буфера, 25 мкл лізату клітин додавали в кожну лунку, і планшети інкубували при 4 °C протягом 2 годин. Планшети тричі відмивали у ФБР-Т й у нижній кут лунок додавали 25 мкл детектуючих антитіл α -SNAP25 pAb, маркованих складним-ефіром SULFO-TAG N-ГС у концентрації 5 мкг/мл в 2 % блокуючому реактиві у ФБР-Т. Планшети запечатували й струшували при кімнатній температурі протягом 1 години, після чого випливали три відмивання у ФБР-Т. Після завершення відмивань, у кожну лунку додавали 150 мкл 1x буфера для зчитування, і планшет зчитували в пристрої для зчитування зображень SI6000. Для визначення чутливості кожної перевіреної клітинної лінії, для кожної клітинної лінії обчислювали величину EC₅₀. Значення для ендопептидази зі зміненою націленістю Noc/A наведені в Таблиці 5. Тести на повнодозову відповідь на ендопептидазу зі зміненою націленістю Dyn/A виконували тільки на PC12 і клоні AF4. В обох випадках тест не досягав верхньої асимптоти, і обчислити EC₅₀ було неможливо. Найбільш низька доза, яка викликала появу сигналу в клоні AF4, становила 12 нМ для обох клітинних ліній.

Таблиця 5

Скринінг клітинних ліній-кандидатів при впливі повної дози ендопептидаз зі зміненою націленістю Noc/A й Dyn/A

Клітинна лінія	Опис	Джерело	EC ₅₀ Поглинання Noc/A	EC ₅₀ Поглинання Dyn/A
AGN P33	Нейробластома людини	—	5-10 нМ	НТ
BE(2) -C	Нейробластома людини	ATCC CRL-2268	НТ	НТ
N18TG2	Нейробластома миші	DSMZ ACC 103	НТ	НТ
N18	Нейробластома миші	ECACC 88112301	>100 нМ	НТ
ND3	Нейробластома миші/первинний неонатальний гібрид DRG пацюка	ECACC 92090901	ДКВ	НТ
ND7/23	Нейробластома миші/первинний гібрид DRG пацюка	ECACC 92090903	>100 нМ	НТ
ND8	Нейробластома миші/первинний неонатальний гібрид DRG пацюка	ECACC 92090904	ДКВ	НТ
ND15	Нейробластома миші/первинний неонатальний гібрид DRG пацюка	ECACC 92090907	>100 нМ	НТ
Neuro-2a	Нейробластома миші	ATCC CCL-131	30 нМ	НТ
NG108-15	Нейробластома миші/гібрид гліоми пацюка	ECACC 88112302	НТ	НТ
PC12	Феохромоцитوما пацюка	ATCC CRL-1721	НТ	>1000 нМ
SH-SY5Y	Нейробластома людини	ATCC CRL-2266	НТ	НТ
SiMa	Нейробластома людини	DSMZ ACC 164	30 нМ	НТ
SiMa clone AF4	Нейробластома людини	—	НТ	>300 нМ
SiMa clone H1	Нейробластома людини	—	>100 нМ	НТ
SiMa clone H10	Нейробластома людини	—	20 нМ	НТ
SK-N-BE(2) -C	Нейробластома людини	ATCC CRL-2271	НТ	НТ
SK-N-DZ	Нейробластома людини	ATCC CRL-2149	0. 5-2 нМ	НТ
SK-N-F1	Нейробластома людини	ATCC CRL-2142	>100 нМ	НТ
SK-N-SH	Нейробластома людини	ECACC 86012802	>100 нМ	НТ

НТ: Не тестували.

ДКВ (детектована кількість відсутня): У даній клітинній лінії не було виявлено детектовану кількість SNAP-25.

- 5 [0199] Використовуючи подібний підхід, можна проводити скринінг й оцінювати клональні клітинні лінії, що містять клітини, які мають родинні рецептори для інших ендопептидаз зі зміненою націленістю, на предмет поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю.

Приклад III

Оцінка впливу умов росту на поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю в клітинних лініях-кандидатах

- 10 [0200] Наступний приклад ілюструє визначення умов культивування, росту й диференціювання для стабільних клітинних ліній, які максимізують поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю.

1. Ефекти клітинного диференціювання й трофічних факторів на поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю клітинними лініями-кандидатами.

[0201] Для визначення здатності клітинного диференціювання або присутності трофічних факторів у живильному середовищі покращувати поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю, клітинні лінії, що демонструють істотне поглинання Noc/A, тестували на живильних середовищах різного складу. Клітинну культуру підходящої щільності маткового розчину культури SiMa P>30 досліджуваних клітинних ліній засівали в лунки 96-лункових планшетів для культур тканин, які містять 100 мкл середовища без сироватки, що містить RPMI1640, 1 % пеніцилін-стрептоміцин, 2 mM L-глутамін, і підкріпленого B27, і N2, або 100 мкл середовища без сироватки, що містить RPMI1640, 1 % пеніцилін-стрептоміцин, 2 mM L-глутамін, підкріпленого B27, N2 й NGF (фактор росту нервів, 100 нг/мл). Ці клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу поки вони не диференціювалися, їх оцінювали за допомогою стандартних і рутинних морфологічних критеріїв, таких як припинення росту й вилучення невриту (приблизно 1 – 2 дні). Як контроль, клітинну культуру підходящої щільності з культури маткового розчину досліджуваної клітинної лінії засівали в лунки 96-лункових планшетів для культур тканин, які містять 100 мкл відповідного живильного середовища (Таблиця 1) з NGF (100 нг/мл) або без нього. Ці не диференційовані контрольні клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу до досягнення бажаної щільності клітин (приблизно 18 – 24 години). Середовище як від диференційованих так і від не диференційованих контрольних культур видаляли аспірацією з кожної лунки й заміняли новим середовищем, що містить або 0 (неопрацьований зразок) або різні концентрації Noc/A (0,14, 0,4, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3, і 100 нМ). Після обробки протягом 24 годин, клітини відмивали й інкубували протягом ще 24 годин у середовищі без ендопептидази зі зміненою націленістю, щоб збільшити кількість одержаного SNAP-25197. Клітини відмивали й збирали для ECL "сендвіч"-метода ІФА як описано в Прикладі II.

[0202] Ефекти трофічних факторів також тестували на клітинній лінії SK-N-DZ. Клітини SK-N-DZ висівали в 96-лункові планшети, покриті полі-D-лізіном, у кількості 25000 клітин на лунку, у восьми різних середовищах SM (Таблиця 6), і вирощували протягом 72 годин. Клітини обробляли в тих же самих восьми живильних середовищах ендопептидазою зі зміненою націленістю Noc/A у кількостях 0, 0,3 нМ, 3 нМ, і 30 нМ. Після 24-годинної обробки клітини відмивали й інкубували протягом 24 годин у середовищах без ендопептидаз зі зміненою націленістю, щоб збільшити кількість одержуваних продуктів розщеплення SNAP-25197. Потім клітини відмивали й збирали для аналізу за допомогою Вестерн-блотінга як описано в Прикладі I.

[0203] Диференціювання не мало ефекту на поглинання Noc/A у клітинній лінії SiMa >P30, у той час як воно, здається, покращувало поглинання в клітинній лінії SK-N-DZ. Базальні середовища мали істотний ефект на поглинання Noc/A у клітинній лінії SK-N-DZ, ці середовища з RPMI1640, що містять трофічні фактори N2 й B27, виявилися кращою комбінацією поглинання Noc/A. Наявність NGF у живильних середовищах здавалося, не покращувало поглинання в цих двох досліджуваних клітинних лініях.

Таблиця 6

Ефекти трофічних факторів і клітинного диференціювання на поглинання Noc/A клітинними лініями-кандидатами.

Недиференційовані	Диференційовані	EC ₅₀ Поглинання Noc/A	
		AGN P33	SK-N-DZ
DMEM, 10 % ЕБС	—	НТ	> 30 нМ
DMEM, 10 % ЕБС, N2, B27	—	НТ	3 нМ
DMEM, 10 % ЕБС, N2, B27, NGF	—	НТ	3 нМ
DMEM, 10 % ЕБС, N2, B27, PK	—	НТ	>30 нМ
RPMI1640, 10 % ЕБС	—	НТ	10 нМ
RPMI1640, 10 % ЕБС, N2, B27	—	7,2 нМ	1 нМ
RPMI1640, 10 % ЕБС, N2, B27, NGF	—	9,1 нМ	1 нМ

Таблиця 6

Ефекти трофічних факторів і клітинного диференціювання на поглинання Noc/A клітинними лініями-кандидатами.

Недиференційовані	Диференційовані	EC ₅₀ Поглинання Noc/A	
		AGN P33	SK-N-DZ
RPMI1640, 10 % ЕБС, N2, B27, PK	—	HT	10 нМ
—	RPMI1640, N2, B27	10,2 нМ	1 нМ
—	RPMI1640, N2, B27, NGF	9,8 нМ	0,6 нМ

NGF: фактор росту нервів; PK: ретиноева кислота

HT: Не тестували

[0204] Використовуючи подібний підхід, можна оцінювати умови росту й диференціювання для клональних клітинних ліній, що включають клітини, які мають родинні рецептори для інших ендопептидаз зі зміненою націленістю.

5 Приклад IV

Розробка стабільних клітинних ліній, що експресують екзогенні рецептори ендопептидази зі зміненою націленістю.

[0205] Наступний приклад ілюструє, створення стабільної клітинної лінії, що експресує екзогенний рецептор ендопептидази зі зміненою націленістю.

10 1. Трансфекція рецептора-мішені в клітини, що включають клітинну лінію-кандидата.

[0206] Ендопептидаза зі зміненою націленістю Noc/A включає ноцицептиновий націлюючий домен, який є природним лігандом рецептора, подібного до рецептора Опіоїдів – 1 (ORL-1). Для одержання експресійної конструкції, що включає відкриту рамку зчитування для ORL-1, експресійну конструкцію pReceiver-M02/ORL-1 одержали від GeneCorpora (GeneCorpora, Джермантаун, Меріленд).

[0207] Як альтернатива, молекулу полінуклеотида, що відповідає амінокислотній послідовності ORL-1 (наприклад, послідовність амінокислот SEQ ID NO: 25 або SEQ ID NO: 26), можна синтезувати, за допомогою стандартних процедур (BlueHeron® Biotechnology, Бозел, Вашингтон). Олігонуклеотиди довжиною 20 – 50 пар основ синтезують, за допомогою стандартного фосфорамідитного синтезу. Ці олігонуклеотиди гібридизують у дуплекси, які лігують один з одним, для одержання повнорозмірної молекули полінуклеотида. Цю молекулу полінуклеотида клонують, за допомогою стандартних методів молекулярної біології, у вектор pUCBHB1 за сайтом SmaI, для одержання pUCBHB1/ORL-1. Синтезовану молекулу полінуклеотида досліджували секвенуванням за допомогою Big Dye Terminator™ Chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Фостер-Сіті, Каліфорнія) і секвенатора ABI 3100 (Applied Biosystems, Фостер-Сіті, Каліфорнія). При необхідності можна синтезувати молекулу полінуклеотида, основу на послідовності амінокислот ORL-1, оптимізовану із забезпеченням експресії (наприклад, послідовності амінокислот SEQ ID NO: 25 або SEQ ID NO: 26), для покращення експресії в штаммах Escherichia coli. Молекулу полінуклеотида, що кодує ORL-1, можна змінити таким чином, щоб 1) вона містила синонімічні кодони, зазвичай присутні у власних молекулах полінуклеотидів штамів Escherichia coli; 2) вона мала вміст G+C, більш відповідне середньому вмісту G+C власних молекул полінуклеотидів зі штамів Escherichia coli; 3) зменшити полімононуклеотидні області, що знаходяться всередині молекули полінуклеотида; та/або 4) усунути внутрішні регуляторні або структурні сайти, що є присутніми усередині молекули полінуклеотида, див., наприклад, Lance E. Steward et al., Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type A, публікація патенту США 2008/0057575 (6 березня 2008); and Lance E. Steward et al., Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type E, публікація патенту США 2008/0138893 (12 червня 2008). Як тільки завершили оптимізацію послідовності, олігонуклеотиди довжиною 20 – 50 пар основ синтезували за допомогою стандартного фосфорамідитного синтезу. Ці олігонуклеотиди гібридизували в дуплекси, і лігували один з одним, для утворення повнорозмірної молекули полінуклеотида. Цю молекулу полінуклеотида клонували, за допомогою стандартних способів молекулярної біології у вектор pUCBHB1 за сайтом SmaI, для утворення pUCBHB1/ORL-1. Синтезовану молекулу полінуклеотида досліджували секвенуванням ДНК. При необхідності, можна зробити оптимізацію експресії для різних організмів, таких як, наприклад, штамми дріжджів, клітинні лінії комах або ссавців, див.,

наприклад, Steward, публікація патенту США 2008/0057575, див. вище, (2008); і Steward, публікація патенту США 2008/0138893, див. вище, (2008). Екземпляри молекул полінуклеотидів, що кодують ORL-1, включають SEQ ID NO: 61 й SEQ ID NO: 62.

[01] Для побудови експресійної конструкції, що кодує ORL-1, рUCBHB1/ORL-1 розщеплюють ендонуклеазами рестрикції, які 1) вирізують молекулу полінуклеотида, яка кодує відкриту рамку зчитування ORL-1; і 2) дозволяють цій молекулі полінуклеотида функціонально зв'язатися з вектором рсDNA3 (Invitrogen, Inc., Карлсбад, Каліфорнія). Цю вставку субклонують за допомогою T4 ДНК лігази у вектор рсDNA3, який розщеплюють відповідними ендонуклеазами рестрикції, для одержання рсDNA3/ORL-1. Суміш лігаз використовують для трансформації електро-компетентних клітин *E. coli* BL21 (DE3) (Edge Biosystems, Гейтерсбург, Меріленд) методом електропорації, і клітини висівають на чашки Лурія-Бертані (рН 7,0) з 1,5 % агаром, що містять 50 мкг/мл ампіциліну, і поміщають в інкубатор на 37 °C для росту протягом ночі. Бактерії, що містять експресійну конструкцію, ідентифікують як стійкі до ампіциліну колонії. Конструкції-кандидати виділяють, за допомогою міні виділення плазміді способом лужного лізису, і аналізують картуванням за допомогою розщеплення ендонуклеазами рестрикції, для визначення наявності й орієнтації вставки. Ця стратегія клонування призведе до одержання експресійної конструкції рсDNA3, яка включає молекулу полінуклеотида, що кодує ORL-1.

[0208] Ендопептидаза зі зміненою націленістю Dyn/A включає динорфіновий націлюючий домен, який є природним лігандом к-опіоїдного рецептора (KOR). Для одержання експресійної конструкції, що включає відкриту рамку зчитування для ORL-1, експресійну конструкцію рReceiver-M02/KOR-1 одержали від GeneCороеіа (GeneCороеіа, Джермантаун, Меріленд). Як альтернатива, експресійні конструкції, що кодують KOR, можна синтезувати й субклонувати для одержання експресійної конструкції рсDNA3.1/KOR за допомогою підходу, подібного описаному вище. Екземпляри амінокислотних послідовностей KOR включають SEQ ID NO: 29 й SEQ ID NO: 30; приклади молекул полінуклеотидів, що кодують KOR, включають SEQ ID NO: 65 й SEQ ID NO: 66.

[0209] Подібні стратегії клонування можна використовувати, для створення експресійних конструкцій, що кодують інші рецептори до ендопептидаз зі зміненою націленістю, таких як, наприклад, рсDNA3.1/DOR або рсDNA3.1/MOR, рсDNA3.1/Galanin рецептор 1, рсDNA3.1/Galanin рецептор 2, або рсDNA3.1/Galanin рецептор 3. Приклади амінокислотних послідовностей DOR включають SEQ ID NO: 27 й SEQ ID NO: 28; приклади амінокислотних послідовностей MOR включають SEQ ID NO: 31 приклади амінокислотних послідовностей рецептора Galanin 1 включають SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, і SEQ ID NO: 138; приклади амінокислотних послідовностей рецептора Galanin 2 включають SEQ ID NO: 139; приклади амінокислотних послідовностей рецептора Galanin 3 включають SEQ ID NO: 140. Приклади молекул полінуклеотидів, що кодують DOR, включають SEQ ID NO: 63 й SEQ ID NO: 64; приклади молекул полінуклеотидів, що кодують MOR, включають SEQ ID NO: 67; приклади молекул полінуклеотидів, що кодують рецептор Galanin 1, включають SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, і SEQ ID NO: 143; приклади молекул полінуклеотидів, що кодують рецептор Galanin 2, включають SEQ ID NO: 144; приклади молекул полінуклеотидів, що кодують рецептор Galanin 3, включають SEQ ID NO: 145.

[0210] Для введення експресійної конструкції, що кодує рецептор ендопептидази зі зміненою націленістю, клітинні лінії трансфікували експресійною конструкцією, що кодує рецептор ендопептидази зі зміненою націленістю. Для трансфекції клітинної лінії опіоїдним або подібним опіоїдному рецептором, клітини клітинної лінії-кандидата щільністю 1×10^7 засівали в колбу T₁₇₅, покриту Колагеном IV, і вирощували при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу, поки клітини не досягали бажаної щільності. 4.2 мл розчину для трансфекції готували шляхом додавання 4 мл відновлюваного живильного середовища OPTI-MEM на основі сироватки, що містить 200 мкл LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія), інкубованого при кімнатній температурі протягом 5 хвилин, до 4 мл відновлюваного живильного середовища OPTI-MEM на основі сироватки, що містить 20 мкг рReceiver-M02/ORL-1 або 20 мкг рReceiver-M02/KOR-1. Цю трансфекцію інкубували при кімнатній температурі протягом приблизно 20 хвилин. Середовище замінювали на 8 мл нового середовища без сироватки й антибіотиків, і до клітин додавали розчину для трансфекції. Клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу протягом приблизно 16-18 годин. Середовище для трансфекції замінювали новим середовищем, клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу. Через 24 години середовище замінювали новим середовищем, що містить антибіотик G418 у концентрації 1 мг/мл (селективне середовище), і клітини інкубували протягом 7 днів. Селективне середовище заміняли щотижня протягом у цілому 4 тижнів (близько 90 % клітин загинули й були вилучені під час щотижневих заміни середовища).

[0211] Клітинні лінії-кандидати, трансфіковані рецептором ORL-1, включали SiMa >P30, ND15, ND7, NG108-T15 і клітинні лінії SK-N-DZ. Клітинні лінії-кандидати, трансфіковані рецептором KOR-1, включали SiMa, SiMa>P30, ND15, ND7, NG108-T15 і клітинні лінії SK-N-DZ. Трансфіковані клітини NG108-T15 не перенесли селекції на G418.

5 2. Скринінг стабільно трансфікованих клітинних ліній на одиничну дозу й дозову відповідь за допомогою молекул ендопептидаз зі зміненою націленістю.

10 [0212] Клітини з трансфікованих і відібраних клітинних ліній-кандидатів з попереднього розділу засівали в 96-лунковий, покритий полі-D-лізином, або Колагеном IV, планшет у кількості 1×10^5 клітин/лунку в середовищі RPMI1640, що містить N2 і добавки B27, і NGF (50-100 нг/мл) і вирощували протягом 20 ± 4 годин до обробки складом. Потім клітини, стабільно трансфіковані рецептором ORL-1, обробляли ендопептидазою зі зміненою націленістю Noc/A у концентрації 30 нМ у тому ж самому середовищі протягом 24 ± 2 годин, за винятком клітинної лінії SK-N-DZ, яку обробляли 10 нМ ендопептидази зі зміненою націленістю. Клітини лізували в 120 мкл лізуючого буфера, і 20 мкл лізату змішували з 2 x ДСН буфером для аналізу за допомогою

15 Вестерн-блотінга, який проводили як описано в Прикладі I. Всі лінії клітин показали підвищене поглинання складу Noc/A зі зміненою націленістю, після трансфекції рецептором ORL-1 (Таблиця 7).

Таблиця 7.

Стабільно трансфіковані ORL-1 клітинні лінії, протестовані за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю Noc/A

Клітинна лінія	Опис	% Розщепленого SNAP25 при 30 нМ	
		Нетрансфіковані	Трансфіковані
AGN P33	Нейробластома Людини	20 %	40 %
SK-N-DZ	Нейробластома Людини	25 % при 10 нМ	40 % при 10 нМ
ND7	Нейробластома Миші й гібрид клітин DRG пацюка	10 %	42 %
ND15	Нейробластома Миші й гібрид клітин DRG пацюка	8 %	20 %
NG108-T15	Нейробластома миші/гібрид гліоми пацюка	Клітини не виживають	Клітини не виживають

20 [0213] Клітини із трансфікованих і відібраних клітинних ліній-кандидатів з попереднього розділу засівали в 96-лунковий планшет, покритий полі-D-лізином, або Колагеном IV, у кількості 1×10^5 клітин/лунку в середовищі RPMI1640, що містить 10 % ЕБС і добавок N2 й B27 і вирощували протягом 20 ± 4 годин до обробки складом. Клітини, стабільно трансфіковані рецептором KOR-1, обробляли ендопептидазою зі зміненою націленістю Dyn/A у концентрації 100 нМ в тому ж самому середовищі протягом 24 ± 2 годин. Клітини лізували в 120 мкл лізуючого буфера, і 20 мкл лізату змішували з 2 x ДСН буфером для аналізу за допомогою Вестерн-блотінга, який проводили як описано в Прикладі I. Всі лінії клітин показали збільшення поглинання складу Dyn/A зі зміненою націленістю після трансфекції людським рецептором KOR-1.

30 3. Селекція стабільно трансфікованих клональних клітинних ліній, що проявляють високу чутливість, способом серійних розведень

[0214] Наступний приклад ілюструє, як ідентифікувати клональні клітини зі стабільно трансфікованою стабільною клітинною лінією, які сприйнятливі до дії ендопептидази зі зміненою націленістю або мають здатність до поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю.

35 [0215] Для клонування єдиної клітини з відібраних клітин, описаних вище, використовувався метод клонування клітинної лінії способом обмежуючого розведення. Клітини обробляли трипсином, рахували, розводили до концентрації 0,5-1 клітин на 100 мкл, і висівали по 100 мкл на лунку на селективні середовища в п'ятьох 96-лункових планшетах покритих полі-D-лізином. Клітини інкубували більше 2 тижнів, поки на дні лунок не сформувалися колонії. Відмічали

позитивні колонії, що утворюються з єдиних клітин. Фотографії клонів робили за допомогою камери мікроскопа. Клітини з лунок з єдиним клоном вирощували протягом ще одного тижня й переносили в 24-лункові планшети через приблизно через 4 тижні від початку клонування.

- 5 [0216] Головним критерієм, який використовується для добору позитивних клонів, був рівень розщеплення SNAP-25 після обробки Noc/A або Dyn/A, який вимірювали за допомогою аналізу методом Вестерн-блотінга з антитілами, які розпізнають як інтактний, так і розщеплений антиген SNAP-25. Клоні, надекспресуючі ORL-1, тестували з 10 нМ, і 30 нМ ендopeптидази зі зміненою націленістю Noc/A протягом ночі, як тільки з'являлася достатня кількість клітин (Таблиця 8).
- 10 Клоні, надекспресуючі KOR-1, тестували з 100 нМ ендopeптидази зі зміненою націленістю Dyn/A, протягом ночі (Таблиця 9). Крім того, клоні, надекспресуючі KOR-1, тестували за допомогою тесту зв'язування Динорфіну, як описано в Прикладі I.

Таблиця 8

Скринінг на одиничну дозу стабільно трансфікованих ORL-1 клональних клітинних ліній-кандидатів за допомогою ендopeптидази зі зміненою націленістю Noc/A

Клітинна лінія	Номер клону	Поглинання при 10 нМ Noc/A	Поглинання при 30 нМ Noc/A	Повторний скринінг при 1 нМ (% розщеплення)
AGN P33	1	+	+	28 %
AGN P33	2	++	+++	50 %
AGN P33	3	–	+	НТ
AGN P33	4	АЛЕ	АЛЕ	НТ
AGN P33	5	-	+	31 %
AGN P33	6	++	+++	60 %
AGN P33	7	+	+	14 %
AGN P33	8	+	+	НТ
AGN P33	9	+	+	38 %
AGN P33	10	+	++	29 %
AGN P33	11	+	+	НТ
AGN P33	12	+	+	27 %
ND7	1C11	НТ	++	НТ
ND7	2F3	НТ	–	НТ
ND7	1D10	НТ	–	НТ
ND7	1F9	НТ	–	НТ
ND7	1G10	НТ	–	НТ
ND7	2D8	НТ	–	НТ
ND7	2E2	НТ	–	НТ
ND7	4B7	НТ	+++	НТ
ND7	3C11	НТ	–	НТ
ND7	3C3	НТ	+	НТ
ND7	3E8	НТ	–	НТ
ND7	3E11	НТ	–	НТ
ND7	2G3	НТ	–	НТ
ND7	4D5	НТ	+	НТ
ND7	4D8	НТ	+	НТ
ND7	4C8	НТ	–	НТ

Таблиця 8

Скринінг на одиничну дозу стабільно трансфікованих ORL-1 клональних клітинних ліній-кандидатів за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю Noc/A

Клітинна лінія	Номер клону	Поглинання при 10 нМ Noc/A	Поглинання при 30 нМ Noc/A	Повторний скринінг при 1 нМ (% розщеплення)
ND7	4C9	HT	+++	HT
ND7	4E8	HT	+	HT
ND7	2E6	HT	++	HT
ND7	4F4	HT	+++	HT
ND7	5D6	HT	–	HT
ND7	5G3	HT	–	HT
ND7	4D5	HT	++	HT
ND15	1C10	HT	+	HT
ND15	1F10	HT	++	HT
ND15	2D8	HT	++	HT
ND15	2E11	HT	–	HT
ND15	2F4	HT	++	HT
ND15	2F10	HT	++	HT
ND15	2F11	HT	–	HT
ND15	3C4	HT	+	HT
ND15	3C7	HT	++	HT
ND15	3E8	HT	+++	HT
ND15	4C8	HT	+	HT
ND15	4D8	HT	+	HT
SK-N-DZ	№2	–	–	HT
SK-N-DZ	№4	–	–	HT
SK-N-DZ	№5	+++	++	HT
SK-N-DZ	№6	HT	++	HT
SK-N-DZ	№7	+	HT	HT
SK-N-DZ	№8	–	HT	HT
SK-N-DZ	№9	+	HT	HT
SK-N-DZ	№10	–	HT	HT
SK-N-DZ	№11	+	+++	HT
SK-N-DZ	№12	–	HT	HT
SK-N-DZ	№14	++	HT	HT
SK-N-DZ	№16	–	HT	HT
SK-N-DZ	№17	+	+++	HT
SK-N-DZ	№19	+	+++	HT
SK-N-DZ	№20	–	HT	HT
SK-N-DZ	№23	HT	++	HT
SK-N-DZ	№25	–	HT	HT
SK-N-DZ	№26	–	++	HT

Таблиця 8

Скринінг на одиничну дозу стабільно трансфікованих ORL-1 клональних клітинних ліній-кандидатів за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю Noc/A

Клітинна лінія	Номер клону	Поглинання при 10 нМ Noc/A	Поглинання при 30 нМ Noc/A	Повторний скринінг при 1 нМ (% розщеплення)
SK-N-DZ	№27	+	НТ	НТ
SK-N-DZ	№28	++	+	НТ
SK-N-DZ	№30	++	НТ	НТ
SK-N-DZ	№31	–	НТ	НТ
SK-N-DZ	№32	++	++	НТ
SK-N-DZ	№33	+	НТ	НТ
SK-N-DZ	№34	+++	НВ	НТ
SK-N-DZ	№35	+	++	НТ
SK-N-DZ	№36	–	НТ	НТ
SK-N-DZ	№37	+++	++	НТ
SK-N-DZ	№42	–	НТ	НТ
SK-N-DZ	№43	+	++	НТ

НВ: Не визначено; НТ: Не тестували.

–: немає поглинання; +: мінімальне поглинання; ++: помірне поглинання; +++: істотне поглинання

Таблиця 9

Скринінг на одиничну дозу стабільно трансфікованих KOR-1 клональних клітинних ліній-кандидатів за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю Dyp/A

Клітинна лінія	Номер клону	Поглинання при 100 нМ Dyp/A	Зв'язування при 100 нМ Dyp	Відібрані для подальшого тестування
SiMa	2	–	–	Немає
SiMa	6	+	+	Немає
SiMa	8	+	+	Немає
SiMa	12	+++	++	Так
SiMa	14	++	++	Немає
SiMa	20	+	++	Немає
SiMa	25	++	++	Немає
AGN P33	1	+++	+	Так
AGN P33	3	++	+	Немає
AGN P33	5	++	+	Так
AGN P33	6	++	+	Немає
AGN P33	7	+++	+	Так
AGN P33	8	++	+	Так
AGN P33	9	+++	+	Так
AGN P33	10	+++	+	Так

Таблиця 9

Скринінг на одиничну дозу стабільно трансфікованих KOR-1 клональних клітинних ліній-кандидатів за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю Dyp/A

Клітинна лінія	Номер клону	Поглинання при 100 нМ Dyp/A	Зв'язування при 100 нМ Dyp	Відібрані для подальшого тестування
AGN P33	11	++	+	Немає
AGN P33	12	+++	+	Так
AGN P33	14	+	+	Немає
AGN P33	16	++	+	Немає
AGN P33	17	+++	+	Так
AGN P33	21	+	++	Немає
ND7	A1	+	+	Немає
ND7	A2	–	–	Немає
ND7	A3	–	–	Немає
ND7	A4	–	–	Немає
ND7	A5	–	–	Немає
ND7	A6	–	–	Немає
ND7	A7	–	–	Немає
ND7	A8	–	–	Немає
ND7	A9	–	–	Немає
ND7	A10	–	–	Немає
ND7	A11	–	–	Немає
ND7	A12	+++	+++	Так
ND7	B1	–	–	Немає
ND7	B2	–	–	Немає
ND7	B3	–	–	Немає
ND7	B4	–	–	Немає
ND7	B5	+	+	Так
ND7	B6	–	–	Немає
ND7	B7	–	–	Немає
ND7	B8	–	–	Немає
ND7	B9	–	–	Немає
ND7	B10	–	–	Немає
ND7	B11	–	–	Немає
ND7	B12	–	–	Немає
ND7	C1	–	–	Немає
ND7	C2	–	–	Немає
ND7	C3	–	–	Немає
ND7	C4	–	–	Немає
ND7	C5	–	–	Немає
ND7	C6	+	+	Немає
ND7	C7	–	–	Немає

Таблиця 9

Скринінг на одиничну дозу стабільно трансфікованих KOR-1 клональних клітинних ліній-кандидатів за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю Dyp/A

Клітинна лінія	Номер клону	Поглинання при 100 нМ Dyp/A	Зв'язування при 100 нМ Dyp	Відібрані для подальшого тестування
ND7	C8	–	–	Немає
ND7	C9	–	–	Немає
ND7	C10	–	–	Немає
ND7	C11	–	–	Немає
ND7	C12	–	–	Немає
ND7	D1	–	–	Немає
ND7	D2	–	–	Немає
ND7	D3	–	–	Немає
ND7	D4	–	–	Немає
ND7	D5	–	–	Немає
ND7	D6	++	++	Так
ND7	D7	++	++	Так
ND7	D8	–	–	Немає
ND7	D9	–	–	Немає
ND7	D10	–	–	Немає
ND7	D11	–	–	Немає
ND7	D12	–	–	Немає
ND7	E1	–	–	Немає
ND7	E2	–	–	Немає
ND7	E3	–	–	Немає
ND7	E4	–	–	Немає
ND7	E5	–	–	Немає
ND7	E6	–	–	Немає
ND7	E7	–	–	Немає
ND7	E8	–	–	Немає
ND7	E9	–	–	Немає
ND7	E10	–	–	Немає
ND7	E11	–	–	Немає
ND7	E12	++	++	Так
ND7	F1	–	–	Немає
ND7	F2	–	–	Немає
ND7	F3	–	–	Немає
ND7	F4	–	–	Немає
ND15	A1	–	–	Немає
ND15	A2	–	–	Немає
ND15	A3	+	–	Немає
ND15	A4	+	–	Немає

Таблиця 9

Скринінг на одиничну дозу стабільно трансфікованих KOR-1 клональних клітинних ліній-кандидатів за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю Dyp/A

Клітинна лінія	Номер клону	Поглинання при 100 нМ Dyp/A	Зв'язування при 100 нМ Dyp	Відібрані для подальшого тестування
ND15	A5	–	–	Немає
ND15	A6	++	–	Немає
ND15	A7	++	–	Немає
ND15	A8	++	–	Немає
ND15	A9	+	–	Немає
ND15	A10	+	–	Немає
ND15	A11	–	–	Немає
ND15	A12	–	–	Немає
ND15	B1	–	–	Немає
ND15	B2	++	–	Немає
ND15	B3	–	–	Немає
ND15	B4	–	–	Немає
ND15	B5	+++	–	Так
ND15	B6	+	–	Немає
ND15	B7	–	–	Немає
ND15	B8	–	–	Немає
ND15	B9	–	–	Немає
ND15	B10	–	–	Немає
ND15	B11	–	–	Немає
ND15	B12	–	–	Немає
ND15	C1	–	–	Немає
ND15	C2	+++	+	Так
ND15	C3	–	–	Немає
ND15	C4	–	–	Немає
ND15	C5	+	НТ	Немає
ND15	C6	+++	НТ	Так
SK-N-DZ	№11	НТ	НТ	НВ

НВ: Не визначено; НТ: Не тестували.

–: немає поглинання; +: мінімальне поглинання; ++: помірне поглинання; +++: істотне поглинання

4. Скринінг стабільно трансфікованих клональних клітинних ліній на дозову відповідь за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю

[0217] Стабільно трансфіковані клональні клітинні лінії-кандидати з розділу 3, що показують істотне поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю Nos/A досліджували в тесті на повнодозову відповідь, для визначення чутливості до ендопептидази зі зміненою націленістю Nos/A та її ефективності. Клітини засівали в 96-лункові, покриті полі-D-лізином, або Колагеном IV, планшети в кількості 1 × 10⁵ клітин/лунку в середовищі RPMI1640, що містить добавки N2, B27 й NGF (50-100 нг/мл) і вирощували 20±4 годин до обробки складом. Клітини з батьківської клітинної лінії AGN P33 і клональної клітинної лінії ND7 обробляли 0, 0,14 нМ, 0,4 нМ, 1,23 нМ,

3,7 нМ, 11,1 нМ, 33,3 нМ й 100 нМ Нос/А у тому ж самому середовищі протягом 24 годин плюс інкубували 24 години на середовищі без ендопептидази зі зміненою націленістю, щоб допустити розщеплення SNAP-25. Клітини з батьківської клітинної лінії AGN P33 також обробляли 0, 0,03 нМ, 0,08 нМ, 0,24 нМ, 0,74 нМ, 2,22 нМ, 6,67 нМ й 20 нМ Нос/А у тому ж самому середовищі протягом 24 годин плюс інкубували 24 години на середовищі без ендопептидази зі зміненою націленістю, щоб допустити розщеплення SNAP-25. Середовище видаляли, клітини відмивали й лізували для дослідження "сендвіч"-методом ІФА з посиленою хемілюмінесценцією як деталізовано в Прикладі II. Дані від батьківської клітинної лінії AGN P33 і клональних клітинних ліній, стабільно трансфікованих рецептором ORL-1, наведені в Таблиці 10. Клоні №2 й №6 продемонстрували кращу чутливість до ендопептидази зі зміненою націленістю Нос/А та її більш високу ефективність, ніж батьківська клітинна лінія. Більше того, збільшена чутливість нових клональних клітинних ліній дозволила використовувати більш низькі концентрації для дозової відповіді, підтверджуючи, що нові клональні клітинні лінії більш чутливі.

Таблиця 10

Зведена таблиця значень співвідношення сигналу до шуму (С/Ш) і EC_{50} трьох найбільш чутливих клонів, надекспресуючих ORL-1 на фоні клітинної лінії AGN P33.

	Батьківська лінія	Клон 2	Клон 6	Клон 8
Співвідношення С/Ш 0,03 нМ/ВК		41	26	1,8
Співвідношення С/Ш 20 нМ/ВК		259	522	33,1
Співвідношення С/Ш 0,14 нМ/ВК				
Співвідношення С/Ш 100 нМ/ВК				
EC_{50} (нМ)	6,8±1,1	0,6±0,1	0,7±0,07	0,3±0,2

[0218] Дані від батьківських клітинних ліній ND7 і клональних клітинних ліній, стабільно трансфікованих рецептором ORL-1, наведені в Таблиці 11. Всі протестовані клони продемонстрували покращену чутливість до ендопептидази зі зміненою націленістю Нос/А й її більшу ефективність у порівнянні з батьківською клітинною лінією ND7. Клоні 4B7, 1E6, і 1C11 виявилися самими чутливими й мали значення EC_{50} нижче 10 нМ.

Таблиця 11

Зведена таблиця значень співвідношення сигналу до шуму (С/Ш) і EC_{50} шести найбільш чутливих клонів, надекспресуючих ORL-1 на фоні клітинної лінії ND7.

	Батьківська лінія	1C11	4B7	4C9	4F4	1E6	3E9
Співвідношення С/Ш 0,14 нМ/ВК	1,7	9,3	11,1	5,3	3,6	5,8	5,1
Співвідношення С/Ш 100 нМ/ВК	53	217	243	126	169	123	121
EC_{50} (нМ)	>50	8,6±2	5,7±0,5	33±11	24±5	6,7±1	>30 нМ

[0219] У таблиці 12 наведені результати, одержані від виробництва й тестування клональних клітинних ліній, надекспресуючих рецептор ORL-1 на фоні різних клітинних ліній.

Таблиця 12

Огляд клональних клітинних ліній, які надекспресують рецептор ORL-1 людини, протестованих за допомогою Noc/A

Вихідна клітинна лінія	Вид	Стабільні клітинні лінії, протестовані з повною дозою Noc/A	EC ₅₀ (нМ)
AGN P33	Нейробластома людини	Три	0,6-2,5
ND7	Нейробластома пацюки й гібрид DRG	Шість	3,7-8
SK-N-DZ	Нейробластома людини	Немає (сім стабільних клонів відібрані для подальшого дослідження)	Н/п

Приклад V

Одержання клональних клітинних ліній з батьківської клітинної лінії SK-N-DZ

5 [0220] Наступний приклад ілюструє ідентифікацію клітин клонів з батьківської стабільної клітинної лінії, які сприйнятливі до інгібування екзоцитозу за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю або мають здатність поглинати ендопептидазу зі зміненою націленістю.

1. Виділення клональних клітинних ліній

10 [0221] Під час вивчення клітинної лінії SK-N-DZ ми виявили, що клітини, які складають цю стабільну клітинну лінію, містили клітини принаймні п'яти різних фенотипів. Для визначення, чи відповідає який-небудь із цих фенотипів клітин за сприйнятливості цієї клітинної лінії до інгібування екзоцитозу за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю, проводили два різних скринінги способом обмежуючого розведення, в результаті чого одержували одиночні колонії клітин кожного фенотипу.

15 [0222] Культуру клітин підходящої щільності з маткового розчину культури SK-N-DZ вирощували в колбі T175, покритій Колагеном IV, що містить DMEM, 10 % ембріональну бичачу сироватку (інактивовану високою температурою), 0,1 мМ незамінних амінокислот, 10 мМ HEPES, 1 мМ пірувату натрію, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину. Після другого пересівання клітини обробляли трипсином, для одержання клітинної суспензії, і визначали концентрацію клітин. Приблизно $4,0 \times 10^6$ клітин із цієї суспензії переносили в пробірку на 50 мл і розділяли на одиночні клітини інтенсивним пропусканням декілька раз через голку розміром 18.5, за допомогою шприца на 10 мл. Клітини із цієї розділеної одноклітинної суспензії розбавляли до концентрації $0,2 \times 10^6$ клітин/мл, додаванням 15 мл нового живильного середовища, й 2,5 мкл цього розведення додавали до 50 мл нового живильного середовища для одержання концентрації 10 клітин/мл. 100 мкл живильного середовища із цього кінцевого розведеного маткового розчину культури додавали в кожну лунку 96-лункових планшетів, покритих Колагеном IV, і клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу без струшування протягом чотирьох тижнів. Чотири 96-лункові планшети використовували для аналізу. Через чотири тижні кожну лунку досліджували під мікроскопом для ідентифікації зростаючих одиночних колоній, і в лунку до кожної знайденої колонії додавали 100 мкл нового живильного середовища клітини, вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу без струшування протягом двох тижнів. Ще через два тижні росту, одиночні колонії, що ростуть, обробляли трипсином і переносили в нові 96-лункові планшети для наступного росту. Як тільки колонії виростили відповідно до візуального спостереження приблизно до 1000 клітин, їх обробляли трипсином, і кожну клітинну суспензію переносили в нову лунку 24-лункового, покритого Колагеном IV, планшету. Клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу в новому живильному середовищі, що поповнювалося при необхідності кожні 2-3 дні. Клітини вирощували, поки культура не досягала приблизно 60 % змикання або більше, при цьому їх обробляли трипсином, і кожну клітинну суспензію переносили в покриту Колагеном IV колбу площею 25 см², на основі змикання клітин в 24-лунковому планшеті. Клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу в новому живильному середовищі, що поповнювалося кожні 2-3 дня, при необхідності. Як тільки клітини в колбі досягли змикання 70-80 %, їх заморожували й зберігали в рідкому азоті до дослідження на сприйнятливості до інгібування екзоцитозу ендопептидазою зі зміненою націленістю Noc/A. З 384 колоній спочатку виділених з обох скринінгів, на основі

критеріїв життєздатності й росту, відібрали 24 клональних клітинні лінії, їх вирощували для наступних процедур скринінга. З них виділили 12 швидко зростаючих клітинних ліній.

2. Первинний скринінг чутливості клітин із клональної клітинної лінії до активності ендопептидази зі зміненою націленістю за допомогою ендопептидази зі зміненою націленістю.

5 [0223] Для визначення, чи сприйнятливі клітини із клональної клітинної лінії до активності ендопептидази зі зміненою націленістю Noc/A, первинний скринінг проводили, за допомогою імунологічного способу визначення активності ендопептидази.

10 [0224] Тринадцять клонів SK-N-DZ (№3, №4, №5, №8, №9, №10, №13, №15, №16, №17, №18, №22, і №23) плюс батьківські клітини SK-N-DZ висівали в 96-лунковий планшет (число клітин на лунку невідоме) в ЕМЕМ, 10 % ЕБС, 1 × 27, і 1 × 2 й інкубували протягом ночі. Клітини обробляли Noc/A у концентрації 1 нМ протягом 24 годин. Клітини лізували в 100 мкл лізуючого буфера протягом 20 хвилин і центрифугували при 4000 об/хв протягом 20 хвилин. До 50 мкл лізату додавали п'ятдесят мікролітрів 2х ДСН буфера для зразків і нагрівали до 95 °C протягом 5 хвилин. Десять мікролітрів білкових зразків завантажували у лунку 12 % гелю NuPage і

15 проводили аналіз за допомогою Вестерн-блотінга як описано в Прикладі І. Оцінка кількості загального SNAP-25 і розщепленого SNAP-25 показала, що клони №3, №8, №15, і №22 здатні до поглинання Noc/A, принаймні, як батьківські клітини. Обробка для тесту на повнодозову відповідь й аналіз за допомогою "сендвіч"-методом ІФА з посиленою хемілюмінесценцією проводилися після того як кількість клітин збільшили.

20 3. Вторинний скринінг на відповідь клональних клітинних ліній за допомогою молекул ендопептидази зі зміненою націленістю.

[0225] Для визначення, чи сприйнятливі клітини із клональної клітинної лінії до активності ендопептидази зі зміненою націленістю Noc/A, проводили вторинний скринінг, за допомогою імунологічного способу визначення активності ендопептидази.

25 [0226] Для подальшого порівняння цих клонованих клітинних ліній SK-N-DZ, проводили ECL «сендвіч»-методу ІФА. П'ять клонів (№3, №9, №15, №16, №22) плюс батьківські клітини SK-N-DZ засівали в 96-лункові, покриті полі-D-лізином, планшети, по клітинній лінії на планшет, у кількості 25000 клітин на лунку в середовищі, RPMI 1640 з 10 % ЕБС, 1х B27, і 1х N2 (без NGF) і вирощували протягом вихідних. Клітини обробляли Noc/A у дозах від 0 до 20 нМ (0, 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67, 20 нМ) протягом 24 годин. Кількісно розщепленого SNAP-25197 визначали способом ECL ІФА як описано в Прикладі І.

30

[0227] У таблиці 13 наведені значення EC₅₀ і співвідношення сигнал-шум для п'яти клонів та їх батьківської клітинної лінії. У порівнянні з батьківською клітинною лінією, клони №16 й №22 демонстрували подібні значення EC₅₀ (~ 2 нМ), а три клони, названі №3, №9, і №15, демонстрували менші значення EC₅₀ (<1 нМ). Однак, загальний сигнал від розщепленого SNAP-25 був вище в клонах №3, №22 і батьківських клітинах. Клони №9, №16, і №15 мали більш низький загальний рівень сигналу в порівнянні з іншими клітинними лініями.

35

Таблиця 13

Зведена таблиця значень співвідношення сигналу до шуму (С/Ш) і EC₅₀ п'яти клонів, одержаних із клітин SK-N-DZ за допомогою клонування шляхом обмежуючого розведення.

	Батьківська лінія	3	9	19	16	22
Співвідношення С/Ш 0,03 нМ/БК	2	3	2	2	2	3
Співвідношення С/Ш 20 нМ/БК	19	27	12	8	14	20
EC ₅₀ (нМ)	2,6±1,5	0,8±0,07	0,7±0,04	0,6±0,1	2,2±0,8	1,9±0,6

40 [0228] Умови обробки Noc/A клонів SK-N-DZ оптимізовували, і проводили аналіз, що порівнює клони №3, №15, №22, і гетерогенну батьківську клітинну лінію SK-N-DZ. У Таблиці 14 показані результати порівняння й продемонстровано, що оптимізація аналізу сильно покращила співвідношення сигнал-шум. Клони №3 й №22 відбирали для подальшої розробки аналізу, оскільки вони мають чудову чутливість й ефективність.

45

Таблиця 14

Зведена таблиця значень співвідношення сигналу до шуму (С/Ш) і EC_{50} трьох клонів, одержаних із клітин SK-N-DZ з використання оптимізованих умов.

	Батьківська лінія	3	15	22
Співвідношення С/Ш 0,03 нМ/ВК	15	8	5	10
Співвідношення С/Ш 20 нМ/ВК	107	89	33	60
EC_{50} (нМ)	0,6±0,2	0,9±0,2	0,6±0,1	0,4±0,09

Приклад VI

Дослідження й порівняння клональних клітинних ліній за критерієм поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю

[0229] Наступний приклад ілюструє дослідження й порівняння клональних клітинних ліній, одержаних або із стабільних клітинних ліній, що включають гетерогенну популяцію, або за допомогою трансфекції рецептора-мішені й наступного клонування клітинної лінії.

[0230] Для оцінки специфічності або вибіркової поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю проводили тести на неспецифічне поглинання, використовуючи ендопептидазу зі зміненою націленістю, у якій відсутній націлюючий домен. У випадку ендопептидази зі зміненою опіоїдною націленістю клітини клону №6 клітинної лінії AGN P33 (що включають клітини, стабільно трансфіковані експресійною конструкцією, що кодує рецептор ORL-1) і клональні клітинні лінії №3 й №22 SK-N-DZ (що включають клітини, які експресують ендогенний рецептор ORL-1) засівали по 150000 клітин на лунку 96-лункових планшетів, покритих полі-D-лізином, у середовище без сироватки RPMI 1640, що містить добавки N2 й B27 й NGF (50 нг/мл), і інкубували протягом 20±4 годин при 37° в інкубаторі з 5 %-им вмістом CO_2 перед етапом обробки сполуками. Клітини обробляли 8 дозами Noc/A у діапазоні 0-20 нМ або 0-40 нМ та/або 8 дозами LHN/A у діапазоні від 0 до 400 нМ або від 0 до 40 нМ у тому ж самому середовищі протягом 22 годин. Середовище видаляли й клітини промивали, лізували й центрифугували для видалення залишків клітин при підготовці до тесту за допомогою "сендвіч"-методу твердофазного ІФА. Планшет для ІФА з іммобілізованими моноклональними антитілами 2E2A6 блокували в 150 мкл блокуючого буфера при кімнатній температурі протягом 1 години. Після блокування буфер видаляли, у кожен лунку додавали 30 мкл лізату клітин й інкубували планшет при 4 °C протягом 2 годин. Планшети тричі промивали ФБР-Т й у нижній кут лунок додавали 30 мкл поліклональних детектуючих антитіл α -SNAP25, маркованих складним ефіром SULFO-TAG N-ГС, у концентрації 5 мкг/мл в 2 % блокуючого реактиву у ФБР-Т. Планшет запечатували й струшували при кімнатній температурі протягом 1 години, після чого тричі відмивали у ФБР-Т. Після завершення відмивань, у кожен лунку додавали 150 мкл 1х буфера для зчитування, і планшет зчитували в пристрої для зчитування зображень SI6000. Результати у порівнянні поглинання Noc/A стосовно негативного контролю LHN/A наведені в Таблиці 15 і Таблиці 16. Ці результати демонструють наявність чіткого розділення між поглинанням Noc/A й LHN/A в обох клітинних лініях, що свідчить про специфічність поглинання Noc/A.

Таблиця 15

Неспецифічне поглинання у клону №3 SK-N-DZ. Наведені дані на основі чотирьох незалежних експериментів

нМ	% Неспецифічного поглинання	СПС (стандартна помилка середнього)
0	2	0,5
1	6	0,5
2	8	0,5
5	10	1
15	19	0,9
44	33	1,5
133	65	2,4
400	93	2,3

Таблиця 16

Неспецифічне поглинання у клітин hORL-1 №6. Наведені дані на основі трьох незалежних експериментів

нМ	% Неспецифічного поглинання	СПС (стандартна помилка середнього)
0	1	0,2
1	2	0,2
2	3	0,6
5	3	0,3
15	8	1,3
44	12	1,9
133	22	3,0
400	32	3,0

5 [0231] У Таблиці 17 узагальнені результати дослідження й порівняння трьох клітинних ліній. Клональні клітинні лінії №3 й №22 SK-N-DZ характеризуються чутливістю, ідентичною первинним eDRG, і відмінним співвідношенням сигналу до шуму, що підходить для створення надійного тесту на ендопептидазу зі зміненою націленістю Noc/A. Клональна клітинна лінія №6 AGN P33 також є відмінним кандидатом з низьким неспецифічним поглинанням і підходящою чутливістю.

Таблиця 17.

Показник	Клон 3 SK-N-DZ	Клон 22 SK-N-DZ	Клон 6 AGN P33	eDRG
Вид-джерело клітинної лінії	Клональная людська	Клональная людська	Клональная людська	Первинна пацюка
Експресія клітинного рецептора	Ендогенний людський ORL1	Ендогенний людський ORL1	Трансфікований людський ORL1	Ендогенний щурячий ORL1
Динамічний діапазон	Відповідь від дози 0,03 до 20 нМ	Відповідь від дози 0,03 до 20 нМ	Відповідь від дози 0,04 до 40 нМ	Відповідь від дози 0,17 до 20 нМ
Чутливість (EC ₅₀)	EC ₅₀ =0,75±0.1 (N=10)	EC ₅₀ =0.8±0.2 (N=9)	EC ₅₀ =2.4±0.2 (N=21)	EC ₅₀ =0.8±0.15 (N=6)
ВЛНК	20 нМ	20 нМ	20 нМ	10-20 нМ
С/Ш ВЛНК/ фон	98±15 (N=10)	86±17 (N=9)	385±32 (N=19)	~300
С/Ш НЛНК/ фон	12±2 (N=11)	10±2 (N=9)	29±7 (N=18)	Н/П
Специфічність порівнянні з LH _N /A	≥ 2 log (N=4)	≥ 2 log (N=4)	≥ 2 log (N=3)	Н/П
Експресія SNAP-25	Ендогенна	Ендогенна	Ендогенна	Ендогенна
Конкуренція ноцицептиновим варіантом	Повна конкуренція (n=4)	Повна конкуренція (n=4)	Часткова конкуренція (n=4)	Н/П
Інгібування антитілами проти ноцицептину	Повна конкуренція (n=4)	Повна конкуренція (n=4)	Повна конкуренція (n=4)	Н/П
Інгібування антитілами анти-668	Часткова конкуренція (n=4)	Часткова конкуренція (n=4)	Часткова конкуренція (n=4)	Н/П

10 [0232] Для оцінки чутливості поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю проводили тести на насичення зв'язування ліганду. Взаємодія більшості лігандів з їхніми ділянками зв'язування можна охарактеризувати в смислі афінності зв'язування (Посібник з тестів NIH). Взагалі, висока афінність зв'язування має на увазі більш тривалий час знаходження ліганду у відповідному сайті зв'язування рецептора, ніж у випадку низької афінності зв'язування. Константу дисоціації зазвичай використовують для опису афінності між лігандом (L) (таким як

15

препарат) і білком (P), тобто ступеню міцності зв'язування ліганду з конкретним білком. В експерименті стосовно насичення зв'язування в рівновазі вимірюють загальне й неспецифічне зв'язування (НСЗ) з різними концентраціями радіоактивно міченого ліганду. Рівноважну константу дисоціації або афінність до радіоактивно міченого ліганду, K_d , і максимальне число ділянок зв'язування рецептора, B_{max} , можна обчислити на основі специфічного зв'язування (загальне – НСЗ) з використанням нелінійного регресійного аналізу. K_d для специфічного зв'язування можна обчислити, використовуючи нелінійний регресійний аналіз гіперболічної кривої зв'язування з однією ділянкою (тобто GraphPad Prism) як показано в наведеному нижче рівнянні, де B_{max} являє собою максимальне число ділянок зв'язування (пмоль/мг або пмоль/клітину або ділянку/клітину), а K_d (нМ, пМ і т.д.) являє собою концентрацію радіоактивно міченого ліганду, необхідну для досягнення половини максимального рівня зв'язування:

$$Bound = \frac{B_{max} \times [L]}{[L] + K_d}$$

[0233] Для тесту з ендопептидазою зі зміненою опіоїдною націленістю клітини із клітинної лінії клону №6 AGN P33 (що включає клітини, стабільно трансформовані експресійною конструкцією, що кодує рецептор ORL-1), батьківської клітинної лінії SK-N-DZ і клональних клітинних ліній SK-N-DZ №3, №15 й №22 (що включає клітини, які експресують ендогенний рецептор ORL-1) засівали по 200000 клітин на лунку в 48-лункові покриті полі-D-лізин планшети в середовище без сироватки RPMI 1640, що містить добавки 1x N2 й 1x B27, та інкубували протягом ночі при 37 °C в інкубаторі з 5 %-м CO₂. Середовище видаляли, і клітини разом з 150 мкл буфера для зв'язування на основі Tris додавали в лунки для оцінки загального зв'язування, а 100 мкл буфера для зв'язування на основі Tris додавали в лунку для оцінки неспецифічного зв'язування. У лунки для оцінки неспецифічного зв'язування додавали близько 50 мкл 4x кінцевої концентрації неміченого ноцицептину (2,5 мкМ для клітинних ліній SK-N-DZ й 1 мкМ для клональної клітинної лінії №6 AGN P33), і 50 мкл 4x кінцевої концентрації 3H-ноцицептину (0 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,2 нМ, 0,4 нМ, 0,8 нМ, 1,6 нМ, 3,1 нМ, 6,3 нМ, 12,5 нМ, 25 нМ й 50 нМ для клітинних ліній SK-N-DZ й 0, 0,01 нМ, 0,02 нМ, 0,039 нМ, 0,078 нМ, 0,156 нМ, 0,313 нМ, 0,625 нМ, 1,25 нМ, 2,5 нМ, 5,0 нМ й 10 нМ для клональної клітинної лінії №6 AGN P33) додавали як у лунки для оцінки загального зв'язування, так й у лунки для оцінки неспецифічного зв'язування до кінцевого об'єму 200 мкл. Після інкубації при 37 °C протягом 30 хвилин лунки двічі промивали 0,5 мл холодного буфера для промивання. Клітини денатурували в 200 мкл 2N NaOH і переносили сцинтиляційні флакони на 20 мл, що містять 5 мл сцинтиляційної рідини. Вихідні дані використовували для побудови кривих доза-ефект й обчислення K_d для кожного зразка. Одержані вихідні дані переносили в SigmaPlot v10.0 і використовували підбор насичення однієї ділянки для побудови кривих доза-ефект у категорії рівнянь зв'язування ліганду. Одержували графічні звіти, які містили наступні параметри: R^2 (коефіцієнт кореляції), B_{max} й $K_d \pm SE$ (Коефіцієнт \pm стандартна помилка). Криві загального зв'язування, специфічного зв'язування й неспецифічного зв'язування одержували в тестах, виконаних на клітинах клональних клітинних ліній №3, №15 й №22 SK-N-DZ і клональній клітинній лінії №6 AGN P33. Клональні клітинні лінії №3 й №22 SK-N-DZ демонстрували залежне від концентрації і насичуване зв'язування 3H-ноцицептину. У тих же самих експериментальних умовах клональна клітинна лінія №15 SK-N-DZ демонструвала залежну від дози відповідь на 3H-ноцицептин, але не досягала насичення при найвищій дозі 50 нМ. У порівнянні із клітинними лініями SK-N-DZ, що експресують ендогенний ORL-1, клітини із клональної клітинної лінії №6 AGN P33 демонстрували значно більш високу афінність зв'язування з 3H-ноцицептином (найвища доза становила 10 нМ у порівнянні з 50 нМ для SK-N-DZ) при низькому неспецифічному зв'язуванні.

[0234] Криві насичення зв'язування для клональних клітинних ліній №3, №22 й №15 SK-N-DZ і клональної клітинної лінії №6 AGN P33 використовували для оцінки значень K_d й B_{max} із трьох незалежних експериментів згідно зв'язуванню для кожної клітинної лінії, проведених у три різні дні. Ранжируваний порядок цих чотирьох клітинних ліній такий: клональна клітинна лінія №6 AGN P33 ($K_d=1,86$ нМ й $B_{max}=2,9$ фмоль/клітину) > клональна клітинна лінія №3 SK-N-DZ ($K_d=14$ нМ й $B_{max}=0,6$ фмоль/клітину) \geq клональна клітинна лінія №22 SK-N-DZ ($K_d=17$ нМ й $B_{max}=0,6$ фмоль/клітину) >> клональна клітинна лінія №15 SK-N-DZ ($K_d>50$ нМ). Для одержання даних доза-ефект із насиченням для клональної клітинної лінії №15 SK-N-DZ необхідно використовувати більш високий діапазон доз 3H-ноцицептину. Таблиця 16 узагальнює дані дослідження ділянок специфічного зв'язування ноцицептину в плазматичній мембрані стабільних клітинних ліній, три з яких являють собою клональні клітинні лінії №3, №15 й №22 SK-N-DZ, а четверта – клональну клітинну лінію №6 AGN P33. Дані показали наступне: 1) наявність у клональній клітинній лінії №6 AGN P33 ділянки зв'язування з високою афінністю й дуже низьким неспецифічним зв'язуванням (K_d 1,8 нМ й B_{max} 2,9 фмоль на клітину); 2)

- зв'язування ноцицептину може відбуватися на нативних клітинах SK-N-DZ, що експресують ендогенний рецептор; 3) клональна клітинна лінія №6 AGN P33 мала афінність до ноцицептину, яка приблизно в 10 раз перевищувала таку у клітинних ліній SK-N-DZ; 4) за спостереженнями в клітинному тесті на активність, клональні клітинні лінії №3 й №22 SK-N-DZ (K_d 14-17 нМ, B_{max} 0,6 фмоль на клітину) містили більше рецепторних ділянок у перерахуванні на клітину, ніж клональна клітинна лінія №15 SK-N-DZ (що не досягла насичення в тому ж самому діапазоні доз).

Таблиця 18

Огляд тестів насичення зв'язування 3H -ноцицептину на чотирьох провідних клітинних лініях (n=3 незалежних експериментів)

Клітинні Лінії	K_d (нМ \pm CO)	B_{max} (фмоль/клітину)
SK-N-DZ №3	14 \pm 1,6	0,59
SK-N-DZ №15	>50	АЛЕ
SK-N-DZ №22	16,7 \pm 1,1	0,58
Клональна клітинна лінія №6 AGN P33	1,86 \pm 0,1	2,89

- [0235] Для оцінки чутливості поглинання ендопептидаз зі зміненою націленістю, кількість рецепторів ендопептидаз зі зміненою націленістю, що експресуються на рівні мРНК, оцінювали за допомогою ПЛР-РВ. Кількість рецептора, що експресується в клітинах, є важливим аспектом дослідження клітинної лінії, використовуваної для тестування, і пов'язана із чутливістю до ендопептидази зі зміненою націленістю. Кількість експресованого рецептора ендопептидази зі зміненою націленістю може також бути інструментом для скринінга інших потенційних клітинних ліній і вилучення клітинних ліній, які не експресують рецептор-мішень. Одним з методів для вимірювання експресії рецептора є визначення кількості мРНК рецептора ендопептидази зі зміненою націленістю з використанням ПЛР у реальному часі (ПЛР-РВ).
- [0236] Для дослідження рецептора ендопептидази зі зміненою опіоїдною націленістю РНК виділяли із клітин нетрансфікованої батьківської клітинної лінії SiMa, клітин із клональної клітинної лінії №6 AGN P33, клітин з батьківської клітинної лінії SK-N-DZ і клітин із клональних клітинних ліній №3 й №22 SK-N-DZ, вирощених у середовищі без сироватки або в середовищі із сироваткою. мРНК перетворювали в кДНК, і ORL-1 ампліфікували й вимірювали в реальному часі для визначення відносної кількості, присутньої у кожній клітинній лінії, використовуючи наступні олігонуклеотидні праймери для ORL-1: прямий 5'-CACTCGGCTGGTGGTGGTGG-3' (SEQ ID NO: 148) і зворотний 5'-AATGGCCACGGCAGTCTCGC-3' (SEQ ID NO: 149). Кількість ДНК визначали з використанням барвника SYBR® green (зелений), флуоресценція якого пропорційна кількості дволанцюгової ДНК (ПЛР-продукта), присутньої в реакції. Логістичну криву для кожної реакції будували, зв'язуючи кількість флуоресценції із числом циклів. Чим швидше реакція досягає лінійної фази кривої, тим більше кДНК рецептора ORL-1 присутнє у реакції. Контрольну реакцію ОТ, у яку не додавали фермент, використовували для перевірки наявності забруднень. Оскільки в даній реакції відсутній фермент ОТ, не буде відбуватися синтез кДНК. ПЛР-продукт не може бути синтезований на матриці РНК, тому єдиною можливістю появи кривої ПЛР у реакції -ОТ є забруднення геномної ДНК. У реакціях -ОТ поява кривої ПЛР не спостерігалася, підтверджуючи мінімальний рівень забруднення геномної ДНК (дані не показані). У Таблиці 18 наведені клітинні лінії й відповідні їм значення СТ. СТ являє собою число циклів ПЛР, необхідне для того, щоб сигнал відповідної реакції ПЛР перевищив заданий поріг. Кількість мРНК рецептора ORL-1 у клітинній лінії можна порівняти з даними для інших клітинних ліній за відповідним значенням СТ. Відповідно до значень СТ, вміст мРНК ORL-1 у клітинах із клональної клітинної лінії №6 AGN P33 значно перевищував такий в клітинах з батьківської клітинної лінії SiMa як на середовищі без сироватки (Порівн. СТ: 28,6 й 17,3), так і на середовищі із сироваткою (Порівн. СТ: 26,1 й 16,5). Крім того, відмінності в кількості мРНК, одержаної із клітин з 6 пасажу в порівнянні із клітинами з 16 пасажу клональної клітинної лінії №6 AGN P33, очевидно, мінімальні. Також, відмінності значень СТ і кривих між батьківською клітинною лінією SK-N-DZ і клональними клітинними лініями №3 й №22 мінімальні. Цей висновок справедливий для клітин, вирощених на середовищі із сироваткою й на середовищі без сироватки, і відображує подібність цих клітинних ліній, спостережувану в клітинному тесті на активність Нос/А.

Середні значення СТ із забезпеченням експресії ORL-1 у клітинних лініях

Середовище	Клітинна лінія	Середнє СТ
Середовище без сироватки	Батьківська SiMa p26	28,6
	Клон №6 SiMa hORL-1 p6	17,3
	Клон №6 SiMa hORL-1 p16	17,3
Повне середовище	Батьківська SiMa p26	26,1
	Клон №6 SiMa hORL-1 p6	16,4
	Клон №6 SiMa hORL-1 p16	16,6
Середовище без сироватки	SK-N-DZ	26,3
	Клон №3 SK-N-DZ	25,9
	Клон №22 SK-N-DZ	26,6
Повне середовище	SK-N-DZ	26,2
	Клон №3 SK-N-DZ	25,8
	Клон №22 SK-N-DZ	26,4

Приклад VII

Одержання моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язують епітоп SNAP-25, який має вільний карбокси-кінець у залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A

[0237] Наступний приклад ілюструє виготовлення моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язувати епітоп SNAP-25 з карбокси-кінцем у залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A.

1. Створення моноклональних анти-SNAP-25 антитіл

[0238] Для створення моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язувати SNAP-25 з карбокси-кінцем у залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, автори створили пептид з 13 залишками CDSNKTRIDEANQCOOH (SEQ ID NO: 38) як антиген продукту розщеплення SNAP-25. Цей пептид включає гнучку зв'язуючу область, N-кінцевий залишок цистеїну для зв'язування з KLH, амінокислоти 186-197 SNAP-25 людини (SEQ ID NO: 5) і карбоксильований глютамін на C-кінці (SEQ ID NO: 38). Генерація моноклональних антитіл до добре підібраних, унікальних послідовностей пептиду забезпечує контроль над націленістю епітопа, дозволяючи ідентифікацію особливої субпопуляції білка серед великої кількості близьких одна до одної ізоформ. Пошуки Blast показали, що в цього пептиду є висока гомологія тільки, з SNAP-25 і майже немає можливості перехресної реактивності з іншими білками в нервових клітинах. Послідовність також ретельно досліджували, за допомогою комп'ютерних алгоритмів, для визначення індексу гідрофобності, ймовірності поверхні білка, гнучких областей, і ймовірної вторинної структури, після чого впливала належна орієнтація й надання обраної послідовності пептиду. Пептид синтезували й кон'югували з гемоціаніном равлика (KLH), для збільшення імуногенності. Шість мишей Balb/c були імунізовані цим пептидом, і після трьох імунізацій, зроблених протягом приблизно восьми тижнів, у мишей брали кров для аналізу. Крові дозволяли згорнутися, інкубуючи її при 4 °C протягом 60 хвилин. Зсілу кров центрифугували при 10000x g в 4 °C протягом 10 хвилин для осадження продуктів розпаду клітин. Зразки одержаної сироватки розділяли на аліквоти по 50 мкл і зберігали в -20 °C для подальшого використання.

[0239] Подібна стратегія, основана на інших антигенах SNAP-25, розкритих у даному описі, що використовуються для одержання моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язатися з SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A. Наприклад, антиген SNAP-25 SEQ ID NO: 45 може кон'югувати з KLH замість антигену SNAP-25 з SEQ ID NO: 38. Як інший приклад можна навести амінокислоти 186-197 з SNAP-25 людини з антигену SNAP-25 SEQ ID NO: 38, які 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 на наявність моноклональних анти-SNAP-25 антитіл

[0240] Для визначення наявності моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, виконували порівняльний твердофазний ІФА й клітинний тест розщеплення, з використанням витягнутої з мишей

сироватки. Для порівняльного твердофазного ІФА сконструювали два зшитих білки: BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ з SEQ ID NO: 48 й BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ з SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ являв собою пептид Bir з 16 амінокислот, біотинілірований у природних умовах, SEQ ID NO: 50, який з N-кінця був зв'язаний з пептидом SNAP-25, що включає амінокислоти 134-197 з SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ являв собою біотинілірований у природних умовах пептид Bir з 16 амінокислот з SEQ ID NO: 50 зв'язаний своїм N-кінцем з пептидом SNAP-25, що включає амінокислоти 134-206 з SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ й BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ розводили в 1 x ФБП до концентрації 10 мкг/мл. BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ й BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ наносили на окремі планшети, додаючи приблизно 100 мкл підходящого розчину субстрату й інкубуючи пластини при кімнатній температурі протягом однієї години. Відмиті планшети інкубували при 37 °C протягом двох годин на 0,5 % BSA в 1 x TBS, який містить розведення від 1:10 до 1:100, що містить антитіла сироватки, одержаної від однієї із шести імунізованих мишей (миша 1, миша 2, миша 3, миша 4, миша 5, і миша 6). Планшети, позначені первинними антитілами, відмивали чотири рази по 5 хвилин в 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Відмиті планшети інкубували в 37 °C протягом 1 години на 1 x TBS, який містить розведені 1:10000, поліклональні козячі антитіла проти мишачого IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Іллінойс), як вторинні антитіла. Планшети, позначені вторинними антитілами, відмивали чотири рази в 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Хромогенні детектування позначених продуктів SNAP-25 здійснювали з використанням набору субстратів ImmunoPure TMB (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Іллінойс). Формування жовтого фарбування на планшетах, покритих BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇, але не на планшетах, покритих BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆, вказало на те, що анти-SNAP-25 антитіла вибірково розпізнавали продукт розщеплення SNAP-25₁₉₇. У результаті, автори показали, що із шести мишей, використаних для імунізації, три миші (миша 2, миша 3, і миша 4) мали більш високі титри й більшу специфічність до антигену SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку Р₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A.

[0241] Ці результати підтверджували за допомогою дослідження активності твердофазного ІФА з легким ланцюгом. Планшети Reacti-Bind з 96 лунками, покриті Стрептавідином (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Іллінойс), готували, додаючи приблизно 100 мкл наступних розчинів субстратів: Ряди А-С покривали 100 мкл BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ у дванадцятьох різних концентраціях; Ряди D-H покривали 100 мкл BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ у концентрації 10 мкг/мл. Планшети відмивали шляхом добору розчину субстрату водоструминним насосом і трикратним ополіскуванням кожної лунки 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Розведення BoNT/A попередньо відновлювали в 37 °C протягом 20 хвилин в інкубаційному буфері BoNT/A (50 mM HEPES, pH 7,4, 1 % ембріональна бичача сироватка, 10 mM ZnCl₂, 10 mM дитіотриетол), 100 мкл попередньо відновленого BoNT/A додавали на покриті субстратом планшети й інкубували при 37 °C протягом 90 хвилин. Планшети, оброблені BoNT/A, відмивали шляхом добору інкубаційного буфера BoNT/A водоструминним насосом і трикратного ополіскування кожного планшета 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Відмиті планшети інкубували при 37 °C протягом двох годин на 1 x TBS з 0,5 % BSA, що містить розведення перевіреної, що містить антитіла, сироватки від 1:10 до 1:100. Планшети, позначені первинними антитілами, відмивали чотири рази по 5 хвилин в 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Відмиті планшети інкубували при 37 °C протягом 1 години на 1 x TBS, що містить розведені 1:10000 поліклональні козячі антитіла проти мишачого IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Іллінойс), як вторинні антитіла. Планшети, позначені вторинними антитілами відмивали чотири рази в 200 мкл TBS, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Хромогенне детектування позначених продуктів SNAP-25 здійснювали з використанням набору субстратів ImmunoPure TMB (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Іллінойс). При дослідженні сироватки, яка містить антитіла, одержаної із всіх шести імунізованих мишей (миша 1, миша 2, миша 3, миша 4, миша 5, і миша 6), розвиток жовтого кольору, який корелював з наявністю продукту розщеплення SNAP-25₁₉₇, виявили в зразках, оброблених BoNT/A, але не в неопрацьованих контрольних групах. Таким чином, порівняльний аналіз твердофазного ІФА показав, що серед мишей, використаних для імунізації, у трьох мишей (миша 2, миша 3, і миша 4) були більш високі титри й більша специфічність до антигену SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку Р₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A.

[0242] Для клітинного тесту розщеплення, клітини PC12 підходящої щільності, висівали на планшети для тканинних культур площею 60 мм², що містять 3 мл підходящого живильного середовища на основі сироватки (Таблиця 1). Клітини вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу до досягнення підходящої щільності. 500 мкл розчину для трансфекції готували, додаючи 250 мкл відновленого живильного середовища OPTI-MEM на основі сироватки, що містить 15 мкл LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Карлсбад, Каліфорнія), інкубованого при кімнатній температурі протягом 5 хвилин, до 250 мкл відновленого живильного середовища OPTI-MEM на основі сироватки, що містить 10 мкг конструкції із забезпеченням експресії (SEQ ID NO: 51) pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC. Конструкція із забезпеченням експресії pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC складається з експресійного вектора pQBI-25 (Qbiogene Inc., Карлсбад, Каліфорнія), промоторні елементи якого функціонально пов'язані з полінуклеотидом, що кодує GFP зшитий з легким ланцюгом BoNT/A SEQ ID NO: 52. Цю суміш для трансфекції інкубували при кімнатній температурі протягом приблизно 20 хвилин. Живильні середовища замінювали новими неповними живильними середовищами, й до клітин додавали 500 мкл розчину для трансфекції. Потім їх вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу протягом приблизно 6-18 годин. Клітини відмивали й збирали як описано в Прикладі II. Для детектування наявності розщепленого продукту SNAP-25₁₉₇, аліквоту, взяту від кожного зібраного зразка, аналізували за допомогою Вестерн-блотінга як описано у Прикладі II, за винятком того, що первинне антитіло являло собою розведену 1:1000 сироватку, яка містить антитіло, а вторинні антитіла являли собою розведення 1:20000 мишачих антитіл α-IgG, кон'югованих з пероксидазою хрому (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Іллінойс). Використовуючи сироватку, яка містить антитіла, одержану із трьох мишей (миша 2, миша 3, і миша 4), єдину пофарбовану смугу, що відповідає продукту розщеплення SNAP-25₁₉₇, детектували в зразках, оброблених BoNT/A, але не в неопрацьованих контрольних групах. Таким чином, клітинний тест розщеплення показав, що з мишей, використаних для імунізації, у трьох (миша 2, миша 3, і миша 4) були більш високі титри й більша специфічність до антигену SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A.

3. Одержання гібридом.

[0243] Для створення гібридом анти-SNAP-25, що виробляють моноклональні антитіла, які можуть селективно зв'язуватися з антигеном SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, селезінку миші 2 вилучали через три дні, після заключної "активаторної" імунізації, клітини селезінки гібридизували із клітинами мієломи P3-X63 Ag8.653 з використанням стандартних протоколів гібридом. Ці клітини висівали на п'ять планшетів з 96-ю лунками, гібридів відбирали на живильному середовищі НАТ. Протягом 8-14 днів після злиття виконували перший скринінг приблизно 480 батьківських клонів, з використанням порівняльного твердофазного ІФА з пептидами BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ й BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆, нанесеними на два різних планшети. Порівняльний твердофазний ІФА забезпечив швидкий спосіб скринінга, для ідентифікації гібридом, що виробляють антитіла, специфічні для продукту розщеплення SNAP-25₁₉₇. 18 переважних клонів піддавали подальшому скринінгу, з використанням клітинного тесту розщеплення, описаного вище й імунологічного фарбування клітин, трансфікованих LC/A. (Таблиця 20).

Таблиця 20

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

Клон	Порівняльний твердофазний ІФА				Тест у клітинах	
	OD SNAP-25 ₁₉₇	OD SNAP-25 ₂₀₆	Співвідношення _{197/206}	Співвідношення _{206/197}	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	—	—

[0244] Клони 1D3, 1G10, 2E2, 3C1, 3C3, і 3E8 повторно клонували, шляхом обмежуючого розведення, оскільки модифіковані живильні середовища одержані від цих клонів, включали анти-SNAP-25 антитіла з вибірковою націленістю зв'язування, що має співвідношення^{197/206} продукту розщеплення SNAP-25¹⁹⁷ до нерозщепленого субстрату SNAP-25²⁰⁶ щонайменше 4:1, і детектували продукт розщеплення SNAP-25¹⁹⁷ у клітинному тесті розщеплення й імунологічному фарбуванні клітин PC12, трансфікованих GFP-LC/A. Аналогічно клони 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 й 4G6 повторно клонували, шляхом обмежуючого розведення, оскільки модифіковані живильні середовища, одержані від цих клонів, включали анти-SNAP-25 антитіла з вибірковою націленістю зв'язування, що має співвідношення^{206/197}, щонайменше 1,5:1 нерозщепленого субстрату SNAP-25²⁰⁶ до продукту розщеплення SNAP-25¹⁹⁷, і детектували нерозщеплений субстрат SNAP-25²⁰⁶ у клітинному тесті розщеплення. Ці клони, що утворилися від єдиної клітини, знову піддавали скринінгу з використанням порівняльного твердофазного ІФА, клітинний тест розщеплення й імунологічного фарбування для підтвердження їх спорідненості й специфічності, антитіла ізолювали з використанням стандартних процедур. Асцитну рідину одержували від 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 виробляти антитіла під час процесу клонування й не міг бути оцінений.

4. Оцінка специфічності зв'язування моноклональних анти-SNAP-25 антитіл

[0245] Для оцінки специфічності зв'язування моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, асцитну рідину від клонів 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5, і 3C3E2 використовували для детектування продуктів розщеплення SNAP-25, за допомогою клітинного тесту активності, імуноцитохімічного й імунопреципітаційного аналізу.

[0246] Для клітинного тесту активності, специфічність зв'язування визначали шляхом аналізу здатності асцитної рідини, яка містить анти-SNAP-25 антитіла, детектувати нерозщеплений субстрат SNAP-25²⁰⁶ і продукти розщеплення SNAP-25¹⁹⁷ шляхом Вестерн-блотінга. Культуру клітин PC12 підходящої щільності висівали на планшети для тканинних культур площею 60 мм², що містять 3 мл підходящого живильного середовища на основі сироватки, вирощували в інкубаторі при 37 °C в атмосфері 5 % вуглекислого газу, до підходящої щільності клітин, і трансфікували як розчином для трансфекції без експресійної конструкції pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (не трансфіковані клітини), так і розчином для трансфекції, що містить експресійну конструкцію pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (трансфіковані клітини), як описано вище. Клітини відмивали й збирали як описано в Прикладі I. Для детектування присутності як нерозщепленого субстрату SNAP-25²⁰⁶ так і продуктів розщеплення SNAP-25¹⁹⁷, з кожного зразка відбирали аліквоту й аналізували Вестерн-блотінгом як описано в Прикладі I, за винятком того, що первинні антитіла являли собою розведення 1:100 асцитної рідини, що містить моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, а вторинні антитіла являли собою розведення 1:20000 антитіл проти IgG миші, кон'югованих з пероксидазою хрому (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Іллінойс). Крім того, автори перевірили три комерційно доступних моноклональних мишачих анти-SNAP-25 антитіла. Антитіла SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Лютервіль, Меріленд) α-SNAP-25, які, як зазначає виробник, детектують як нерозщеплений субстрат SNAP-25²⁰⁶ так і продукт розщеплення SNAP-25¹⁹⁷, який використовувався в розведенні 15000 відповідно до рекомендацій виробника. Антитіла MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Лас-Вегас, Невада) α-SNAP-25, які, як зазначає виробник, детектують як нерозщеплений субстрат SNAP-25²⁰⁶ так і продукт розщеплення SNAP-25¹⁹⁷, який використовувався в розведенні 1:100 відповідно до рекомендацій виробника. Антитіла MC-6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Лас-Вегас, Невада) α-SNAP-25, які, як зазначає виробник, детектують тільки продукт розщеплення SNAP-25¹⁹⁷, який використовувався в розведенні 1:100 відповідно до рекомендацій виробника.

[0247] У Таблиці 21 наведені асцитні рідини, що містять анти-SNAP-25 антитіла, які детектували тільки продукт розщеплення SNAP-25₁₉₇. Клітинний тест розщеплення показав, що в асцитній рідині, одержаній від клонів 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, і 3C3E2, синтезуються моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, які мають високу специфічність зв'язування із продуктом розщеплення SNAP-25₁₉₇, що дозволяє вибіркоче впізнавання цього продукту розщеплення стосовно нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆. Комерційні антитіла SMI-81 детектували нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆, але слабо розпізнавали продукт розщеплення SNAP-25₁₉₇ (Таблиця 21). Дивно, що комерційні антитіла MC-6050 детектували тільки нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆, і не змогли розпізнати продукт розщеплення SNAP-25₁₉₇ (Таблиця 21). Ще більш дивно те, що комерційні антитіла MC-6050 детектували тільки нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆, і не могли розпізнати продукт розщеплення SNAP-25₁₉₇, навіть при тому, що виробник заявляє, що ці антитіла селективно детектують продукт розщеплення SNAP-25₁₉₇ (Таблиця 21). Таким чином аналіз показав що, у той час як 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, і 3C3E2 проявляють підходящу вибіркочість для продукту розщеплення SNAP-25₁₉₇, 1G10A12 й 2F11B6 такої селективності не проявляють. Крім того, комерційні антитіла SMI-81, MC-6050 й MC-6053 не є підходящими для імунологічних методів, описаних у даній заявці, тому що вони всі не можуть селективно детектувати продукт розщеплення SNAP-25₁₉₇.

[0248] Для імуоцитохімічного аналізу, специфічність зв'язування визначали, аналізуючи здатність асцитної рідини, що містить анти-SNAP-25 антитіла, детектувати нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆ і продукт розщеплення SNAP-25₁₉₇ шляхом імунологічного фарбування. Див. 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). Культуру клітин PC12 підходящої щільності висівали на планшети, вирощували, і трансфікували розчином для трансфекції, без експресійної конструкції pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (не трансфіковані клітини) або розчином для трансфекції, що містить експресійну конструкцію pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (трансфіковані клітини), як описано вище. Клітини відмивали в 1 x ФБР і фіксували в 5 мл PAF при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Фіксовані клітини відмивали у фосфатному буферному сольовому розчині, інкубували в 5 мл 1 x ФБР, що містить, 0,5 % Triton® X-100 (ефір октилфенолу й поліетиленгліколі), відмивали в 1 x ФБР і збільшували проникність їх мембран в 5 мл метанолу при -20 °C протягом шести хвилин. Клітини з підвищеною проникністю мембран блокували в 5 мл 100 мМ гліцину при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, відмивали в 1 x ФБР, і блокували в 5 мл 0,5 % BSA в 1 x ФБР при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Заблоковані клітини відмивали в 1 x ФБР й інкубували при кімнатній температурі протягом двох годин в 0,5 % BSA в 1 x ФБР, що містить розведену 1:10 асцитну рідину від перевіреної клональної клітинної лінії гібридами. Клітини, оброблені первинними антитілами, відмивали три рази по 5 хвилин в 1 x ФБР. Відмиті клітини інкубували при кімнатній температурі протягом 2 годин в 1 x ФБР, що містить розведення 1:200 поліклональних козячих антитіл, кон'югованих з ALEXA® FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Карлсбад, Каліфорнія), проти важких і легких ланцюгів мишачого імуноглобуліну G (Ig G, H+L), як вторинні антитіла. Клітини, оброблені вторинними антитілами, відмивали три рази по 5 хвилин в 1 x ФБР. Відмиті клітини готували до мікроскопічного дослідження, фіксуючи їх у середовищах для фіксування VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Берлінгейм, Каліфорнія) і покриваючи їх покривним склом. Зображення, для визначення сигналу, одержували на конфокальному мікроскопі Leica, використовуючи підходящі параметри настроювання лазера. Таблиця 21 показує, асцитні рідини, що містять анти-SNAP-25 антитіла, які специфічно детектували продукт розщеплення SNAP-25₁₉₇. Імуоцитохімічний аналіз показав, що в асцитній рідині, одержаній від клонів 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, і 3C3E2, синтезуються моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, які мають високу специфічність зв'язування із продуктом розщеплення SNAP-25₁₉₇, що призводить до переважного розпізнавання цього продукту розщеплення в порівнянні з нерозщепленим субстратом SNAP-25₂₀₆.

[0249] Для аналізу методом імуопреципітації, специфічність зв'язування визначали, аналізуючи здатність моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, очищених білком A (HiTrap™ ВД колонки з білком А, GE Healthcare, Amersham, Піскетей, Нью-Джерсі), преципітувати нерозщеплений субстрат SNAP-25₂₀₆ і розщеплений продукт SNAP-25₁₉₇. Див. наприклад главу 8 Storing and Purifying Antibodies, pp. 309-311, Harlow & Lane, див. вище., 1998а. Культуру клітин PC12 підходящої щільності висівали на планшети, вирощували, і трансфікували розчином для трансфекції, що містить експресійну конструкцію pQBI-25/GFP (контрольні клітини; SEQ ID NO: 53) або розчином для трансфекції, що містить експресійну конструкцію pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (експериментальні клітини), як описано вище. Експресійна конструкція pQBI-25/GFP являє собою експресійний вектор, промоторні елементи якого функціонально пов'язані з

полінуклеотидом, що кодує GFP SEQ ID NO: 54. Після інкубації протягом ночі клітини відмивали, відбираючи живильне середовище водоструминним насосом й обполіскуючи кожну лунку 200 мкл 1 x ФБР. Для збирання клітин, ФБР видаляли водоструминним насосом, клітини лізували додаванням літичного буфера для імунопреципітації, що складається з 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGDT, 10 % гліцерину, 1 % Triton® X-100 (ефір октилфенолу й полііетиленгліколі) і 1 x коктейлю з інгібіторів протеаз COMPLETE™ (Roche Applied Biosciences, Індіанapolis, Індіана), й вклубували при 4 °C протягом однієї години. Лізовані клітини центрифугували при 3 000 x g при 4 °C протягом 10 хвилин, для видалення продуктів розпаду клітин, супернатант переносили в чисту пробірку й розводили до концентрації білка приблизно 1 мг/мл. Приблизно 5 мкг очищених моноклональних антитіл додавали до 0,5 мл розведеного супернатанту й інкубували при 4 °C протягом двох годин. Після інкубації з первинними антитілами, до розведеного супернатанту додавали приблизно 50 мкл імобілізованого білка G (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Іллінойс) і інкубували при 4 °C протягом однієї години. Проінкубований супернатант відмивали три рази по 30 хвилин, додаванням 0,5 мл літичного буфера для імунопреципітації, центрифугуванням при 300 x g в 4 °C протягом однієї хвилини для осадження гранул з імобілізованим білком G, з наступним видаленням супернатанту. Після відмивання, осад повторно зважували в 30 мкл 1 x буфера для завантаження на основі ДСН, і одержаний зразок нагрівали до 95 °C протягом 5 хвилин. Для детектування наявності як нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆ так і розщепленого продукту SNAP-25₁₉₇, аліквоти від кожного зібраного зразка аналізували Вестерн-блотінгом як описано в Прикладі I, за винятком того, що первинні антитіла були розведенням 1:1000 поліклональної сироватки анти-SNAP-25 антитіл (див. Приклад V), а вторинні антитіла були розведенням 1:20000 антитіл кролика α-IgG, кон'югованих з пероксидазою хрому (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Іллінойс). Таблиця 21 зазначає асцитну рідину, що містить анти-SNAP-25 антитіла, які специфічно осаджувала продукт розщеплення SNAP-25₁₉₇ у процесі імунопреципітації. Аналіз методом імунопреципітації показав, що в асцитній рідині, одержаній від клонів 2E2A6 й 3C1A5, синтезуються моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, які мають високу специфічність зв'язування із продуктом розпаду SNAP-25₁₉₇, що призводить до переважного розпізнавання цього продукту розпаду в порівнянні з нерозщепленим субстратом SNAP-25₂₀₆.

Таблиця 21

Аналіз асцитної рідини із клонів, що містить моноклональні Анти-SNAP-25 антитіла

Клон	Тест у клітинах		Імуноцитохімічний тест		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 зв'язування моноклональних анти-SNAP-25 антитіл

[0250]

[0251] Для визначення афінності зв'язування моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, що проявляють високу специфічність зв'язування або до продукту розщеплення SNAP-25₁₉₇ або до нерозщепленого субстрату SNAP-25₂₀₆, виконували тест афінності зв'язування на інструменті BIAcore 3000, використовуючи чіпи із сенсорами на основі карбоксиметил декстрану (CM5) (BIAcore, Inc., Пискететей, Нью-Джерсі). Запуски проводилися при 25 °C з буфером HBS-EP, що складається з 10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM хлориду натрію, 3 mM EDTA, 0,005 % (об.) сурфактанту P20, при швидкості потоку 10 мкл/хв. Пептиди SNAP-25, що складаються з амінокислот 134-197 з SEQ ID NO: 5 (SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇) або амінокислот 134-206 з SEQ NO: 5 (SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆) ковалентно приєднували до поверхні CM5 сенсора чіпа за допомогою стандартного механізму зшивки з аміном. Коротенько, чіпи CM5 активізували ін'єкцією суміші 0,2 М 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодііміду й 0,05 М N-гідроксисукциміду протягом 7

- хвилин; пептиди SNAP-25 в 10 мМ ацетаті натрію (рН 4,0) вводили протягом 20 хвилин при швидкості потоку 10 мкл/хв; не прореаговані складні ефіри сукциміду блокували ін'єкцією 1 М етаноламін гідрохлориду рН 8,5 протягом 7 хвилин. Імобілізація цієї кількості SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ або SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ на чіпі відбулася в збільшенні одиниць відповіді на 100-150 (близько 0.10-0.15 нг/мм²). Зразки антитіл, що складаються з асцитної рідини або очищених моноклональних антитіл, одержаних від клонів 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, і 3C3E2, так само як і комерційно доступних анти-SNAP-25 антитіл пропускати по поверхні чіпів CM5, так що час асоціації становив 10 хвилин, а час дисоціації - 20 хвилин. Поверхні відновлювали між тестами шляхом ін'єкції 10 мМ гліцин-HCl (рН 2,5) протягом 1 хвилини при швидкості потоку 15 мкл/хв. У програмі BIAevaluation 3.0, криві сенсограми відповідали кінетичній моделі зв'язування 1:1.
- [0252] Результати показали, що як 2E2A6, так й 3C1A5 були дуже специфічними до продукту розщеплення SNAP-25₁₉₇ у порівнянні з нерозщепленим субстратом SNAP-25 (Таблиця 22). У порівнянні з афінністю зв'язування MC-6050 й MC-6053, 1D3B6 мав в 10 раз більшу рівноважну константу дисоціації для продукту розщеплення SNAP-25 (Таблиця 22). Цікаво, що в 2E2A6 рівноважна константа дисоціації, для продукту розщеплення SNAP-25, була не на багато нижче, ніж у цих комерційних антитіл (0.405 нМ проти 0.497 й 0.508) (Таблиця 22). Оскільки жодне із цих комерційних анти-SNAP-25 антитіл вибірково не розпізнавало продукт розщеплення SNAP-25 (Таблиця 21), рівноважна константа дисоціації нижче, ніж приблизно 0,5 нМ, очевидно, хоча б частково, є важливою умовою, для досягнення такої вибіркової. Аналогічно, при порівнянні афінностей зв'язування MC-6050 й MC-6053, 2E2A6 мав щонайменше на порядок більш повільну константу швидкості зворотної реакції/константу дисоціації ($6,74 \times 10^{-5}$ проти $8,82 \times 10^{-4}$ с⁻¹ й $1,18 \times 10^{-3}$ с⁻¹) (Таблиця 22). Це припускає, що константа швидкості зворотної реакції/константа дисоціації, нижче приблизно $8,82 \times 10^{-4}$, очевидно, хоча б частково, є важливою умовою для досягнення вибіркового зв'язування продукту розщеплення SNAP-25. Цей результат погоджується з даними про 1D3B8, яке має константу швидкості зворотної реакції/константу дисоціації $5,78 \times 10^{-5}$ з⁻¹ (Таблиця 22).

Таблиця 22

Аналіз афінності зв'язування моноклональних анти-SNAP-25 антитіл

Параметр ППР	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 ППР	3C1A5		2C9B10	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^b	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^г
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	—
Параметр ППР	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	19800	0,508	240

^a При пропусканні по поверхні сенсорних чіпів CM5 до 125 нМ моноклональних анти-SNAP-25 антитіл 1D3B8 після 10-хвилинного часу асоціації, зв'язування не спостерігалось.

^b При пропусканні по поверхні сенсорних чіпів CM5 до 10 мкМ моноклональних анти-SNAP-25 антитіл 2E2A6 після 10-хвилинного часу асоціації, зв'язування не спостерігалось.

^b При пропусканні по поверхні сенсорних чіпів CM5 до 100 нМ моноклональних анти-SNAP-25 антитіл 3C1A5 після 10-хвилинного часу асоціації, зв'язування не спостерігалось.

^г При пропусканні по поверхні сенсорних чіпів CM5 до 100 нМ моноклональних анти-SNAP-25 антитіл 2C9B10 після 10-хвилинного часу асоціації, зв'язування не спостерігалось.

[0253] Для порівняння шести різних антитіл, константи швидкості прямої реакції (k_a) і зворотної реакції (k_d) для кожного з них нормували, використовуючи програмне забезпечення BIA evaluation 4.1. Для констант швидкості прямих реакцій дані окремо обрізали, видаляючи частину, що відповідає піку ін'єкції, і нормуючи до масштабу від 0 до 100. Для порівняння констант швидкості зворотної реакції дані нормували до точки припинення/вершини ін'єкції. Цей аналіз показав, що 2C9B10 мав набагато більш повільну константу швидкості прямої реакції, ніж інші антитіла (ФІГ. 7A), і що в MC-6053 константа швидкості зворотної реакції (дисоціації) набагато більш швидка ніж в інших антитіл (ФІГ. 7B). Швидка константа швидкості зворотної реакції MC-6053, вказує на те, що це антитіло не буде задовільно проявляти себе в методах, описаних у даній заявці, тому що цьому антитілу буде складно залишатися пов'язаним з антигеном субстрату під час стадій промивання.

6. Секвенування епітопа ізольованих моноклональних анти-SNAP-25 антитіл.

[0254] Для визначення епітопів ізольованих моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P_1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, секвенували молекули полінуклеотидів, що кодують варіабельний важкий (V_H) і варіабельний легкий (V_L) ланцюги моноклонального анти-SNAP-25 антитіла, одержаного від гібридом 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 й 3C3E2. мРНК із кожної гібридоми виділяли й очищали, використовуючи стандартні протоколи, піддавали зворотній транскрипції для одержання кДНК, використовуючи як антизначеннєвий праймер олігодезокситимідин або специфічний для гена праймер (мишачий IgG1 CH і каппа CL). Для визначення ізо типу антитіла, одержану кДНК ампліфікували методом ПЛР із використанням специфічних мишачих і людських праймерів до постійних доменів. Вироджені праймери V_H й V_L використовували, для ампліфікації варіабельних областей на матриці кДНК. Для 5'RACE гомополімерний дЦТФ хвіст додавали до 3' кінця кДНК. Потім важкі й легкі ланцюги ампліфікували з олігодезоксигуанозином як значеннєвого праймера й специфічного для гена антизначеннєвого праймера (CH/KC). ПЛР продукти включали послідовність сигнального пептиду, варіабельних і постійних областей аж до антизначеннєвого праймера. ПЛР продукти очищали методом гель-електрофорезу, для видалення маленьких фрагментів, і клонували у вектор для клонування по тупих кінцях або у вектор TA для секвенування. П'ять незалежних клонів для кожного ланцюга секвенували, будували вирівнювання для ланцюгів V_H й V_L і визначали консенсусну послідовність. Методи, використані для визначення послідовності амінокислот для V_H й V_L описані, наприклад, в Roger A. Sabbadini, et al., Novel Bioactive Lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same, публікація патенту 2007/0281320; і 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 в дану заявку за допомогою посилання. Крім того, доступні комерційні послуги по секвенуванню варіабельного важкого (V_H) і варіабельного легкого (V_L) ланцюгів антитіл й ідентифікації CDR області, див. наприклад, Fusion Antibodies Ltd., Північна Ірландія. В одному випадку, для домена V_L 3C1A5, амінокислотну послідовність також визначали шляхом розділення антитіл, які пройшли афінне очищення, за допомогою двомірного електрофорезу з високим розрішенням і наступного фінгерпринт-аналізу пептидних фрагментів на наноPX-TMC після протеолітичного розщеплення.

[0255] Послідовності полінуклеотидів, які складають ланцюги V_H й V_L моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, одержаних з гібридом, описаних даній заявці, йдуть далі: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 71), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO: 73), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 75), 3C1A5 V_H (SEQ ID NO: 77), 3C3E2 V_H варіант 1 (SEQ ID NO: 79), 3C3E2 V_H варіант 2 (SEQ ID NO: 81), 3C3E2 V_H варіант 3 (SEQ ID NO: 132), 1D3B8 V_L (SEQ ID NO: 83), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 85), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 87), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 89), і 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 91). Послідовність амінокислот, які складають ланцюги V_H й V_L моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, одержаних з гібридом, розкритих у даному описі, йдуть далі: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 72), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO: 74), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 76), 3C1A5 V_H (SEQ ID NO: 78), 3C3E2 V_H варіант 1 (SEQ ID NO: 80), 3C3E2 V_H варіант 2 (SEQ ID NO: 82); 3C3E2 V_H варіант 2 (SEQ ID NO: 133), 1D3B8 V_L (SEQ ID NO: 84), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 86), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 88), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 90), і 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 92). Послідовність амінокислот, які складають CDR області ланцюгів V_H й V_L моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, одержаних з гібридомами 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, і 3C3E2, наведені в Таблиці 23.

Таблиця 23

Послідовності CDR доменів V_H й V_L моноклональних анти-SNAP-25 антитіл

CDR	Послідовність	Детектована в	SEQ ID NO:
V _H CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5	93
V _H CDR 1	TFTNYVIH	3C3E2	94
V _H CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95
V _H CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V _H CDR 2	YLFPNGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5	97
V _H CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C3E2	98
V _H CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V _H CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5	100
V _H CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
V _H CDR 3	ARMDY	3C3E2var1	102
V _H CDR 3	ARMGY	3C3E2var2	134
V _H CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C3E2var3	135
V _L CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
V _L CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
V _L CDR 1	KSSQSLLYTNGKTYLT	2E2A6	105
V _L CDR 1	KSSQSLLNTNGKTYLT	3C1A5	106
V _L CDR 1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
V _L CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
V _L CDR 2	NAKSLAE	2C9B10	109
V _L CDR 2	LVSELD	2E2A6	110
V _L CDR 2	LVSCLDS	3C1A5	111
V _L CDR 2	YASQIS	3C3E2	112
V _L CDR 3	FQGSHPPT	1D3B8	113
V _L CDR 3	QHNYGTPYT	2C9B10	114
V _L CDR 3	LQSAHPPT	2E2A6	115
V _L CDR 3	LQSSHFPPT	3C1A5	116
V _L CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

[0256] Необмежуючі приклади послідовностей амінокислот, які складають варіанти ділянки CDR ланцюга V_H моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, одержаних з гібридом, описаних у даній заявці, включають варіанти V_H CDR1 SEQ ID NO: 118 для 1D3B8; варіант V_H CDR1 SEQ ID NO: 119 для V_H 2C9B10, 2E2A6 й 3C1A5; варіант V_H CDR1 SEQ ID NO: 120 для V_H 3C1A5 й 3C3E2 варіант 3; варіант V_H CDR2 SEQ ID NO: 121 для 1D3B8 й 2E2A6; варіант V_H CDR2 SEQ ID NO: 122 для V_H 2C9B10 й 3C1A5; варіант V_H CDR2 SEQ ID NO: 123 для V_H 3C1A5 й 3C3E2 варіант 3; варіант V_H CDR3 MDY для 1D3B8 й 2C9B10; варіант V_H CDR3 MGY для V_H 2E2A6 й 3C1A5; варіант V_H CDR3 SEQ ID NO: 124 для V_H 3C1A5 й 3C3E2 варіант 3. Необмежуючі приклади послідовностей амінокислот, які складають варіанти області CDR V_L ланцюга моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, одержаних з гібридом, описаних у даному описі, включають варіанти V_L CDR1 SEQ ID NO: 125 для 1D3B8; варіант V_L CDR1 SEQ ID NO: 126 для 2C9B10; варіант V_L CDR1 SEQ ID NO: 127 для 2E2A6; варіант V_L CDR1 SEQ ID NO: 128 для 3C1A5; варіант V_L CDR1 SEQ ID NO: 129 для 3C3E2; варіант V_L CDR2 KVS для 1D3B8; варіант V_L CDR2 NAK для 2C9B10; варіант V_L CDR2 LVS для 2E2A6; варіант V_L CDR2 YAT для 3C1A5; і варіант V_L CDR2 YAS для 3C3E2.

Приклад VIII

Розробка поліклональних анти-SNAP-25 антитіл, які вибірково зв'язують епітоп SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A

[0257] Наступний приклад ілюструє одержання поліклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язуватися з епітопом SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A.

[0258] Для одержання поліклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язуватися з SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, як антиген продукту розщеплення SNAP-25 створили пептид з 10 амінокислотних залишків CGGGRIDEANQ (SEQ ID NO: 46). Цей пептид включав залишок цистеїну на N-кінці для зв'язування з KLH, гнучкий G-роздільник (GGG) пов'язаний з амінокислотами 191-197 з SNAP-25 людини (SEQ ID NO: 5) і карбоксильований глутамін на C-кінці. Пошуки Blast показали, що в цього пептиду є висока гомологія тільки з SNAP-25 і немає майже ніякої можливості перехресної реактивності з іншими білками в нервових клітинах. Послідовність також ретельно досліджували, використовуючи комп'ютерні алгоритми, для визначення індексу гідрофобності, ймовірності поверхні білка, гнучких областей, і ймовірної вторинної структури, за чим йшла належна орієнтація й подання обраної послідовності пептиду. Пептид синтезували й кон'югували з гемоціаніном равлика (KLH), для збільшення імуногенності. Перш, ніж імунізувати тварин, які не піддавалися впливу, кроликів аналізували методом Вестерн-блотінга з лізатами від клітинних ліній-кандидатів, для ідентифікації тварин, у яких була відсутня імунореактивність до білку, який є присутнім у цих лізатах. Двох підданих попередньому скринінгу кроликів імунізували цим пептидом, і після трьох імунізацій зроблених протягом приблизно восьми тижнів, із кроликів добували кров для аналізу. Крові дозволяли згорнутися, інкубуючи її при 4 °C протягом 60 хвилин. Зсілу кров центрифугували при 10000 x g в 4 °C протягом 10 хвилин для осадження продуктів розпаду клітин. Зразки одержаної сироватки розділяли на аліквоти по 50 мкл, і зберігали при -20 °C до подальшого використання.

[0259] Подібна стратегія, основана на інших антигенах SNAP-25, розкрита в даному описі, використовується для одержання моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язуватися з SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A. Наприклад, SNAP-25 SEQ ID NO: 47 може бути кон'югований з KLH замість антигену SNAP-25 SEQ ID NO: 46. Як інший приклад можна навести амінокислоти 191-197 з SNAP-25 людини з антигену SNAP-25 SEQ ID NO: 38 які 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 або SEQ ID NO: 44.

2. Скринінг на наявність поліклональних анти-SNAP-25 антитіл.

[0260] Для визначення наявності поліклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, виконували порівняльний твердофазний ІФА й клітинний тест розщеплення, з використанням витягнутої із кролика сироватки, як описано в Прикладі III. Сироватка від обох кроликів містила поліклональні анти-SNAP-25 антитіла, здатні вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A. Поліклональні антитіла кролика α-SNAP-25 назвали NTP 22 й NTP 23.

3. Очищення поліклональних анти-SNAP-25 антитіл

[0261] Для виділення поліклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, антитіла NTP 22 й NTP 23 із сироватки кролика виділяли, використовуючи колонки для афінної хроматографії, що містять SNAP-25 антиген SEQ ID NO: 46.

4. Оцінка специфічності зв'язування поліклональних анти-SNAP-25 антитіл

[0262] Для оцінки специфічності зв'язування поліклональних анти-SNAP-25 антитіл, які можуть вибірково зв'язуватися з антигеном SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, використовували очищені поліклональні анти-SNAP-25 антитіла NTP 22 й NTP 23 для детектування продукту розщеплення, клітинного тесту активності, імуноцитохімії й імунопреципітації як описано в Прикладі III. Клітинний тест розщеплення, імуноцитохімічний аналіз й аналіз імунопреципітації, показали, що поліклональні анти-SNAP-25 антитіла NTP 22 й NTP 23 не реагують із нерозщепленим антигеном SNAP-25. Таким чином як NTP 22 так й NTP 23 мають високу специфічність зв'язування із продуктом розщеплення SNAP-25197, що призводить до переважного розпізнавання цього продукту розпаду в порівнянні з нерозщепленим субстратом SNAP-25206. Афінність до антигенів можна визначити, використовуючи ППР згідно методу BiAcore як описано в Прикладі III.

Приклад IX

Підготовка компонентів й умов для "сендвіч"-методу твердофазного ІФА

[0263] Наступний приклад ілюструє ідентифікацію й підготовку компонентів й умов, необхідних для проведення тестів за допомогою "сендвіч"-методу твердофазного ІФА, що підходить для використання в імунологічних способах детектування активності ендopeптидаз зі зміненою націленістю шляхом детектування продукту розщеплення SNAP-25 з використанням моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, специфічних для SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A.

1. Приготування клітинних лізатів із клітин, оброблених ендopeптидазою зі зміненою націленістю

[0264] Для одержання лізатів із клітин, оброблених ендopeптидазою зі зміненою націленістю, для аналізу, клітинну культуру підходящої щільності клітин із запасної культури Neuro-2a засівали у флакон T175, що містить 50 мл середовища без сироватки, що містить мінімальне необхідне середовище, 2 mM GlutaMAX™ I із солями Ерла, добавку 1 x B27, добавку 1 x N2, 0,1 mM замісників амінокислот, 10 mM HEPES. Ці клітини інкубували при 37 °C в інкубаторі з вмістом вуглекислого газу 5 % до настання диференціювання клітин, яке оцінювали у відповідності зі стандартними й звичайними морфологічними критеріями, такими як блокування росту й витягування нейриту (приблизно 2-3 днів). Як контроль, клітинну культуру підходящої щільності клітин із запасної культури Neuro-2a засівали у флакон T175, що містить 50 мл відповідного живильного середовища (Таблиця 1). Ці недиференційовані контрольні клітини вирощували при 37 °C в інкубаторі із вмістом вуглекислого газу 5 % до досягнення 50 %-ї конфлюентності (приблизно 18 годин). Середовище з диференційованої і контрольної недиференційованої культур видаляли аспірацією з кожної лунки й заміняли свіжим середовищем, що містить 0 (неопрацьований зразок) або 10 нМ ендopeптидази зі зміненою націленістю. Після інкубації протягом ночі клітини промивали й збирали шляхом лізису у свіжоприготовленому буфері для лізування з Triton X-100 (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100) при 4 °C протягом 30 хвилин з постійним перемішуванням. Лізовані клітини центрифугували при 4000 об/хв протягом 20 хвилин при 4 °C для видалення залишків клітин, використовуючи настільну центрифугу. Концентрації білка в лізатах клітин вимірювали методом Бредфорда.

2. Приготування й ідентифікація компонентів "сендвіч"-методу твердофазного ІФА

[0265] Для ідентифікації підходящої пари антитіло для захоплення – детектуюче антитіло, за допомогою "сендвіч"-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілюмінесценцією проводили аналіз двадцяти шести різних комбінацій пар антитіл для захоплення й детектуючих антитіл, що включають одинадцять різних антитіл для захоплення α-SNAP-25 і сім різних детектуючих анти-SNAP-25 антитіл (Таблиця 12). Використовувані анти-SNAP-25 антитіла являли собою описані в даній заявці мишачі моноклональні анти-SNAP-25 антитіла 2E2A6 й 3C1A5, описані в даній заявці мишачі моноклональні анти-SNAP-25 антитіла SMI-81, MC-6050 й MC-6053, описані в даній заявці кролячі поліклональні анти-SNAP-25 антитіла NTP 23, кролячі поліклональні анти-SNAP-25 антитіла S9684 (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі), кролячі поліклональні анти-SNAP-25 антитіла H-50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Санта-Круз, Каліфорнія), козячі поліклональні анти-SNAP-25 антитіла C-18 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Санта-Круз, Каліфорнія), козячі поліклональні анти-SNAP-25 антитіла N-19 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Санта-Круз, Каліфорнія) і мишачі поліклональні анти-SNAP-25 антитіла SP12 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Санта-Круз, Каліфорнія).

[0266] Для приготування розчину антитіл для захоплення, моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, які містяться в асцитній рідині гібридомних клітинних ліній 2E2A6 й 3C1A5, як і моноклональні анти-SNAP-25 антитіла MC-6050 й MC-6053, виділяли за допомогою стандартного протоколу очищення з використанням білка А. Всі інші анти-SNAP-25 антитіла були придбані в очищеному виді.

[0267] Для приготування розчину детектуючих антитіл, які відповідають анти-SNAP-25, антитіла кон'югували з реактивом для мічення на основі складного ефіру рутеній (II)-трис-біпіридин-(4-метисульфону) і N-ГС (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд) відповідно до інструкцій виробника (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд). Реакцію кон'югації проводили шляхом додавання 30 мкл розчину для розведення MSD SULFO-TAG™, розведеного в дистильованій воді, до 200 мкл поліклональних анти-SNAP-25 антитіл у концентрації 2 мг/мл, й інкубації реакційної суміші при кімнатній температурі протягом 2 годин у темряві. Позначені антитіла очищали, використовуючи стандартний протокол з використанням спін-колонок, і концентрацію білка визначали за допомогою стандартного колориметричного тесту на білок. Поглинаючи здатність кон'югатів анти-SNAP-25 антитіл/MSD SULFO-TAG™ вимірювали за

допомогою спектрофотометра при 455 нМ для визначення концентрації в молях на літр. Розчин детектуючих антитіл зберігали при 4 °С до використання.

[0268] Для приготування твердофазної підкладки, що містить антитіла для захоплення, які специфічні до продукту розщеплення SNAP-25, приблизно 5 мкл відповідного розчину моноклональних анти-SNAP-25 антитіл (20 мкг/мл в 1 х ФБР) додавали до кожної лунки 96-лункового планшета MSD High Bind, і розчин сушили на повітрі в біологічно чистому приміщенні протягом 2-3 годин до випаровування рідини з розчину. Потім лунки з іммобілізованими антитілами для захоплення блокували шляхом додавання в них 150 мкл блокуючого буфера, що містить 2 % Amersham Blocking Reagent (GE Life Sciences, Піскатауей, Нью-Джерсі) і 10 % козячої сироватки (VWR, Уест-Честер, Пенсільванія) на 2 години при кімнатній температурі. Заблоковані планшети запечатували й зберігали при 4 °С до використання.

[0269] Для детектування присутності розщепленого продукту розщеплення SNAP-25 ECL "сендвіч"-методом твердофазного ІФА, з лунок збережених планшетів видаляли аспірацією блокуючий буфер, і до кожної лунки додавали 25 мкл клітин, оброблених ендопептидазою зі зміненою націленістю як описано вище, і планшети інкубували при 4 °С протягом ночі. Лунки планшета трикратно промивали, видаляючи аспірацією клітинний лізат і три рази обполіскуючи кожну лунку 200 мкл 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після відмивання, у кожну лунку додавали 25 мкл розчину детектуючих антитіл у концентрації 5 мкг/мл, що містить 2 % блокуючого реактиву Amersham в 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20 ® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат), планшет запечатували й інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години зі струшуванням. Після інкубації з детектуючими антитілами, лунки трикратно промивали 200 мкл 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після промивання в кожну лунку додавали 150 мкл 1 х буфера для зчитування (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд) і аналізували планшети, використовуючи пристрій для зчитування зображень SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд). Обчислювали співвідношення сигналу, одержаного при дозі 10 нМ для кожної пари антитіл, до сигналу, одержаного при дозі 0 нМ для кожної пари антитіл (Таблиця 24). Ці результати показали, що серед двадцяти шести різних комбінацій досліджених пар антитіл тільки в трьох пар антитіл співвідношення сигналу до шуму було вище 10:1 для найбільш високої протестованої дози: Пара №1 (мишаче mAb 2E2A6 і кроляче pAb S9684), Пара №4 (мишаче mAb 3C1A5 і кроляче pAb S9684) і Пара №18 (кроляче pAb S9684 і мишаче mAb 2E2A6). Пара антитіл 1 була обрана для подальшої розробки тесту.

Таблиця 24

Скринінг комбінацій анти-SNAP-25 антитіл

№ пари антитіл	Антитіло для захоплення	Детектуюче антитіло	Детектування продукту розщеплення SNAP-25	Детектування нерозщепленого субстрату SNAP-25	Співвідношення сигнал/шум (10 нм/0 нм)
1	Мишаче mAb 2E2A6	Кроляче pAb S9684	Так	Немає	26,6:1
2	Мишаче mAb 2E2A6	Козяче pAb N-19	Так	Немає	7,3:1
3	Мишаче mAb 2E2A6	Кроляче pAb H-50	Так	Немає	0,9:1
4	Мишаче mAb 3C1A5	Кроляче pAb S9684	Так	Немає	12,1:1
5	Мишаче mAb 3C1A5	Козяче pAb N-19	Так	Немає	1,9:1
6	Мишаче mAb 3C1A5	Кроляче pAb H-50	Так	Немає	0,9:1
7	Козяче pAb C-18	Кроляче pAb S9684	Немає	Немає	0,8:1
8	Козяче pAb C-18	Козяче pAb N-19	Немає	Немає	0,9:1
9	Козяче pAb C-18	Кроляче pAb H-50	Немає	Немає	0,9:1
10	Кроляче pAb H-50	Мишаче mAb 2E2A6	Так	Немає	0,9:1

Продовження таблиці 24

№ пари антитіл	Антитіло для захоплення	Детектуюче антитіло	Детектування продукту розщеплення SNAP-25	Детектування нерозщепленого субстрату SNAP-25	Співвідношення сигнал/шум (10 нм/0 нм)
11	Кроляче pAb H-50	Козяче pAb C-18	Немає	Немає	1,0:1
12	Козяче pAb N-19	Мишаче mAb 2E2A6	Так	Немає	0,9:1
13	Козяче pAb N-19	Козяче pAb C-18	Немає	Немає	1,1:1
14	Кроляче pAb NTP 23	Козяче pAb N-19	Так	Немає	1,2:1
15	Кроляче pAb NTP 23	Козяче pAb C-18	Немає	Немає	1,1:1
16	Кроляче pAb NTP 23	Мишаче pAb SP12	Так	Немає	1,3:1
17	Кроляче pAb NTP 23	Кроляче pAb H-50	Так	Немає	1,1:1
18	Кроляче pAb S9684	Мишаче mAb 2E2A6	Так	Немає	21,3:1
19	Кроляче pAb S9684	Козяче pAb C-18	Немає	Немає	0,7:1
20	Кроляче pAb S9684	Мишаче mAb SMI-81	Так	Так	1,2:1
21	Мишаче mAb SMI-81	Кроляче pAb S9684	Так	Так	1,1:1
22	Мишаче mAb SMI-81	Козяче pAb N-19	Так	Так	1,0:1
23	Мишаче mAb SMI-81	Козяче pAb C-18	Немає	Немає	0,8:1
24	Мишаче pAb SP12	Козяче pAb C-18	Немає	Немає	1,0:1
25	Мишаче mAb MC-6050	Кроляче pAb S9684	Так	Так	5,0:1
26	Мишаче mAb MC-6053	Кроляче pAb S9684	Так	Так	7,1:1

Приклад X

Імунологічний спосіб детектування ендопептидаз зі зміненою націленістю, що мають ферментативну активність легкого ланцюга BoNT/A, за допомогою "сендвіч"-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілюмінесценцією

[0270] Наступний приклад ілюструє імунологічні способи детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю шляхом детектування продукту розщеплення SNAP-25 з використанням моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, специфічних до продукту розщеплення SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, за допомогою "сендвіч"-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілюмінесценцією.

[0271] Для одержання лізатів з клітин, оброблених ендопептидазою зі зміненою націленістю, що має ферментативну активність легкого ланцюга BoNT/A, клітинну культуру підходящої щільності клітин зі стабільної клітинної лінії засівали в лунки 96-лункових планшетів для культур тканин, що містять 100 мл відповідного середовища. Ці клітини інкубували при 37 °C в інкубаторі з вмістом вуглекислого газу 5 % протягом 24 годин. Середовище від клітин видаляли аспірацією з кожної лунки й замінювали свіжим середовищем, що містить 0 (неопрацьований зразок) або одну з доз, визначених в експерименті згідно відповіді на дози цієї ендопептидази зі зміненою націленістю. Після інкубації протягом 24 годин клітини промивали й збирали.

[0272] Для приготування розчину антитіл для захоплення α-SNAP-25, моноклональні анти-SNAP-25 антитіла, які містяться в асцитній рідині гібридомної клітинної лінії 2E2A6, виділяли за допомогою стандартного протоколу очищення з використанням білка А. Для приготування розчину детектуючих анти-SNAP-25 антитіл, кролячі поліклональні анти-SNAP-25 антитіла

S9684 (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі) кон'югували з реактивом для мічення на основі складного ефіру рутеній (II)-трис-біпіридин-(4-метисульфону) і N-ГС (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд) відповідно до інструкцій виробника (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд). Реакцію кон'югації, очищення мічених анти-SNAP-25 антитіл, визначення концентрації й зберігання проводили як описано в Прикладі VI.

[0273] Для приготування твердофазної підкладки, що містить антитіла для захоплення, які специфічні до продукту розщеплення SNAP-25, приблизно 5 мкл розчину моноклональних анти-SNAP-25 антитіл 2E2A6 (20 мкг/мл в 1 х ФБР) додавали до кожної лунки 96-лункового планшета MSD High Bind, і розчин сушили на повітрі в біологічно чистому приміщенні протягом 2-3 годин до випаровування рідини з розчину. Потім лунки з іммобілізованими антитілами для захоплення блокували й використовували безпосередньо для детектування активності ендопептидази зі зміненою націленістю.

[0274] Для детектування присутності розщепленого продукту SNAP-25 ECL "сендвіч"-методом твердофазного ІФА, з лунок збережених планшетів видаляли аспірацією блокуючий буфер, і до кожної лунки додавали 25 мкл клітин, оброблених ендопептидазою зі зміненою націленістю, і планшети інкубували при 4 °С протягом ночі. Лунки планшета трикратно промивали, видаляючи аспірацією клітинний лізат і три рази обполіскуючи кожну лунку 200 мкл 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після відмивання, у кожну лунку додавали 25 мкл розчину детектуючих антитіл у концентрації 5 мкг/мл, що містить 2 % блокуючого реактиву Amersham в 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат), планшети запечатували й інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години зі струшуванням. Після інкубації з детектуючими антитілами, лунки трикратно промивали 200 мкл 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після промивання в кожну лунку додавали 150 мкл 1 х буфера для зчитування (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд) і аналізували планшети, використовуючи пристрій для зчитування зображень SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Меріленд). Зібрані дані аналізували й обчислювали EC₅₀ як описано в Прикладі VI. Для ендопептидаз зі зміненою опіоїдною націленістю ці результати показали, що в середньому при EC₅₀ детектували 1,0 нМ Noc/A (у діапазоні приблизно від 0,3 нМ до 2,0 нМ) при співвідношенні сигналу до шуму для нижньої асимптоти приблизно від 15:1 до 20:1 і співвідношенні сигналу до шуму для верхньої асимптоти приблизно від 180:1 до 300:1.

Приклад XI

Імунологічний спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю за допомогою CL "сендвіч"-методу твердофазного ІФА

[0275] Наступний приклад ілюструє імунологічні способи детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю шляхом детектування продукту розщеплення SNAP-25 з використанням моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, специфічних до SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, за допомогою CL "сендвіч"-методу твердофазного ІФА.

[0276] Лізат із клітин, оброблених ендопептидазою зі зміненою націленістю, і розчин антитіл для захоплення α-SNAP-25 одержували як описано в Прикладі VII.

[0277] Для приготування розчину детектуючих анти-SNAP-25 антитіл, поліклональні анти-SNAP-25 антитіла S9684 (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі) кон'югували з пероксидазою хрону (HRP) відповідно до інструкцій виробника (Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Іллінойс). Реакцію кон'югації проводили шляхом додавання 500 мкл поліклональних анти-SNAP-25 антитіл у концентрації 1 мг/мл у пробірку, що містить ліофілізовану активовану пероксидазу, змішування компонентів і наступного додавання 10 мкл ціаноборгідриду натрію. Цю реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години під витяжкою. Після зупинки реакції мічені антитіла виділяли, використовуючи стандартний протокол з використанням спін-колонок, і концентрацію білка визначали за допомогою стандартного колориметричного тесту на білок. Поглинаючи здатність кон'югатів поліклональних анти-SNAP-25 антитіл/HRP вимірювали за допомогою спектрофотометра при 455 нМ для визначення концентрації в молях на літр. Розчин детектуючих анти-SNAP-25 антитіл зберігали при 4 °С до використання.

[0278] Для приготування твердофазної підкладки, що містить антитіла для захоплення α-SNAP-25, які специфічні до продукту розщеплення SNAP-25, приблизно 100 мкл розчину моноклональних анти-SNAP-25 антитіл 2E2A6 (1 мг/мл в 1 х ФБР) додавали до кожної лунки 96-лункового білого планшета Greiner, планшети інкубували при 4 °С протягом ночі й надлишок розчину антитіл видаляли. Потім лунки з іммобілізованими антитілами для захоплення блокували шляхом додавання в них 150 мкл блокуючого буфера, що містить 2 % Amersham Blocking Reagent (GE Life Sciences, Піскатавей, Нью-Джерсі) і 10 % козячої сироватки (VWR,

Уест-Честер, Пенсільванія) на 1 годину при кімнатній температурі. Блокуючий буфер видаляли й планшети насухо просочували за допомогою паперових рушників шляхом перекидання й постукування. Потім лунки з іммобілізованими антитілами для захоплення блокували й використовували безпосередньо для детектування активності ендопептидази зі зміненою націленістю.

[0279] Для детектування присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою CL "сендвіч"-методу твердофазного ІФА, до кожної лунки додавали 50 мкл лізату клітин, оброблених ендопептидазою зі зміненою націленістю, планшети запечатували й інкубували на струшувачі зі швидкістю 500 об/хв при 4 °С від 2-4 до цілої ночі. Лунки планшета трикратно промивали, видаляючи аспірацією клітинний лізат і три рази обполіскуючи кожну лунку 200 мкл 1 x ФБР, 0,05 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після промивання, у кожну лунку додавали 100 мкл розчину детектуючих поліклональних анти-SNAP-25 антитіл/HRP у концентрації 1 мг/мл, що містить 2 % блокуючого реактиву Amersham в 1 x ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат), планшет запечатували й інкубували на струшувачі з швидкістю 650 об/хв при кімнатній температурі протягом 1 години. Після інкубації з детектуючими антитілами, лунки трикратно промивали 200 мкл 1 x ФБР, 0,05 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після промивання в кожну лунку додавали 100 мкл суміші SuperSignal ELISA Pico 1:1 (Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Іллінойс) і аналізували планшети, використовуючи люмінометр (Molecular Devices, Санівейл, Каліфорнія) на 395 нм. Зібрані дані аналізували й обчислювали EC50 як описано в Прикладі VI.

Приклад XII

Імунологічний спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю за допомогою багатоканального "сендвіч"-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілюмінесценцією

[0280] Наступний приклад ілюструє багатоканальні імунологічні способи детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю шляхом детектування продукту розщеплення SNAP-25 з використанням моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, специфічних до продукту розщеплення SNAP-25, і другої пари антитіл до іншого білка.

[0281] Тест на активність ендопептидази зі зміненою націленістю можна провести за допомогою багатоканального "сендвіч"-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілюмінесценцією. Такий тест описаний у родинній заявці на патент на ім'я Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, заявка на патент США № 12/403531, яка повністю включена в дану заявку за допомогою посилання, і його можна використовувати із клітинними лініями, ендопептидазами зі зміненою націленістю й відповідними клітинними лініями, описаними в даній заявці.

Приклад XIII

Імунологічний спосіб детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю за допомогою багатоканального ЕС "сендвіч"-методу твердофазного ІФА

[0282] Наступний приклад ілюструє багатоканальні імунологічні способи детектування активності ендопептидаз зі зміненою націленістю шляхом детектування продукту розщеплення SNAP-25 з використанням моноклональних анти-SNAP-25 антитіл, специфічних до продукту розщеплення SNAP-25, і другої пари антитіл до іншого білка.

[0283] Тест на активність ендопептидази зі зміненою націленістю можна провести за допомогою багатоканального "сендвіч"-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілюмінесценцією. Такий тест описаний у родинній заявці на патент на ім'я Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, заявка на патент США № 12/403531, яка повністю включена в дану заявку за допомогою посилання, і його можна використовувати із клітинними лініями, ендопептидазами зі зміненою націленістю й відповідними клітинними лініями, описаними в даній заявці.

Приклад XIV

Імунологічний спосіб детектування наномолярних кількостей ендопептидаз зі зміненою націленістю

[0284] Наступний приклад ілюструє здійснення імунологічних способів детектування наномолярних кількостей активності ендопептидаз зі зміненою націленістю.

1. Імунологічний спосіб детектування ендопептидаз зі зміненою націленістю за допомогою "сендвіч"-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілюмінесценцією.

[0285] Для одержання лізатів із клітин, оброблених ендопептидазою зі зміненою націленістю, приблизно від 50000 до 150000 клітин зі стабільної клітинної лінії, що підходить для тесту, засівали в лунки 96-лункових, покритих полі-D-лізином, планшетів для культур тканин, що містять 100 мл відповідного середовища (див. Приклади I й II). Ці клітини інкубували при 37 °С в

інкубаторі з вмістом вуглекислого газу 5 % протягом 24 годин. Середовище від клітин видаляли аспірацією з кожної лунки й заміняли свіжим середовищем, що містить 0 (неопрацьований зразок) або підходящу дозу відповідно до відповіді, як описано в даній заявці для кожної ендопептидази зі зміненою націленістю. Після інкубації протягом 24 годин, клітини промивали й збирали, або інкубували протягом додаткових двох днів під час відсутності ендопептидази зі зміненою націленістю перед збиранням. Для збирання клітин, середовище видаляли аспірацією, промивали 1 х ФБР і лізували клітини шляхом додавання в кожну лунку 30 мкл лізуючого буфера, що містить 50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EGTA, 1 % Triton X-100, і інкубували планшет на струшувачі з обертанням при 500 об/хв протягом 30 хвилин при 4 °C. Для осадження залишків клітин планшет центрифугували при 4000 об/хв протягом 20 хвилин при 4 °C, після чого супернатант переносили в 96-лунковий планшет, покритий антитілами для захоплення, для проведення етапу детекції.

[0286] Розчин антитіл для захоплення α -SNAP-25, розчин детектуючих анти-SNAP-25 антитіл і твердофазну підкладку, що містить антитіла для захоплення, які специфічні до розщепленого продукту SNAP-25, одержували як описано в Прикладі VII.

[0287] Для детектування присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою "сендвіч"-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілумінесценцією, зі збережених планшетів видаляли аспірацією блокуючий буфер, до кожної лунки додавали 25-30 мкл клітин, оброблених ендопептидазою зі зміненою націленістю, і планшети інкубували при 4 °C протягом 2 або 24 годин. Лунки планшета трикратно промивали, видаляючи аспірацією клітинний лізат і три рази обполіскуючи кожну лунку 200 мкл 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після промивання, у кожну лунку додавали 25 мкл розчину детектуючих анти-SNAP-25 антитіл у концентрації 5 мкг/мл, що містить 2 % блокуючого реактиву Amersham в 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат), планшет запечатували й інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години зі струшуванням. Після інкубації з детектуючими анти-SNAP-25 антитілами, лунки трикратно промивали 200 мкл 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після промивання планшети обробляли, зібрані дані аналізували й обчислювали EC₅₀ як описано в Прикладі VI. Ці результати показали, що в середньому при EC₅₀ детектували 1,0 нМ Noc/A у клітин із клональної клітинної лінії №3 SK-N-DZ (у діапазоні приблизно від 0,3 нМ до 2,0 нМ) при співвідношенні сигналу до шуму для верхньої асимптоти приблизно від 20:1 до 300:1. Крім того, у середньому при EC₅₀ детектували 3,7 нМ Noc/A у клітин із клональної клітинної лінії №6 AGN P33 (у діапазоні приблизно від 2,0 нМ до 5,5 нМ) при співвідношенні сигналу до шуму для верхньої асимптоти приблизно від 20:1 до 500:1. Для клітин SK12, специфічних для ендопептидази зі зміненою націленістю, що містить ліганд динорфін А, у середньому при EC₅₀ детектували 8,4 нМ Dyn/A у клітин SK12 (у діапазоні приблизно від 4,5 нМ до 10,0 нМ) при співвідношенні сигналу до шуму для верхньої асимптоти приблизно від 10:1 до 20:1. Крім того, у середньому при EC₅₀ детектували 8,8 нМ галанін-TVEMP у клітин із клональної клітинної лінії №7 Neuro-2a (у діапазоні приблизно від 5,0 нМ до 15,5 нМ) при співвідношенні сигналу до шуму для верхньої асимптоти приблизно від 20:1 до 200:1. Цей спосіб можна також застосовувати в багатоканальному режимі, як описано в Прикладі IX.

2. Імунологічний спосіб детектування ендопептидаз зі зміненою націленістю за допомогою CL "сендвіч"-методу твердофазного ІФА.

[0288] Лізат із клітин, оброблених ендопептидазою зі зміненою націленістю, і розчин антитіл для захоплення α -SNAP-25 одержували як описано в Прикладі VII. Розчин детектуючих анти-SNAP-25 антитіл і твердофазну підкладку, що містить антитіла для захоплення, які специфічні до розщепленого продукту SNAP-25, одержували як описано в Прикладі VIII.

[0289] Для детектування присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою CL "сендвіч"-методу твердофазного ІФА, до кожної лунки додавали 100 мкл лізату клітин, оброблених ендопептидазою зі зміненою націленістю, планшети запечатували й інкубували на струшувачі з обертанням 500 об/хв при 4 °C протягом 2 годин або 24 годин. Лунки планшета трикратно промивали, видаляючи аспірацією клітинний лізат і три рази обполіскуючи кожну лунку 200 мкл 1 х ФБР, 0,05 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після промивання, у кожну лунку додавали 100 мкл розчину детектуючих поліклональних анти-SNAP-25 антитіл/HRP у концентрації 1 мкг/мл, що містить 2 % блокуючого реактиву Amersham в 1 х ФБР, 0,1 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат), планшет запечатували й інкубували на струшувачі з обертанням 650 об/хв при кімнатній температурі протягом 1 години. Після інкубації з детектуючими антитілами, лунки трикратно промивали 200 мкл 1 х ФБР, 0,05 % TWEEN-20® (поліоксиетилен (20) сорбітан монолауреат). Після промивання в кожну лунку додавали 100 мкл суміші SuperSignal ELISA Pico 1:1 (Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд,

Іллінойс) і аналізували планшети, використовуючи люмінометр (Molecular Devices, Саннівейл, Каліфорнія) на 395 нм. Зібрані дані аналізували й обчислювали EC50 як описано в Прикладі VI. Цей спосіб можна також застосовувати в багатоканальному режимі як описано в Прикладі IX.

Приклад XV

Імунологічний спосіб детектування нейтралізуючих антитіл проти ендопептидази зі зміненою націленістю

[0290] Наступний приклад ілюструє здійснення імунологічного способу, здатного детектувати присутність нейтралізуючих анти-Noc/A антитіл.

[0291] У цей час Noc/A проходить оцінку на предмет придатності для лікування хворобливих станів, деякі з яких є хронічними. При повторному довгостроковому лікуванні за допомогою Noc/A у пацієнта можуть з'явитися нейтралізуючі анти-Noc/A антитіла до ендопептидази зі зміненою націленістю, що призведе до імунної резистентності. Нейтралізуючі антитіла Noc/A інгібують активність ендопептидази зі зміненою націленістю, блокуючи поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю нейронними й іншими клітинами-мішенями шляхом зв'язування із націлюючим лігандним доменом та/або транслокаційним доменом (HN) ендопептидази зі зміненою націленістю. На сьогоднішній день відсутній затверджений тест для визначення присутності нейтралізуючих анти-Noc/A антитіл у крові пацієнта. Розробка клітинного тесту для детектування нейтралізуючих антитіл у пацієнтів, які проходять лікування за допомогою ендопептидаз зі зміненою націленістю, дозволить підвищити економічну ефективність й економію часу.

[0292] Для детектування присутності або відсутності нейтралізуючих анти-Noc/A антитіл можна використовувати імунологічні способи визначення активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, описані в даній заявці. Одним з таких способів є визначення кількості продукту розщеплення SNAP-25, який присутній після обробки різними концентраціями Noc/A й детектування за допомогою Вестерн-блотінгу, іншим способом є детектування за допомогою "сендвіч"-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілюмінесценцією.

[0293] Для приготування зразка, що містить нейтралізуючі анти-Noc/A антитіла, виділяли сироватку із крові мавпи, імунізованої α -Noc/A, і одержували з неї антитіла за допомогою афінного очищення. Також проводили імунізацію кроликів пептидом варіанта ноцицептину, націлюючого ліганд, який є присутнім у молекулі Noc/A, збирали їх сироватку й виділяли антитіла за допомогою афінного очищення (з використанням поліклональних антитіл проти ноцицептину).

[0294] Для одержання лізату із клітин, оброблених зразком, що містить Noc/A, клітини із клональної клітинної лінії №3 SK-N-DZ і клітини із клональної клітинної лінії №6 AGN P33 засівали в 96-лункові планшети, покриті полі-D-лізином, на 16-18 годин. Поліклональні антитіла проти ноцицептину в концентрації 0-3 мкг/мл розбавляли СБС RPMI (з додаванням N2, B27 й NGF), що містить 1 нМ Noc/A, і проводили попередню інкубацію суміші при кімнатній температурі протягом 1 години. Потім розчини додавали до клітин й інкубували протягом 24 год. перед проведенням тестів згідно ECL-методу твердофазного ІФА. Дані антитіла проти варіанта ноцицептину повністю блокували поглинання 1 нМ Noc/A при концентрації 1 мкг/мл (> 90 % інгібування) в обох клітинних лініях. Мавпячі поліклональні антитіла проти Noc/A також протестували із цими клітинними лініями. Клітини засівали в 96-лункові планшети, покриті полі-D-лізином, по 100000 клітин на лунку в живильне середовище RPMI, що містить N2, B27 й NGF, на 24 години. Поліклональні антитіла проти Noc/A у концентрації 0-20 мкг/мл розбавляли середовищем, що містить 1 нМ Noc/A, і проводили попередню інкубацію суміші при кімнатній температурі протягом 1 години. Потім суміш додавали до клітин й інкубували протягом 24 год. перед проведенням тестів згідно ECL-методу твердофазного ІФА. У клітинній лінії SK-N-DZ спостерігали інгібування до 60 % при найвищих концентраціях поліклональних антитіл проти Noc/A 6-20 мкг/мл і близько 30 % у клональній клітинній лінії №6 AGN P33. Це можна пояснити тим, що поліклональні антитіла проти Noc/A не специфічні відносно ділянки зв'язування й включають інші антитіла, які зв'язуються з іншими ділянками молекули, досягаючи лише часткового блокування при досліджених концентраціях. Для досягнення повного блокування можуть знадобитися більш високі концентрації.

[0295] Для детектування присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою Вестерн-блотінгу, з кожної лунки видаляли аспірацією живильне середовище, клітини суспендували в 50 мкл буфера для завантаження ДСН-ПААГ і нагрівали зразки при 95 °C протягом 5 хвилин. Аліквоти від кожного зібраного зразка аналізували Вестерн-блотінгом як описано в Прикладі I, за винятком того, що зібрані зразки розділяли на ДСН-ПААГ, використовуючи 12 % гелі Criterion на 26 лунок (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Каліфорнія), і як первинні антитіла використовували кролячі поліклональні анти-SNAP-25 антитіла₁₉₇ (див.

Приклад V). Результати дозволили ідентифікувати найменшу концентрацію ендopeптидази зі зміненою націленістю, що призводить до появи детектованої смужки на Вестерн-блоті, що відповідає продукту розщеплення SNAP-25.

[0296] Для детектування присутності розщепленого продукту SNAP-25 за допомогою "сендвіч"-методу твердофазного ІФА з посиленою хемілюмінесценцією, з кожної лунки видаляли середовище й лізували клітини як описано в Прикладі VI. Розчин антитіл для захоплення α -SNAP-25, розчин детектуючих анти-SNAP-25 антитіл і твердофазну підкладку α -SNAP-25 одержували як описано в Прикладі VIII. Супернатанти наносили на твердофазну підкладку α -SNAP-25 і тест згідно ECL "сендвіч"-методу твердофазного ІФА проводили відповідно до детального опису із Приклада VI. Зібрані дані аналізували й обчислювали EC_{50} як описано в Прикладі VI, за винятком того, що EC_{50} являла собою розведення сироватки, необхідне для інгібування активності ендopeптидази зі зміненою націленістю до $\frac{1}{2}$ її максимального значення, а співвідношення максимального сигналу ($Signal_{Max}$) до мінімального сигналу ($Signal_{Min}$) одержували шляхом розділення інтенсивності сигналу від продукту розщеплення SNAP-25, одержаного при найбільшому розведенні антитіл, на інтенсивність сигналу, одержаного при найменшому розведенні антитіл.

[0297] Результати продемонстрували можливість детектування присутності нейтралізуючих анти-Noc/A антитіл у сироватці мавпи й антитіл проти варіанта ноцицептину у кролика. Активність молекул Noc/A, проінкубованих з антитілами, що пройшли афінне очищення з імунізованої тварини, знижувалася в міру зниження ступеня розведення антитіл. Той самий тест проводили із сполуками Dyp/A і галанін-TVEMP з використанням клітинних ліній, специфічних для кожної тестувальної сполуки.

Приклад XV

Розробка клітинного тесту на ендopeптидазу зі зміненою галаніновою націленістю

[0298] Наступний приклад ілюструє ідентифікацію стабільних клітинних ліній, що мають здатність поглинати ендopeптидази зі зміненою націленістю, необхідних для розробки клітинного тесту на активність.

1. Вирощування запасних культур клітинних ліній-кандидатів

[0299] Для вирощування клітинних ліній, культуру підходящої щільності клітин з тестувальної клітинної лінії засівали у флакони для культур тканин на 162 cm^2 , що містять 30 мл підходящого живильного середовища (див. Таблицю 25), і інкубували при 37°C в інкубаторі з вмістом вуглекислого газу 5 % або 10 % до досягнення клітинами бажаної щільності.

Таблиця 25

Зведена таблиця всіх клітинних ліній і відповідних їм середовищ.

Тип клітин; опис; джерело	Повне середовище (ПС) Все від Invitrogen (якщо не зазначене інше)	Середовище без сироватки (СБС) Все від Invitrogen (якщо не зазначене інше)
SiMa (Клітинна лінія нейробластоми людини, DSMZ# ACC 164, Брауншвейг, Німеччина) SiMa H1 (клонована клітинна лінія із клітин SiMa)	RPMI 1640 (90 %) Ембріональна бичача сироватка (ЕБС, 10 %) ЗАДО (0,1 мм), HEPES (10 мм), Піруват натрію (1 мм) Пеніцилін (100 од. на мл) Стрептоміцин (100 мкг на мл),	RPMI 1640 (90 %) ЗАДО (0,1 мм), HEPES (10 мм), Піруват натрію (1 мм) Пеніцилін (100 од. на мл) Стрептоміцин (100 мкг на мл) Добавка N2 (1x) Добавка B27 (1x)
Neuro-2a (Нейробластоми миші: (ATCC#CCL131, Манасас, Вірджинія)	MHC Ерла (90 %) Ембріональна бичача сироватка 10 % ЗАДО (0,1 мм), HEPES (10 мм), Піруват натрію (1 мм), Пеніцилін (100 од. на мл), Стрептоміцин (100 мкг на мл)	MHCE (90 %) ЗАДО (0,1 мм), HEPES (10 мм), Піруват натрію (1 мм), Пеніцилін (100 од. на мл), Стрептоміцин (100 мкг на мл)

Продовження таблиці 25

Тип клітин; опис; джерело	Повне середовище (ПС) Все від Invitrogen (якщо не зазначене інше)	Середовище без сироватки (СБС) Все від Invitrogen (якщо не зазначене інше)
PC-12 Феохромоцитома пацюка (ATCC # CRL-1721)	RPMI 1640 (90 %) Діалізована ЕБС (5 %) Сироватка коня (10 %) HEPES (10 мм) Піруват натрію (1 мм) D-глюкоза (0,5 %, Sigma) Пеніцилін (100 од. на мл); Стрептоміцин (100 мкг на мл) Добавка N2 (1x)	Середовище для диференціювання: RPMI 1640 (90 %) HEPES (10 мм) Піруват натрію (1 мм) D-глюкоза (0,5 %, Sigma) Пеніцилін (100 од. на мл); Стрептоміцин (100 мкг на мл) Добавка N2 (1x) Альбумін бичачої сироватки (0,2 % вага./об.) NGF (50 нг на мл, Promega)
P19 Ембріональна карцинома миші (ATCC #CRL-1825)	MHC Alpha (90 %) Ембріональна теляча сироватка (7,5 %) ЕБС (2,5 %) Пеніцилін (100 од. на мл); Стрептоміцин (100 мкг на мл)	MHC Alpha (90 %) ЕБС (2,5 %) Пеніцилін (100 од. на мл); Стрептоміцин (100 мкг на мл)

ЗАДО: замінні амінокислоти, МНС: мінімальне необхідне середовище. МНСД: МНС Дульбеко. МНСЕ - МНС Ерла. Варто звернути увагу на те, що диференціювання клітин PC-12 проводили в середовищі для диференціювання, а не в СБС.

2. Скринінг комерційних клітинних ліній на чутливість до сполук галанін-TVEMP.

- [0300] Проводили скринінг комерційних клітинних ліній на чутливість до сполук галанін-TVEMP, що вимірювалася згідно розщепленню SNAP25 після обробки відповідними сполуками. Для скринінга й тестування використовували різні сполуки галанін-TVEMP. Клітини PC-12, Neuro-2a, SiMa й P19 засівали в середовище без сироватки на три дні або в ПС на один день. Ці диференційовані клітини й клітини, що не піддавалися обробці, обробляли протягом 18 годин галанін-TVEMP із серії А в концентраціях 0 й 75 нМ. Галанін-TVEMP із серії А продемонстрував активність як у клітинах PC-12, так і у клітинах Neuro-2a, про що свідчили за збільшенням присутності розщепленого SNAP25, і клітини Neuro-2a у диференційованому стані більш чутливі до сполук TVEMP з лігандом галаніну, ніж клітини, що не піддавалися обробці. За критерієм активності клітин, PC-12 знаходиться на першому місці, за якими йдуть Neuro-2a, і нарешті, клітини SiMa. Було необхідно визначити, чи було поглинання специфічним для цих сполук зі зміненою галаніновою націленістю, і тому було важливо провести тестування цих клітин з іншими сполуками, які не містять галанінового ліганду. Noc/A являє собою сполуку зі зміненою націленістю, що містить як ліганд варіант ноцицептину, а також сполуку LHN/A (негативний контроль), у якій відсутніх домен зв'язування. Поглинання LHN/A є неспецифічним і повинне мати значно більш низьку активність, ніж поглинання сполуки галанін-TVEMP, якщо клітинна лінія має специфічне поглинання сполук зі зміненою націленістю. Як було показано раніше, сполука Noc/A специфічно поглинається клітинами SiMa, і ця сполука використовувалася як базовий рівень при тестуванні клітинних ліній. Підходяща клітинна лінія повинна мати низький рівень поглинання сполук LHN/A й Noc/A і високий рівень поглинання сполук галанін-TVEMP. Таблиця 26 демонструє результати цього експерименту.

25

Таблиця 26

Скринінг клітин PC-12, Neuro-2a й SiMa у різних умовах за допомогою галанін-TVEMP.

		Галанін-TVEMP із серії А	Галанін-TVEMP із серії В	LH _N /A	Noc/A
Конц. (мг/мл)		0,168	0,175	1,63	1,00
Значення EC ₅₀ (нм)	PC-12, що не піддавалися обробці	73,4±10,7	105,6±16,0	>200	72,9±26,9
	SiMa, що не піддавалися обробці	138,6±43,9	133,8±24,2	>300	48,3±18,1
	Neuro-2a, що не піддавалися обробці	122,4±15,7	116±17,5	>200	>150
	SiMa, Диф ніч	>400	>150	>400	16,1±11,9
	Neuro-2a Диф 4 д		34,5±7,5	39,7±5,6	105,9±44,3
	SiMa, Диф 4 д	101,8±20,5	65,3±7,8	>150	88,7±23,3

Тестування галанін-TVEMP із серій А й В і контролів LH_N/A й Noc/A з різними клітинними лініями й умовами росту/диференціювання. Зведена таблиця демонструє детальну інформацію про кожну протестовану сполуку й значення EC₅₀.

[0301] Результати демонструють, що в протестованих клітинних лініях криві або значення EC₅₀ для галанін-TVEMP із серії А і галанін-TVEMP із серії В подібні з негативними контролями або більш активні лише в 1-2 рази. Ці дані передбачають, що нативні клітини не мають достатню чутливість та їх необхідно трансфікувати плазмідами, що кодують білки-рецептори галаніну GalR1 або GalR2.

3. Стабільна трансфекція клітин PC-12, Neuro-2a й SiMa за допомогою GalR.

[0302] За один день до трансфекції клітини висівали із щільністю $0,5 \times 10^6$ клітин/лунка в 6-лункові планшети, покриті колагеном IV (Cat#354554: BD Biosciences) (SiMa, PC-12) або 6-лункові планшети Costar (Cat# 3516: Corning) (Neuro-2a). Трансфекції проводили, розбавляючи 12 мкл реагенту Lipofectamine™ 2000 (Cat # 52758, Invitrogen) в 250 мкл середовища з відновленою сироваткою Opti-MEM® I (Cat# 3195, Invitrogen) й інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Чотири мікрограми плазмідної ДНК GalR змішували з 0,4 мкг вектори рAdVantage™ (1 мг на мл, Cat#E1711, Promega) в 250 мкл середовища з відновленою сироваткою Opti-MEM® I протягом 5 хвилин. Після 5 хвилин інкубації розведений Lipofectamine™ 2000 і розведену плазмідну ДНК змішували й інкубували протягом ще 20 хвилин при кімнатній температурі для утворення комплексу. Тим часом клітини промивали OPTI-MEM®, і до кожної лунки додавали 0,5 мл OPTI-MEM®. Після 20-хвилинної інкубації, 0,5 мл, що містять комплекси розведеного Lipofectamine™ 2000 і розведеної плазмідної ДНК, обережно додавали до лунок із клітинами в 0,5 мл OPTI-MEM®. Планшет інкубували при 37 °C протягом 5 годин, а потім додавали 1 мл повного середовища. Наступного дня середовище замінювали живильним середовищем на 48 годин. На 4 день, після того, як клітини відновлювалися після трансфекції, живильне середовище замінювали свіжим живильним середовищем, що містить Geneticin® (Cat #10131: Invitrogen) у концентрації 0,5 мг на мл (розведення 1:100), й інкубували протягом ще 3 днів. На 7 день після трансфекції клітини переносили в покритий колагеном IV флакон на 75 см (Cat# 35423: BD Biosciences), що містить живильне й з генетицин (0,5 мг на мл, розведення 1:100). Після цього перенесення приблизно 90 % клітин гинули і їх видаляли при зміні середовища. Живильне середовище, що містить генетицин (0,5 мг на мл, розведення 1:100), замінювали кожні два дні до дня 21.

[0303] Для добору стабільних клітин, здатних поглинати сполуки галанін-TVEMP, використовували параметри для скринінга на клони, які виробляли найбільший відсоток розщеплення SNAP25 при обробці галанін-TVEMP в ECL "сендвіч"-методі твердофазного ІФА з використанням планшетів з імобілізованими моноклональними антитілами 2E2A6 для захоплення й поліклональних сульфомічених детектуючих антитіл SNAP25 (Sigma Cat # S9684). Значення EC₅₀ у Таблиці 27 показують, що галанін-TVEMP із серії D демонструє поглинання, яке щонайменше 10-кратно перевищує показник у негативному контролі, для клітин SiMa й Neuro-

2а, трансфікованих GalR1 й GalR2, і лише 2-4-кратно перевищує показник у негативному контролі для трансфікованих клітин PC-12. Оскільки трансфіковані клітини PC-12, очевидно, характеризуються більш низькою чутливістю й націленістю у порівнянні із клітинами SiMa й Neuro-2а, їх не клонували. Крім того, оскільки 1-16-мірний галаніновий ліганд у складі сполук галанін-TVEMP зв'язується з рецептором GALR1 з більшою афінністю, ніж з GALR2, клонували тільки клітини, трансфіковані GALR1. Фігура також показує, що галанін-TVEMP із серій С й D демонструють поглинання, що 9-10-кратно перевищує показники як для LHN/A, так і для сполуки зі зміненою ноцицептиною націленістю ноцицептин-TVEMP, в Neuro-2а GalR1.

Таблиця 27

Тест стабільно трансфікованих, але неклональних популяцій SiMa, Neuro-2а й PC12, трансфікованих рецепторами GalR1 або GalR2

		Галанін-TVEMP C	Галанін-TVEMP D	LH _N /A	Ноцицептин- TVEMP
Конц. (мг/мл)		1,260	0,303	1,46	1,00
EC ₅₀ Значення (нм)	SiMa Gal1		36,2±8,6	>300	
	SiMa Gal2		26,6±6,7	>300	
	PC-12 Gal1		64,1±19,5	202,7	
	PC-12 Gal2		>150	>300	
	Neuro-2а Gal1	32,2±3,3	40,8±6,0	>300	>300
	Neuro-2а Gal2	35,2±3,1	46,0±6,1	>300	>300

[0304] Неклональні відібрані популяції не підходять для використання на регулярній основі, тому що вони містять суміш клітин, що експресують різні рівні рецептора, і ці популяції можуть змінюватися згодом. Для одержання стабільних клітинних ліній, які утворилися з одиничних клітин, почали клонування за допомогою розведень. На 21 день трансфіковані клітини трипсинізували, розділяли за допомогою голки й підраховували. Трансфіковані клітинні лінії, що залишилися, заморожували для використання в майбутньому. Клітини послідовно розводили до щільності 10 клітин на мл у живильному середовищі, що містить генетин (0,5 мг на мл, розведення 1:100). Клітини засівали в 2 × 96-лункові планшети, покриті колагеном IV (SiMa, PC-12), або в 2 × 96-лункові планшети Costar (Neuro-2а) по 100 мкл у лунку для досягнення щільності 1 клітина на лунку. Планшети повертали в інкубатор і залишали недоторканими протягом двох тижнів для утворення колоній. Після двох тижнів (35 день), лунки ретельно перевіряли на присутність одиничних колоній, що утворилися на дні лунок (всю лунку ретельно перевіряли на наявність множинних колоній). При виявленні лунки з єдиною групою клітин, всю цю лунку ретельно досліджували, щоб впевнитися, що була присутня одна й тільки одна група клітин. Цю єдину групу фотографували. Якщо були присутні які-небудь сумніви про наявність додаткових груп, таку лунку не відбирали. На 36 день відібрані клони відокремлювали за допомогою TrypLE і додавали 0,5 мл повного середовища, що містить генетин (0,5 мг на мл, розведення 1:100), для зупинки реакції трипсинізації. Весь об'єм переносили в 6-лункові планшети, а потім розбавляли додатковими 3,0 мл повного середовища, що містить генетин (0,5 мг на мл, розведення 1:100). Клони культивували до досягнення 90 %-ї конфлюентності, потім знову трипсинізували й переносили у флакони на 75 см, покриті колагеном IV, або флакони Costar з 10,0 мл повного середовища, що містить генетин (0,5 мг на мл, розведення 1:100). По досягненні 90 %-ї конфлюентності клітини використовували для заповнення трьох кріопробірок для зберігання в замороженому виді або для скринінга в тесті із твердофазним ІФА на сполуки зі зміненою галаніною націленістю.

[0305] Еталонну сполуку галанін-TVEMP із серії С використовували для перевірки цих клонів за допомогою двох виконавців, що проводять незалежні тести. Клон SiMa GalR1 росли повільно й були в цей час недоступні для тестування. На щастя, клони Neuro-2а росли швидше, і незабаром достатні кількості 8 з 12 клонів були доступні для тестування. Ці клональні клітини Neuro-2а GalR1 тестували з повним діапазоном доз сполук галанін-TVEMP (0-300 нМ), і результати тестування дев'яти із цих клонів наведені нижче. Чотири клони, що залишилися, росли дуже повільно й не були протестовані. Відібрані, але неклональні батьківські клітини висівали поряд із клонами, щоб використовувати їх як точки відліку. У Таблиці 28 представлена активність кожного з восьми клонів разом з відібраними неклональними клітинами Neuro-2а GalR1 при тестуванні із сполукою галанін-TVEMP. З восьми протестованих клонів тільки клони № 4, 7 й 12 показали хороше поглинання сполук галанін-TVEMP із прийнятними значеннями

EC₅₀. Клоні № 1, 3 й 10 Neuro-2a GalR1 не поглинали сполуку галанін-TVEMP, у той час як клони № 5, 11 й 13 разом з неклональною популяцією демонстрували дуже високі значення EC₅₀, і ці клітини виключили з подальшого тестування.

Таблиця 28

Результати скринінга клонів Neuro-2a Gal1, одержаних з одиничних клітин, за допомогою галанін-TVEMP із серії C.

Планшет	Тип клітин	EC ₅₀ ± Станд. помилка (нМ)	
		Виконавець 1	Виконавець 2
1	N2A Неклональні	82,1±9,6	92,0±10,8
1	N2A GALR1 Клон №1	>300	>300
1	N2A GALR1 Клон №3	>300	>300
1	N2A GALR1 Клон №4	39,7±3,4	39,4±6,6
2	N2A Неклональні	211,2±167,7	116,0±26,8
2	N2A GALR1 Клон №5	202,6±82,9	113,0±18,1
2	N2A GALR1 Клон №7	23,1±3,3	15,5±1,8
2	N2A GALR1 Клон №10	>300	>300
3	N2A GALR1 Клон №7	20,3±1,6	38,0±6,3
3	N2A GALR1 Клон №11	270,0±243	247,0±101
3	N2A GALR1 Клон №12	43,2±5,2	57,5±14,3
3	N2A GALR1 Клон №13	144,1±143	184,7±15,6

5

4. Дослідження експресії GalR1 у клональних клітинних лініях

[0306] Скринінг клонів показав, що тільки клони № 4,7 й 12 були більш чутливі, ніж неклональні клітини. Із цих 3 клонів, як і з нетрансфікованих батьківських і стабільно трансфікованих неклональних клітин Neuro-2a, видаляли матричну РНК (мРНК) для дослідження за допомогою ПЛР-РВ із використанням умов ПЛР-РВ, описаних у Прикладі V, і праймерів, описаних у Таблиці 29.

10

Таблиця 29

Праймери, специфічні для GALR1 й GALR2

Назва	Послідовність	SEQ ID NO:
GALR1 fwd	5' ' CCCCATCATGTCATCCACCT 3'	150
GALR1 rev	5' ATGGGGTTTACCCGAGGAGTT 3'	151
GALR2 fwd	5' CATCGTGGCGGTGCTTTT 3'	152
GALR2 rev	5' AGCGGGAAGCGACCAAAC 3'	153

[0307] Результати в Таблиці 30 демонструють, що у трансфікованих неклональних клітин і клонів кількість мРНК GALR1 набагато більше, ніж у батьківських клітин. Клітинний скринінг за допомогою галанін-TVEMP показав, що клон №7 був самим чутливим до галанін-TVEMP. Також було показано, що клон №7 містив найбільшу кількість мРНК GALR1 відповідно до Таблиці 30. Значення СТ для клону 7 Neuro-2a GalR1 (Neuro-2a №7) були найнижчими, а за ними йшли значення для клону 4 і потім для клону 12. Неклональні клітини, протестовані на той момент часу, демонстрували значення СТ, близькі до значень для клону 12, однак ці клітини містили постійно мінливі популяції клітин з концентраціями рецептора GalR1, що варіюють, і тому не вважалися хорошою популяцією для подальшої роботи. Із трьох клонів з низькими значеннями EC₅₀, клон №12 Neuro-2a GalR1 (Neuro-2a №12) характеризувався найбільшою швидкістю росту, а за ним йшли клон №7 Neuro-2a, і нарешті, клон №4 Neuro-2a. На додаток до повільної швидкості росту, клон №4 Neuro-2a не тестували надалі, тому що чутливість клону №7 Neuro-2a була набагато краще, ніж у клону №4.

15

20

25

Таблиця 30

Високі відмінності рівнів мРНК GALR1 між трансфікованими клональними клітинами Neuro-2a і трансфікованими неклональними й батьківськими клітинами.

Клітинна лінія	Батьківська	Неклональна	Клон 4	Клон 7	Клон 12
Серед. СТ	32,0	21,7	20,8	19,3	21,6
Кратність різниці рівнів мРНК	1,0	1269,5	2418,7	6793,8	1332,6

5. Порівняння чутливості й специфічності клонів №7 й 12 Neuro-2a до сполук галанін-TVEMP [0308] Два клони паралельно протестували з метою ідентифікації найбільш чутливого й специфічного з них, щоб можна було впевнено збирати дані від клону із кращими характеристиками. Таблиця 31 демонструє результати цих двох клонів при обробці галанін-TVEMP із серії С й LHN/A для дослідження відповідно чутливості й вибіркової. Обидва клони показували високі значення співвідношення сигналу до шуму. Клон №7 Neuro-2a продемонстрував EC_{50} 5,5 нМ, у той час як EC_{50} для клону №12 Neuro-2a становило 68,4 нМ. Клон №12 Neuro-2a необхідно тестувати у діапазоні доз 0-300 нМ, у той час як клон №7 Neuro-2a можна тестувати у діапазоні доз 0-30 нМ для досягнення плато при найбільшій використовуваній концентрації. Обидва клони показували хороше розділення між LHN/A і галанін-TVEMP із серії С. Клон №12 Neuro-2a демонстрував деяке неспецифічне поглинання при високих концентраціях, у той час як клон №7 Neuro-2a не демонстрував його. Як виявляється з наведених у таблиці результатів, діапазон для тестування за допомогою клітин Neuro-2a №7 в 10 раз нижче, ніж діапазон для клітин Neuro-2a №12, що призводить до використання в 10 раз меншої кількості сполук з Neuro-2a №7, ніж з Neuro-2a №12. Neuro-2a №7 в 8 раз більш селективний, ніж клон №12 Neuro-2a при використанні LHN/A для порівняння. Співвідношення сигналу до шуму становило більше 100 для обох клонів, однак для розробки клітинного тесту на активність досить значення співвідношення, що дорівнює 10. EC_{50} для клону №7 Neuro-2a становила 5,5 нМ і була приблизно в 12 раз нижче, ніж EC_{50} для Neuro-2a №12, що становила 68,4 нМ. Більш низький діапазон доз для тестування, 24-кратна вибірковість у порівнянні з LHN/A, високе значення співвідношення сигналу до шуму, чудова чутливість, що призводить до низького значення EC_{50} і низької кількості білка, необхідного для кожного тесту – всі ці характеристики говорили про те, що клон №7 Neuro-2a був кращим клоном для розробки клітинного тесту на активність, використовуваного для визначення співвідношення активності сполук галанін-TVEMP.

Таблиця 31

Порівняння характеристик клонів №7 й №12 Neuro-2a.

	Neuro-2a №7	Neuro-2a №12
Діапазон	0-30 нМ	0-300 нМ
Вибірковість	24-кратна	3-кратна
Співвідношення сигналу до шуму	190	547
Відсоток максимального сигналу LHN/A у порівнянні з максимальним сигналом гал-TVEMP	4,3 %	37,6 %
EC_{50}	5,5 нМ	68,4 нМ
Необхідна кількість білка	~ 1 мкг	~ 10 мкг

Neuro-2a №7 й №12 обробляли галанін-TVEMP із серії С й LHN/A протягом 16 годин у ПС. Активність детектували за допомогою ECL-методу твердофазного ІФА.

30 Приклад XVI

Одержання клональних клітинних ліній, надекспресуючих рецептор KOR-1 для поглинання ендопептидази зі зміненою націленістю динорфін А

- [0309] Наступний приклад описує дослідження й порівняння декількох клональних клітинних ліній, одержаних зі стабільної клітинної лінії шляхом її трансфекції рецептором-мішенню й наступним клонуванням цієї клітинної лінії. Даний конкретний приклад відноситься до

ідентифікації й дослідження клональних клітинних ліній, трансфікованих hKOR-1, які були вперше описані в Прикладі III, Таблиці 9.

[0310] Чотири клони AGN P33-KOR (клони номер 8, 9, 10 й 12 з Таблиці 9 у Прикладі III) відібрали й протестували з Дуп/А на повнодозову відповідь при 0-150 нМ. У той же самий час, два клони SiMa-KOR (клони номер 12 й 16 з Таблиці 9 у Прикладі III) відібрали й протестували з Дуп/А на повнодозову відповідь при 0-150 нМ. У цьому експерименті клони 8, 9 й 12 AGN P33-KOR продемонстрували дуже низьке поглинання й тому їх вилучили з подальшого дослідження; клон 10 AGN P33-KOR продемонстрував хороший рівень поглинання й для нього одержали значення EC_{50} , що становить 30,3 нМ. Два протестовані клони SiMa-KOR показали хороший рівень поглинання, і для клону 16 одержали значення EC_{50} , що становить 26,6 нМ, а для клону 12 одержали значення EC_{50} , що становить 11,8 нМ. Потім ці три клони протестували на чутливість і вибірковість шляхом порівняння поглинання сполуки-мішені Дуп/А з негативним контролем LHN/А, у якого відсутнє що націлює ліганд, і з контролем Nos/А. Порівняння трьох клонів і батьківських клітин SiMa за допомогою повнодозової відповіді при 0-150 нМ наведено в Таблиці 32.

Таблиця 32

Клітинна лінія	EC_{50} Дуп/А (нМ)	EC_{50} LHN/А (нМ)	EC_{50} Nos/А (нМ)
Батьківська SiMa	> 100	> 100	5,4
Клон 10 AGN P33-KOR	9,7	> 150	9,4
Клон 16 SiMa-KOR	10,6	> 100	1,6
Клон 12 SiMa-KOR	4,65	>150	19,7

[0311] Спостерігалось помітне збільшення поглинання Дуп/А у клонів, трансфікованих KOR-1, при обробці Дуп/А, у той час як батьківські клітини SiMa демонстрували мінімальне поглинання цієї сполуки (рівень поглинання був подібний такому в негативному контролі LHN/А). У всіх клітинних лініях, включаючи батьківські клітини SiMa, була присутня деяка кількість Nos/А. Це не було дивно, оскільки поглинання Nos/А у клітинах SiMa спостерігали при розробці тесту для цієї сполуки зі зміненою націленістю. Більше того, поглинання Nos/А було найкращим у клітинній лінії AGN P33, яка була одержана спеціально для цієї ендопептидази зі зміненою націленістю. Відмінність між поглинанням Nos/А і поглинанням сполуки Дуп/А була більше в клональних клітинах клону 12 SiMa-KOR (SK12). На всіх кривих активність негативного контролю, LHN/А, була мінімальна, демонструючи, що під час відсутності зв'язуючого домену специфічне поглинання в цих клітинних лініях відсутнє, і найбільш низьким було поглинання в клітинах SK12, показуючи, що поглинання сполуки Дуп/А є високо специфічним. На основі цих результатів клон SK12 відібрали для майбутньої оптимізації й дослідження.

[0312] Дослідження з оптимізації проводили із клітинами SK12 для розробки надійного, специфічного й чутливого тесту. Було досліджено декілька параметрів, включаючи середовище для засівання й щільності засівання, середовище для обробки й час обробки. Узагальнення даних, одержаних при оптимізації, наведено в Таблиці 33.

Таблиця 33

Використане середовище		Час обробки	Клітини/лунка				
засівання	обробка		25000	50000	75000	100000	150000
повна	повна	6 год. + на ніч	51,3	76	13,4	9,2	н/п
повна	повна	16 год.	21,3	19,0	4,96	4,64	н/п
повна	повна	16 год.	н/п	н/п	н/п	2,1	15,3
без сироватки	без сироватки	16 год.	н/п	н/п	н/п	9,0	12,1
повна	без сироватки	16 год.	н/п	10,3	5,4	8,97	8,38
повна	повна	16 год.	н/п	7,7	4,86	13,72	11,26
без сироватки	без сироватки	16 год.	н/п	11,2	8,5	8,4	9,2

[0313] Таблиця 33 показує, що клітини, засіяні із щільністю 100000 клітин на лунку в ПС й оброблені сполуками в ПС, демонстрували більшу мінливість значень EC_{50} від одного експерименту до іншого (4,6; 1,2 й 13,72 нМ), у той час як клітини, засіяні із щільністю 100000 клітин на лунку в СБС й оброблені сполуками, розведеними СБС, демонстрували кращі криві й однакові значення EC_{50} (9,0 й 8,4 нМ). У майбутньому, клітини варто засівати із щільністю 100000 клітин на лунку в СБС й обробляти сполуками також у СБС.

[0314] Клітини SK12, засіяні в покриті полі-D-лізин планшети із щільністю 100000 клітин на лунку в СБС на 24 години з наступною обробкою в СБС протягом 16 годин, демонстрували мінімальне значення EC50 8,4 +/- 1,1 нМ і співвідношення сигналу до шуму, що становило 12. Обидва ці значення є прийнятними для майбутнього використання цих клітин у КТА.

5 Дослідження клітин SK12 у тесті насичення зв'язування

[0315] Тест насичення зв'язування, що використовується тут, був детально описаний у Прикладі V. Дослідження з насичення зв'язування проводили з використанням 3Н-дипренорфіну, який є антагоністом KOR-1, для оцінки зв'язування. Загальне, специфічне й неспецифічне зв'язування вимірювали в декількох експериментах. Крива насичення зв'язування 10 3Н-дипренорфіну з рецептором була побудована на основі двох незалежних експериментів. Неспецифічне зв'язування, очевидно, становило близько 25 %, а 75 % залишалось на специфічне зв'язування молекули з рецептором. Афіність молекули до рецептора відповідала 6,5 нМ. Значення Bmax говорило про те, що на клітинах SK12 є присутніми 23 фмоль рецепторів KOR-1 на клітину.

15 [0316] Якщо не зазначено зворотне, всі числа, що виражають кількості компонентів, властивості, такі як молекулярна маса, умови реакції, і т.д. використовувані в заявці й формулі винаходу, повинні розумітися як доповнені терміном "приблизно" у всіх випадках. Відповідно, якщо не зазначено зворотне, чисельні параметри, наведені в описі й прикладеній формулі винаходу, є наближеннями, які можуть змінитися залежно від бажаних властивостей даного 20 винаходу, які необхідно одержати. Принаймні, і не як спроба обмежити застосування доктрини еквівалентів до об'єму формули винаходу, кожен чисельний параметр варто розглядати з урахуванням наведених значущих розрядів із застосуванням звичайних методів округлення. Незважаючи на те, що чисельні діапазони й параметри, що задають широкий об'єм винаходу, є наближеннями, чисельні дані, зазначені в певних прикладах, наведені настільки точно наскільки 25 це можливо. Будь-яке чисельне значення, однак, первісно містить певні помилки, які обов'язково впливають зі стандартного відхилення, що виявляється у відповідних експериментальних вимірюваннях.

[0317] Іменники й подібні позначення, використовувані в контексті опису винаходу (особливо в контексті наведеної нижче формули винаходу), варто розглядати як такі, що охоплюють й 30 однину, й множину, якщо не зазначено зворотне або з контексту явно не випливає зворотне. Перерахування діапазонів величин використовується винятково як зручна вказівка на кожну окрему величину, яка знаходиться в межах діапазону. Якщо в даному описі не зазначено зворотне, кожне окреме значення вважається згаданим у даному документі. Всі методи, описані тут, можуть бути здійснені в будь-якому підходящому порядку якщо в описі не зазначено інше 35 або зворотне явно не випливає з контексту. Використання кожного із прикладів, або типового виразу (наприклад, "такий як") наведене тут, направлене на краще висвітлення винаходу й не накладає обмежень на область застосування винаходу, якщо явно не зазначено зворотне. Мову, застосовану в описі, не слід розуміти як необхідний елемент, важливий для реалізації винаходу.

40 [0318] Групи альтернативних елементів або варіантів реалізації винаходу, розкритого тут, не слід розглядати як обмеження. Кожен член групи може бути згаданий і заявлений індивідуально або в будь-якій комбінації з іншими членами групи або іншими елементами, наведеними в даному описі. Очікується, що один або більше членів групи можуть бути включені в, або вилучені із групи, з міркувань зручності та/або патентоспроможності. Коли відбувається таке 45 включення або вилучення, опис варто розглядати як такий, що містить змінену групу, таким чином доповнюючи письмовий опис всіх груп Маркуша, використовуваних у прикладеній формулі винаходу.

[0319] У заявці описані деякі варіанти реалізації цього винаходу, включаючи кращий спосіб, відомий авторам винаходу. Звичайно, модифікації описаних варіантів реалізації стануть 50 очевидними фахівцям у цій галузі техніки після прочитання попереднього опису. Автор винаходу очікує, що кваліфіковані фахівці зможуть належним чином використовувати такі варіанти, і автори винаходу припускають, що винахід може бути здійснений інакше, ніж описано тут. Відповідно до діючого законодавства, даний винахід включає всі модифікації й еквіваленти об'єкта, описаного у формулі винаходу, що додається до цього документа. Більше того, будь- 55 яка комбінація вищеописаних елементів у всіх можливих їх варіаціях відноситься до винаходу, якщо в даному документі не зазначено зворотне або з контексту явно не випливає інше.

[0320] Певні варіанти реалізації, розкриті тут, можуть бути далі обмежені у формулі винаходу за допомогою виразу "складається з" або "по суті складається з". При використанні у 60 формулі винаходу, у поданні відомостей або додаванні як виправлення, вираз "складається з" виключає будь-який елемент, крок або компонент, не зазначений у формулі винаходу. Вираз

"що складається по суті з" обмежує об'єм формули винаходу зазначеними матеріалами або кроками й тими, які не впливають на основну(і) або нову(і) характеристику(и). Охарактеризовані таким чином варіанти реалізації винаходу невід'ємно або явно описані й наведені в даному описі.

5 [0321] Далі, в описі зроблені численні бібліографічні посилання на патенти й друковані праці. Кожне цитоване вище джерело й друкована праця включені в дану заявку за допомогою посилання.

10 [0322] У завершення, потрібно розуміти, що варіанти реалізації винаходу, розкриті тут, проілюстровані на основі принципів, що лежать в основі даного винаходу. У рамках цього винаходу можуть бути використані інші модифікації. Таким чином, як приклад, але не обмеження, альтернативні конфігурації даного винаходу можуть бути використані відповідно до суті даного винаходу. Відповідно, даний винахід не обмежений тільки тим, що продемонстровано й описано в даному описі.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Ванг, Джоанн

Жу, Хонг

Ходжес, Дайана Д.

Фернандес-Салас, Естер

<120> ІМУНОЛОГІЧНІ ТЕСТИ НА АКТИВНІСТЬ ЕНДОПЕПТИДАЗ ЗІ ЗМІНЕНОЮ НАЦІЛЕНІСТЮ

<130> 18496 (BOT)

<150> US 61/160,217

<151> 2009-03-13

<160> 153

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 903

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ендопептидаза зі зміненою націленістю

<400> 1

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

```

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

```

```

          725          730          735
Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn
          740          745          750
Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met
          755          760          765
Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn
          770          775          780
Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe
785          790          795          800
Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala
          805          810          815
Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu
          820          825          830
Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp
          835          840          845
Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly
          850          855          860
Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr
865          870          875          880
Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln
          885          890          895
Arg Leu Leu Ser Thr Leu Asp
          900

```

<210> 2

<211> 908

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ендопептидаза зі зміненою націленістю

<400> 2

```

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

```

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

```

Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe
    675          680          685
Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile
    690          695          700
Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr
705          710          715          720
Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser
    725          730          735
Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn
    740          745          750
Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met
    755          760          765
Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn
    770          775          780
Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe
785          790          795          800
Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala
    805          810          815
Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu
    820          825          830
Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp
    835          840          845
Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly
    850          855          860
Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr
865          870          875          880
Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln
    885          890          895
Arg Leu Leu Ser Thr Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
    900          905

```

<210> 3

<211> 906

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ендопептидаза зі зміненою націленістю

<400> 3

```

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

```

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

```

        610                615                620
Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile
625                630                635                640
Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp
        645                650                655
Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu
        660                665                670
Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val
        675                680                685
Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala
690                695                700
Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val
705                710                715                720
Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys
        725                730                735
Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile
        740                745                750
Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile
        755                760                765
Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn
770                775                780
Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser
785                790                795                800
Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp
        805                810                815
Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn
        820                825                830
Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn
        835                840                845
Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp
        850                855                860
Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
865                870                875                880
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Val Gly Arg Pro Glu
        885                890                895
Trp Trp Met Asp Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly
        900                905

```

<210> 4

<211> 919

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ендопептидаза зі зміненою націленістю

<400> 4

```

Met Glu 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	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							


```

Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu
      565      570      575
Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu
      580      585      590
Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His
      595      600      605
Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu
      610      615      620
Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys
      625      630      635      640
Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln
      645      650      655
Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp
      660      665      670
Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu
      675      680      685
Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile
      690      695      700
Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile
      705      710      715      720
Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val
      725      730      735
Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys
      740      745      750
Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val
      755      760      765
Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu
      770      775      780
Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln
      785      790      795      800
Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu
      805      810      815
Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn
      820      825      830
Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile
      835      840      845
Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp
      850      855      860
Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln
      865      870      875      880
Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile
      885      890      895
Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr
      900      905      910
Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
      915

```

<210> 5

<211> 206

<212> PRT

<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> PRT
 <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> PRT

<213> Macaca mulatta

<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> PRT

<213> Rattus norvegicus

<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> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<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> PRT
 <213> Mus musculus

<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> PRT
<213> Gallus gallus

```

```

<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> PRT
<213> Carassius auratus

```

```

<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> PRT

<213> Carassius auratus

<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> PRT
 <213> Danio rerio

<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> PRT
 <213> Danio rerio

<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> PRT
 <213> *Torpedo marmorata*

<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> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

<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
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> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

```

<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> PRT
 <213> *Strongylocentrotus purpuratus*

<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> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<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> PRT
 <213> *Hirudo medicinalis*

<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> PRT
 <213> *Loligo pealei*

<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> PRT
 <213> *Lymnaea stagnalis*

```

<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> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

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

```

<210> 25

<211> 370

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

```

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

```

```

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

```

<210> 26
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 26
Met Glu Pro Leu Phe Pro Ala Pro Phe Trp Glu Val Ile Tyr Gly Ser
  1      5      10      15
His Leu Gln Gly Asn Leu Ser Leu Leu Ser Pro Asn His Ser Leu Leu
      20      25      30
Pro Pro His Leu Leu Leu Asn Ala Ser His Gly Ala Phe Leu Pro Leu
      35      40      45
Gly Leu Lys Val Thr Ile Val Gly Leu Tyr Leu Ala Val Cys Val Gly
      50      55      60
Gly Leu Leu Gly Asn Cys Leu Val Met His Thr Lys Met Lys Thr Ala
      65      70      75      80
Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Thr Leu Val Leu
      85      90      95
Leu Thr Leu Pro Phe Gln Gly Thr Asp Ile Leu Leu Gly Phe Trp Pro
      100      105      110
Phe Gly Asn Ala Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Ile Asp Tyr Tyr Asn
      115      120      125
Met Phe Thr Ser Thr Phe Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Tyr
      130      135      140
Val Ala Ile Cys His Pro Ile Arg Ala Leu Asp Val Arg Thr Ser Ser
      145      150      155      160
Lys Ala Gln Ala Val Asn Val Ala Ile Trp Ala Leu Ala Ser Val Val
      165      170      175
Gly Val Pro Val Ala Ile Met Gly Ser Ala Gln Val Glu Asp Glu Glu
      180      185      190

```

```

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

```

```

<210> 27
<211> 372
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 27
Met Glu Pro Ala Pro Ser Ala Gly Ala Glu Leu Gln Pro Pro Leu Phe
  1          5          10          15
Ala Asn Ala Ser Asp Ala Tyr Pro Ser Ala Cys Pro Ser Ala Gly Ala
    20          25          30
Asn Ala Ser Gly Pro Pro Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ser Leu Ala Leu
    35          40          45
Ala Ile Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ser Ala Val Cys Ala Val Gly Leu
    50          55          60
Leu Gly Asn Val Leu Val Met Phe Gly Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met
    65          70          75          80
Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala
                85          90          95
Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Met Glu
    100          105          110
Thr Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys Ala Val Leu Ser Ile Asp
    115          120          125
Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val
    130          135          140
Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg
    145          150          155          160
Thr Pro Ala Lys Ala Lys Leu Ile Asn Ile Cys Ile Trp Val Leu Ala
                165          170          175
Ser Gly Val Gly Val Pro Ile Met Val Met Ala Val Thr Arg Pro Arg
    180          185          190
Asp Gly Ala Val Val Cys Met Leu Gln Phe Pro Ser Pro Ser Trp Tyr
    195          200          205
Trp Asp Thr Val Thr Lys Ile Cys Val Phe Leu Phe Ala Phe Val Val
    210          215          220
Pro Ile Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Leu Leu Arg Leu

```

```

225          230          235          240
Arg Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg Ser Leu
          245          250          255
Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Gly Ala Phe Val Val
          260          265          270
Cys Trp Ala Pro Ile His Ile Phe Val Ile Val Trp Thr Leu Val Asp
          275          280          285
Ile Asp Arg Arg Asp Pro Leu Val Val Ala Ala Leu His Leu Cys Ile
          290          295          300
Ala Leu Gly Tyr Ala Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe
305          310          315          320
Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Gln Leu Cys Arg Lys Pro
          325          330          335
Cys Gly Arg Pro Asp Pro Ser Ser Phe Ser Arg Ala Arg Glu Ala Thr
          340          345          350
Ala Arg Glu Arg Val Thr Ala Cys Thr Pro Ser Asp Gly Pro Gly Gly
          355          360          365
Gly Ala Ala Ala
          370

```

<210> 28
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 28
Met Glu Pro Ala Pro Ser Ala Gly Ala Glu Leu Gln Pro Pro Leu Phe
 1          5          10          15
Ala Asn Ala Ser Asp Ala Tyr Pro Ser Ala Phe Pro Ser Ala Gly Ala
 20          25          30
Asn Ala Ser Gly Pro Pro Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ser Leu Ala Leu
 35          40          45
Ala Ile Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ser Ala Val Cys Ala Val Gly Leu
 50          55          60
Leu Gly Asn Val Leu Val Met Phe Gly Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met
 65          70          75          80
Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala
 85          90          95
Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Met Glu
100          105          110
Thr Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys Ala Val Leu Ser Ile Asp
115          120          125
Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val
130          135          140
Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg
145          150          155          160
Thr Pro Ala Lys Ala Lys Leu Ile Asn Ile Cys Ile Trp Val Leu Ala
165          170          175
Ser Gly Val Gly Val Pro Ile Met Val Met Ala Val Thr Arg Pro Arg
180          185          190
Asp Gly Ala Val Val Cys Met Leu Gln Phe Pro Ser Pro Ser Trp Tyr
195          200          205
Trp Asp Thr Val Thr Lys Ile Cys Val Phe Leu Phe Ala Phe Val Val
210          215          220
Pro Ile Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Leu Leu Arg Leu
225          230          235          240
Arg Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg Ser Leu
          245          250          255

```



```

Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Gly Ala Phe Val Val
      260      265      270
Cys Trp Ala Pro Ile His Ile Phe Val Ile Val Trp Thr Leu Val Asp
      275      280      285
Ile Asp Arg Arg Asp Pro Leu Val Val Ala Ala Leu His Leu Cys Ile
      290      295      300
Ala Leu Gly Tyr Ala Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe
305      310      315      320
Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Gln Leu Cys Arg Lys Pro
      325      330      335
Cys Gly Arg Pro Asp Pro Ser Ser Phe Ser Arg Ala Arg Glu Ala Thr
      340      345      350
Ala Arg Glu Arg Val Thr Ala Cys Thr Pro Ser Asp Gly Pro Gly Gly
      355      360      365
Gly Ala Ala Ala
      370

```

<210> 29
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 29
Met Asp Ser Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Glu Pro Gly Pro Thr Cys
 1      5      10      15
Ala Pro Ser Ala Cys Leu Pro Pro Asn Ser Ser Ala Trp Phe Pro Gly
      20      25      30
Trp Ala Glu Pro Asp Ser Asn Gly Ser Ala Gly Ser Glu Asp Ala Gln
      35      40      45
Leu Glu Pro Ala His Ile Ser Pro Ala Ile Pro Val Ile Ile Thr Ala
      50      55      60
Val Tyr Ser Val Val Phe Val Val Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val
      65      70      75      80
Met Phe Val Ile Ile Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile
      85      90      95
Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Val Thr Thr Thr Met
      100      105      110
Pro Phe Gln Ser Thr Val Tyr Leu Met Asn Ser Trp Pro Phe Gly Asp
      115      120      125
Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr
      130      135      140
Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val
      145      150      155      160
Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys
      165      170      175
Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Ser
      180      185      190
Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile
      195      200      205
Glu Cys Ser Leu Gln Phe Pro Asp Asp Asp Tyr Ser Trp Trp Asp Leu
      210      215      220
Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu
      225      230      235      240
Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val
      245      250      255
Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile
      260      265      270
Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Val Cys Trp Thr

```

```

      275              280              285
Pro Ile His Ile Phe Ile Leu Val Glu Ala Leu Gly Ser Thr Ser His
  290              295              300
Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr
 305              310              315
Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
      325              330              335
Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Leu Lys Met Arg Met
      340              345              350
Glu Arg Gln Ser Thr Ser Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
      355              360              365
Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Gly Met Asn Lys Pro Val
  370              375              380

```

```

<210> 30
<211> 380
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

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

```

```

Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr
305          310          315          320
Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
          325          330          335
Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Leu Lys Met Arg Met
          340          345          350
Glu Arg Gln Ser Thr Ser Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
          355          360          365
Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Gly Met Asn Lys Pro Val
          370          375          380

```

```

<210> 31
<211> 493
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 31
Met Cys Leu His Arg Arg Val Pro Ser Glu Glu Thr Tyr Ser Leu Asp
1          5          10          15
Arg Phe Ala Gln Asn Pro Pro Leu Phe Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ala
          20          25          30
Ser Glu Ser Arg Met Ala His Ala Pro Leu Leu Gln Arg Cys Gly Ala
          35          40          45
Ala Arg Thr Gly Phe Cys Lys Lys Gln Gln Glu Leu Trp Gln Arg Arg
          50          55          60
Lys Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Thr Arg Lys Val Ser Val Leu Leu
65          70          75          80
Ala Thr Ser His Ser Gly Ala Arg Pro Ala Val Ser Thr Met Asp Ser
          85          90          95
Ser Ala Ala Pro Thr Asn Ala Ser Asn Cys Thr Asp Ala Leu Ala Tyr
          100          105          110
Ser Ser Cys Ser Pro Ala Pro Ser Pro Gly Ser Trp Val Asn Leu Ser
          115          120          125
His Leu Asp Gly Asn Leu Ser Asp Pro Cys Gly Pro Asn Arg Thr Asp
          130          135          140
Leu Gly Gly Arg Asp Ser Leu Cys Pro Pro Thr Gly Ser Pro Ser Met
145          150          155          160
Ile Thr Ala Ile Thr Ile Met Ala Leu Tyr Ser Ile Val Cys Val Val
          165          170          175
Gly Leu Phe Gly Asn Phe Leu Val Met Tyr Val Ile Val Arg Tyr Thr
          180          185          190
Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala
          195          200          205
Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Val Asn Tyr Leu
          210          215          220
Met Gly Thr Trp Pro Phe Gly Thr Ile Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser
225          230          235          240
Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Cys Thr Met
          245          250          255
Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp
          260          265          270
Phe Arg Thr Pro Arg Asn Ala Lys Ile Ile Asn Val Cys Asn Trp Ile
          275          280          285
Leu Ser Ser Ala Ile Gly Leu Pro Val Met Phe Met Ala Thr Thr Lys
          290          295          300
Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Asp Cys Thr Leu Thr Phe Ser His Pro Thr
305          310          315          320
Trp Tyr Trp Glu Asn Leu Leu Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe

```

```

          325          330          335
Ile Met Pro Val Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Ile Leu
          340          345          350
Arg Leu Lys Ser Val Arg Met Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg
          355          360          365
Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Ala Val Phe
          370          375          380
Ile Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile Tyr Val Ile Ile Lys Ala Leu
385          390          395          400
Val Thr Ile Pro Glu Thr Thr Phe Gln Thr Val Ser Trp His Phe Cys
          405          410          415
Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala
          420          425          430
Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Glu Phe Cys Ile Pro
          435          440          445
Thr Ser Ser Asn Ile Glu Gln Gln Asn Ser Thr Arg Ile Arg Gln Asn
          450          455          460
Thr Arg Asp His Pro Ser Thr Ala Asn Thr Val Asp Arg Thr Asn His
465          470          475          480
Gln Leu Glu Asn Leu Glu Ala Glu Thr Ala Pro Leu Pro
          485          490

```

<210> 32
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1

<400> 32
 Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5

<210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

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

<210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

<400> 34

Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

<400> 35

Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

<400> 36

Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1

<400> 37

Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5 10

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

<400> 38

Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1	5	10
---	---	----

<210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

<400> 39		
Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln		
1	5	10

<210> 40
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

<221> SITE
 <222> (13)...(13)
 <223> карбоксильований глутамін

<400> 40		
Cys Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln		
1	5	10

<210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1

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

<210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

<400> 42

Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

<400> 43

Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

<400> 44

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

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

<400> 45

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

<210> 46

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

<400> 46

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

<210> 47
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Антиген SNAP-25, на вільному карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P1 розрізаного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A

 <221> SITE
 <222> (13)...(13)
 <223> Карбоксильований лізин

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

 <210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Антиген SNAP-25

 <400> 48
 Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1 5 10

 <210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Антиген SNAP-25

 <400> 49
 Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1 5 10

 <210> 50
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

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

 <400> 50
 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 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> 51
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

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

```

<400> 51
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> 52
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Пептид Bir

```

<400> 52
Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
  1      5      10      15

```

<210> 53
 <211> 7570
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Конструкція із забезпеченням експресії pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC.

```

<400> 53
gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgcctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggctcgt gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180

```

ttagggtag	gogttttgog	ctgcttcgcc	tcgaggcctg	gccattgcat	acgttgatc	240
catatcataa	tatgtacatt	tatatggct	catgtccaac	attaccgcca	tggtgacatt	300
gattattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	ttacggggtc	attagttcat	agcccatata	360
tggagttccg	cgttacataa	cttacggtaa	atggcccgcc	tggctgaccg	cccaacgacc	420
ccgcccatt	gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	aacgcccaata	gggactttcc	480
attgacgtca	atgggtggag	tatttacggg	aaactgccc	cttggcagta	catcaagtgt	540
atcatatgcc	aagtacgccc	cctattgacg	tcaatgacgg	taaatggccc	gctggcatt	600
atgccagta	catgacctta	tgggactttc	ctacttggca	gtacatctac	gtattagtca	660
tcgctattac	catgggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	720
actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	780
aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgta	acaactccgc	ccattgacg	caaatgggog	840
gtaggcgtgt	acggtgggag	gtctatataa	gcagagctcg	tttagtgaac	cgtcagatcg	900
cctggagacg	ccatccacgc	tgttttgacc	tccatagaag	acaccgggac	cgatccagcc	960
tccgcggggc	accatggagg	gcccgggttac	cggtaccgga	tccagatata	tgggcggccg	1020
ctcagcaagc	ttcgcaatt	cgggaggcgg	aggtggagct	agcaaaggag	aagaactctt	1080
cactggatgac	gtcccaattc	ttggtgaatt	agatgggtgat	gttaacggcc	acaagttctc	1140
tgtagtgga	gaggggtgaag	gtgatgcaac	atacggaaaa	cttaccctga	agttcatctg	1200
cactactggc	aaactgcctg	ttccatggcc	aacactagtc	actactctgt	gctatggtgt	1260
tcaatgcttt	tcaagatacc	cggatcatat	gaaacggcat	gactttttca	agagtgccat	1320
gcccgaaggt	tatgtacagg	aaaggaccat	cttcttcaaa	gatgacggca	actacaagac	1380
acgtgctgaa	gtcaagtttg	aaggtgatac	ccttggttaat	agaatcgagt	taaaagggtat	1440
tgacttcaag	gaagatggca	acattctggg	acacaaattg	gaatacaact	ataactcaca	1500
caatgtatgac	atcatggcag	acaacaaaa	gaatggaatc	aaagtgaact	tcaagaccog	1560
ccacaacatt	gaagatggaa	gcgttcaact	agcagaccat	tatcaacaaa	atactccaat	1620
tggcgatggc	cctgtccttt	taccagacaa	ccattacctg	tccacacaa	ctgccctttc	1680
gaaagatccc	aacgaaaaga	gagaccacat	ggctccttctt	gagtttgtaa	cagctgctgg	1740
gattacacat	ggcatggatg	aactgtacaa	catcgatgga	ggcggagggtg	gaccttttgt	1800
taataaaca	tttaattata	aagatcctgt	aaatgggtgtt	gatattgctt	atataaaaat	1860
tccaaatgca	ggacaaatgc	aaccagtaaa	agctttttaa	attcataata	aaatatgggt	1920
tattccagaa	agagatacat	ttacaaatcc	tgaagaagga	gattttaa	caccaccaga	1980
agcaaaacaa	gttccagttt	catattatga	ttcaacatat	ttaagtacag	ataatgaaa	2040
agataattat	ttaaaggag	ttacaaaatt	atgtgagaga	atttattcaa	ctgatccttg	2100
aagaatgttg	ttaacatcaa	tagtaagggg	aataccattt	tgggggtgga	gtacaataga	2160
tacagaatta	aaagttattg	atactaattg	tattaatgtg	atacaaccag	atggtagtta	2220
tagatcagaa	gaacttaatc	tagtaataat	aggaccctca	gctgatatta	tacagtttga	2280
atgtaaaagc	tttgacatg	aagttttgaa	tcttacgcga	aatggttatg	gctctactca	2340
atacattaga	tttagcccag	attttacatt	tggttttgag	gagtcacttg	aagttgatac	2400
aatcctctt	ttaggtgcag	gcaaatttgc	tacagatcca	gcagtaacat	tagcacatga	2460
acttatcat	gctggacata	gatttatg	aatagcaatt	aatccaaata	gggtttttta	2520
agtaaatact	aatgcctatt	atgaaatgag	tgggttagaa	gtaagctttg	aggaacttag	2580
aacatttggg	ggacatgatg	caaagtttat	agatagttta	caggaaaacg	aatttcgtct	2640
atattattat	aataagttta	aagatatagc	aagtacactt	aataaagcta	aatcaatagt	2700
aggtactact	gcttcattac	agtatatgaa	aatgtttttt	aaagagaaat	atctcctatc	2760
tgaagataca	tctggaaaat	tttcggtaga	taaattaaaa	tttgataagt	tatacaaaat	2820
gttaacagag	atttacacag	aggataattt	tgtaagttt	tttaaagtac	ttaacagaaa	2880
aacataattg	aattttgata	aagccgtatt	taagataaat	atagtaccta	aggtaaatta	2940
cacaatatat	gatggattta	atttaagaaa	tacaaattta	gcagcaaact	ttaatgggtca	3000
aaatacagaa	attaataata	tgaattttac	taaactaaaa	aattttactg	gattggttga	3060
attttataag	ttgctatgtg	taagagggat	aatcacttcg	aatgaacgc	gttggcccta	3120
ttctatagtg	tcacctaaat	gctagagctc	gctgatcagc	ctcgactgtg	ccttctagtt	3180
gccagccatc	tggtgtttgc	ccctccccc	tgccttcctt	gaccctggaa	ggtgccactc	3240
ccactgtcct	ttcctaataa	aatgaggaaa	ttgcatcgca	ttgtctgagt	aggtgtcatt	3300
ctattctggg	gggtgggggtg	gggcaggaca	gcaaggggga	ggattgggaa	gacaatagca	3360
ggcatgctgg	ggatgcggtg	ggctctatgg	cttctgaggc	ggaaagaacc	agctggggct	3420
ctagggggta	tccccacgcy	ccctgtagcg	gcgcattaag	cgcggggggt	gtgggtggtta	3480
cgcgagcgt	gaccgctaca	cttgccagcg	ccctagcgcc	cgctcctttc	gctttcttcc	3540
cttctttct	cgccacgttc	gcccgttttc	cccgtaagc	tctaaatcgg	ggcatccctt	3600
tagggttccg	atthagtgct	ttacggcacc	tcgaccccaa	aaaacttgat	taggggtgatg	3660
gttcacgtag	tgggccatcg	ccctgataga	cggtttttcg	ccctttgacg	ttggagtcca	3720

cgttctttaa	tagtggactc	ttgttccaaa	ctggaacaac	actcaaccct	atctcgggtct	3780
attcttttga	tttataaggg	atthttgggga	tttcggccta	ttggttaaaa	aatgagctga	3840
tttaacaaaa	atttaacgcg	aattaattct	gtggaatgtg	tgtcagttag	ggtgtggaaa	3900
gtccccaggc	tccccaggca	ggcagaagta	tgcaaaagcat	gcatctcaat	tagtcagcaa	3960
ccaggtgtgg	aaagtcccca	ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	4020
attagtcagc	aaccatagtc	cggccccctaa	ctccgcccct	cccggccccta	actccgccc	4080
gttcgcccc	ttctccgccc	catggctgac	taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	4140
ccgcctctgc	ctctgagcta	ttccagaagt	agtgaaggagg	cttttttgga	ggcctaggct	4200
tttgcaaaaa	gctcccgga	gottgtatat	ccattttcgg	atctgatcaa	gagacaggat	4260
gaggatcggt	tcgcatgatt	gaacaagatg	gattgcacgc	aggttctccg	gccgcttggg	4320
tggagaggct	attcggctat	gactgggcac	aacagacaat	cggctgctct	gatgccgcg	4380
tggtccggct	gtcagcgag	ggcgccccgg	ttctttttgt	caagaccgac	ctgtccgggtg	4440
ccctgaatga	actgcaggac	gaggcagcgc	ggctatcgtg	gctggccacg	acgggcggttc	4500
cttgcgagc	tgtgctcgac	gttgtcactg	aagcgggaag	ggactggctg	ctattggggc	4560
aagtgcggg	gcagatctc	ctgtcatctc	accttgctcc	tgccgagaaa	gtatccatcg	4620
tggctgatgc	aatgcggcgg	ctgcatacgc	ttgatccggc	tacctgccc	ttcgaccacc	4680
aagcgaaca	tcgcatcgag	cgagcacgta	ctcggatgga	agccggtctt	gtcgatcagg	4740
atgatctgga	cgaagagcat	caggggctcg	cgccagccga	actgttcgcc	aggctcaagg	4800
cgcgcatgcc	cgacggcgag	gatctcgtcg	tgacccatgg	cgatgcctgc	ttgccgaata	4860
tcattggtgga	aaatggccgc	ttttctggat	tcactgactg	tggccgggctg	ggtgtggcgg	4920
accgctatca	ggacatagcg	ttggctaccc	gtgatattgc	tgaagagctt	ggcggcggaat	4980
gggctgacgg	cttctcgtg	ctttacggtg	tcgcccgtcc	cgattcgag	cgcatcgctt	5040
tctatcgctt	ctttgacgag	ttcttctgag	cgggactctg	gggttcgaaa	tgaccgacca	5100
agcgacggcc	aacctgccat	cacgagattt	cgattccacc	gccgccttct	atgaaagggtt	5160
gggcttcgga	atcgttttcc	gggacgcggg	ctggatgata	ctccagcgcg	gggatctcat	5220
gctggagttc	ttcgcccacc	ccaacttggt	tattgcagct	tataatgggt	acaaataaag	5280
caatagcatc	acaaatttca	caaataaagc	atthtttttca	ctgcattcta	gttgtgggtt	5340
gtccaaactc	atcaatgtat	cttatcatgt	ctgtataccg	tcgacctcta	gctagagctt	5400
ggcgtaata	tggtcatagc	tgtttccgtg	gtgaaattgt	tatccgctca	caattccaca	5460
caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	agcctggggg	gcctaataag	tgagctaact	5520
cacattaatt	gcgttgcgct	cactgccgc	tttccagtcg	ggaaacctgt	cgtgccagct	5580
gcattaatga	atcgcccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	cgtattgggc	gctcttccgc	5640
ttctctcgctc	actgactcgc	tgcgctcggg	cgttcggctg	cggcgagcgg	tatcagctca	5700
ctcaaaggcg	gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	agaacatgtg	5760
agcaaaaagg	cagcaaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	cgtttttcca	5820
taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacaa	aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	5880
cccgacagga	ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	5940
tggtccgacc	ctgccgctta	cgggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	6000
gctttctcaa	tgctcacgct	gtaggtatct	cagttcggtg	taggtcggtc	gctccaagct	6060
gggctgtgtg	cacgaacccc	cogttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	6120
tcttgagtc	aacccggtaa	gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	6180
gattagcaga	gcgaggtatg	taggcgggtg	tacagagttc	ttgaagtggg	ggcctaacta	6240
cggctacact	agaaggacag	tatttggtat	ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	6300
aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	gctggtagcg	gtgggttttt	6360
tggttgcaag	cagcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	6420
ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaacga	aaactcacgt	taagggattt	tggtcatgag	6480
attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	tttaaattaa	aaatgaagtt	ttaaatcaat	6540
ctaaagtata	tatgagtaaa	cttgggtctga	cagttaccaa	tgcttaatca	gtgaggcacc	6600
tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcatc	catagttgcc	tgactccccg	tcgtgtagat	6660
aactacgata	cgggagggct	taccatctgg	ccccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	6720
acgctcaccg	gctccagatt	tatcagcaat	aaaccagcca	gccggaaggg	ccgagcgag	6780
aagtggctct	gcaactttat	cgcctccat	ccagtctatt	aattggtgcc	gggaagctag	6840
agtaagttagt	tcgccagtta	atagtttgcg	caacgttggt	gccattgcta	caggcatcgt	6900
gggtgcacgc	tcgtcgtttg	gtatggcttc	attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	6960
agttacatga	tcccccatgt	tgtgcaaaaa	agcggttagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	7020
tgtcagaagt	aagttggccg	cagtggtatc	actcatggtt	atggcagcac	tgcataattc	7080
tcttactgtc	atgccatccg	taagatgctt	ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	7140
attctgagaa	tagtgtatgc	ggcgaccgag	ttgctcttgc	ccggcgtaaa	tacgggataa	7200
taccgcgcca	catagcagaa	ctttaaaagt	gctcatcatt	ggaaaacggt	cttcggggcg	7260

```

aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca ctggtgcacc 7320
caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct ggggtgagcaa aaacaggaag 7380
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7440
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcattgagcg gatacatatt 7500
tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttccc gaaaagtgcc 7560
acctgacgtc                                     7570

```

<210> 54

<211> 682

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність амінокислот легкого ланцюга GFP-BoNT/A.

<400> 54

```

Ala Ser Lys Gly Glu 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	Le	

<210> 55

<211> 6259

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

 $\langle 220 \rangle$

<223> Конструкція із забезпеченням експресії pQBI-25/GFP.

<400> 55

gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtatgctg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcata aagaatctgc 180


```

ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgtatc 240
catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata 360
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggtgaccg cccaacgacc 420
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 660
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 720
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 780
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg 840
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900
cctggagacg ccattccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc 960
tccgcgggcg accatggagg gcccggttac aggtaccgga tccagatatac tggcgggccg 1020
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatggtgat gttaacggcc acaagttctc 1140
tgtcagtga gaggtgaag gtgatgaac atacggaaaa cttaccctga agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gactttttca agagtgccat 1320
gccgaaggt tatgtacagg aaaggaccat cttcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380
acgtgctga gtcaagtttg aaggtgatac ccttgttaat agaactcagt taaaagggtat 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagaccgc 1560
ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620
tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaat ctgccctttc 1680
gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagtttgtaa cagctgctgg 1740
gattacacat ggcattgatg aactgtacaa catcgatgga ggcggagggt gatgaacgcg 1800
ttggccctat tctatagtgt cacctaaatg ctgagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc 1860
cttctagtgt ccagccatct gttgtttgcc cctccccgt gccttcttg accctggaag 1920
gtgccaactc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcctcgcat tgtctgagta 1980
ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caagggggag gattgggaaag 2040
acaatagcag gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca 2100
gctggggctc taggggtat cccacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcggtg 2160
tgggtgttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcggcc gctcctttcg 2220
ctttcttccc ttctttctc gccacgttcg cgggctttcc cgtcaagct ctaaatcggg 2280
gcatcccttt aggttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt 2340
aggtgatgg ttacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttacgt 2400
tggatccac gttctttaat agtggactct gtttccaaac tggacaaca ctaacccta 2460
tctcgtctta ttcttttgat ttataaggga ttttggggat ttcggcctat tgggtaaaaa 2520
atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attaatcttg tggaatgtgt gtcagttagg 2580
gtgtgaaaag tccccaggct ccccaggcag gcagaagtat gcaaagcat catctcaatt 2640
agtcagcaac cagggtgga aagtcccaag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 2700
tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgccttaac tccgcccat cgcgcccta 2760
ctccgccag ttccgccat tctccgccc atggctgact aattttttt atttatgcag 2820
aggccgaggc cgctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag 2880
gcctaggctt ttgcaaaaag ctccgggag cttgtatatc cattttcgga tctgatcaag 2940
agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccg 3000
ccgcttgggt ggagaggcta ttccgctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3060
atgcccgct gttccgctg tcagcgcagg ggcgcccgt tctttttgtc aagaccgacc 3120
tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3180
cggcggttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3240
tattggcgca agtgcgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgcctc gccagaaaag 3300
tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgt tgatccggt acctgccc 3360
tcgaccacca agcgaacat cgcactcagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 3420
tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3480
ggctcaaggc gcgcagccc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct 3540
tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggcgggctgg 3600
gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgc tgatattgct gaagagcttg 3660
gcggcgaatg ggctgaccgc ttctctgtgc tttacggtat cgcgctccc gattcgcagc 3720

```

```

gcatcgccctt ctatcgccctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 3780
gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 3840
tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg ggaogccggc tggatgatcc tccagcgcg 3900
ggatctcatg ctggagttct tcgcccaccc caacttgttt attgcagctt ataatggtta 3960
caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag 4020
ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt cgacctctag 4080
ctagagcttg gcgtaatcat ggcatagct gtttcctgtg tgaaattggt atccgctcac 4140
aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaagtagt 4200
gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc 4260
gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg 4320
ctcttcgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt 4380
atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 4440
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 4500
gtttttccat aggtcgcgc cccctgacga gcatcaca aaatcgacgt caagtacag 4560
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gtcctcctgt 4620
gcgctctcct gttccgacct tgcgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg 4680
aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg 4740
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg 4800
taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 4860
tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt 4920
gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt 4980
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg 5040
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggtatctc aagaagatcc 5100
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca ctggaacgaa aactcacgtt aagggatttt 5160
ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt 5220
taaatacaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 5280
tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct gactccccgt 5340
cgtgtagata actacgatac gggagggtct accatctggc cccagtgcgt caatgatacc 5400
gcgagaccca cgctcacccg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 5460
cgagcgcaga agtggctcct caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg 5520
ggaagctaga gtaagtatt ccgagtttaa tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac 5580
aggcatcggt gtgtcacgct cgtcggtttg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 5640
atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtc 5700
tccgatcggt gtcagaagta agttggccgc agtggttatc ctcatggtta tggcagcact 5760
gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 5820
aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtaaat 5880
acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacggtc 5940
ttcggggcga aaactctcaa ggtcttacc tctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 6000
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 6060
aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcgc acacggaat gttgaatact 6120
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 6180
atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 6240
aaaagtgcc cctgacgtc

```

<210> 56

<211> 245

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність амінокислот GFP.

<400> 56

```

Ala Ser Lys Gly Glu 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> 57
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Гнучкий спейсер G-спейсер

<400> 57
 Gly Gly Gly Gly
 1

<210> 58
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Гнучкий спейсер G-спейсер

<400> 58
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 59
 <211> 4
 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Гнучкий спейсер А-спейсер

<400> 59

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Гнучкий спейсер А-спейсер

<400> 60

Ala Ala Ala Ala Val

1

5

<210> 61

<211> 3359

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 61

```

gtcgaagggtgc tcatagtgga gccctggctc cggggcggac ggagccgcac ggtagtagat 60
gggggtgtgg ccgtggcccc cgactctgct cggcggggcc gttcctgctt tgccatccgt 120
gtgggacttc cacgacagtg gaggcacgag agctggggcc catatgctgc ttgccagct 180
tgggaaagag gaggtgctg caaaggaccg atcggcggct tcgggctgcc ggctcactcg 240
gctgctgctg ctggtctggc gtctgctgag aagatcctct tctaccctgc tctgcacctg 300
tgctcgactg ccagccggct gagggcgggg gtctccacgg tggteccagc tcccaaggag 360
gttgcaagaag taccgtacag agtggatttg cagggcagtg gcatggagcc cctcttcccc 420
gcgcggttct gggagggttat ctacggcagc caccttcagg gcaacctgtc cctcctgagc 480
cccaaccaca gtctgctgcc cccgcactct ctgctcaatg ccagccacgg cgccttccctg 540
cccctcgggc tcaaggtcac catcgtgggg ctctacctgg ccgtgtgtgt cggaggggctc 600
ctggggaact gccttgtcat gtacgtcacc ctcaggcaca ccaaaatgaa gacagccacc 660
aatatttaca tctttaacct ggccctggcc gacactctgg tcctgctgac gctgcccttc 720
cagggcacgg acatcctcct gggcttctgg ccgtttggga atgcgctgtg caagacagtc 780
attgccattg actactacaa catgttcacc agcaccttca ccctaactgc catgagtgtg 840
gatcgctatg tagccatctg ccaccccatc cgtgccctcg acgtccgcac gtccagcaaa 900
gccaggctg tcaatgtggc catctgggcc ctggcctctg ttgtcggtgt tcccggtgcc 960
atcatgggct cggcacaggc cgaggatgaa gagatcgagt gcctgggtga gatccctacc 1020
cctcaggatt actggggccc ggtgtttgcc atctgcatct tcctcttctc cttcatcgct 1080
cccgtgctcg tcatctctgt ctgctacagc ctcatgatcc ggcggtccg tggagtcgcg 1140
ctgctctcgg gctcccagaga gaaggaccgg aacctgcggc gcatcactcg gctgggtgctg 1200
gtggtagtgg ctgtgttcgt gggctgctgg acgcctgtcc aggtcttcgt gctggcccaa 1260
gggctggggg ttacgcccag cagcagagct gccgtggcca ttctgcgctt ctgcacggcc 1320
ctgggctacg tcaacagctg cctcaacccc atcctctacg ccttcctgga tgagaacttc 1380
aaggcctgct tccgcaagtt ctgctgtgca tctgccctgc gccgggacgt gcagggtgtct 1440
gaccgcgtgc gcagcattgc caaggacgtg gccctggcct gcaagacctc tgagacggta 1500
ccgcggcccc catgactagg cgtggacctg cccatgggtg ctgtcagccc gcagagccca 1560
tctacgcccc acacagagct cacacaggtc actgctctct aggcggacac accctgggcc 1620
ctgagcatcc agagcctggg atgggctttt cctgtggggc cagggatgct cgggtcccaga 1680
ggaggacctg gtgacatcat gggacaggtc aaagcattag ggccacctcc atggccccag 1740
acagactaaa gctgccctcc tgggtgcaggg ccgaggggac acaaggacct acctggaagc 1800

```

```

agctgacatg ctggtggacg gccgtgactg gagccccgtgc ccctccctcc ccgtgcttca 1860
tgtgactctt ggcctctctg ctgctgcgtt ggcagaaccc tgggtgggca ggcacccgga 1920
ggaggagcag cagctgtgtc atcctgtgcc ccccatgtgc tgtgtgctgt ttgcatggca 1980
gggctccagc tgccttcagc cctgtgacgt ctccctcaggg cagctggaca ggcttggcac 2040
tgcccgggaa gtgcagcagg cagcttttct ttgggtggg acttgccctg agcttggagc 2100
tgccacctgg aggacttgcc tgttccgact ccacctgtgc agccggggcc accccaggag 2160
aaagtgtcca ggtgggggct ggcagtcctt ggctgcagac cccgagctgg ccctgggcca 2220
gccgcacctc tgaaggtttt ctgtgtgctg cacgggtgcag gcctcatccc tgactgcagc 2280
ttgactctgg gcccaacccc catttccctt caggagacca gcgagaggcc ctggccatt 2340
ccctccagcg gtgcaatgaa ctatcatgct gtggaccgtc aaccagccc tgcttctcag 2400
tgtggggcag gtgtctcagg acgaaggcgc cgcgtgacca catgggcagc tctgttcaca 2460
aagtggaggc ctcgttttcc tgggtcttgac tgctctgttt ggggtgggaga agattctctg 2520
ggggtcccca catcctccca aggtccctt cacagcctct cctttgcttg aagccagagg 2580
tcagtggcgc tctgtgttg cgggggaagc tgtgtggaag gagaagctgg tggccacagc 2640
agagtctcgc tctggggacg cctgcttcat ttacaagcct caagatggct ctgtgtaggg 2700
cctgagcttg ctgccccacg ggaggatggc ttcacagcag agccagcatg aggggtgggg 2760
cctggcaggg cttgcttgag ccaaactgca aaggctgtgg tggtgtgag gacactgagg 2820
gggttggggg gggggcgtct gtacctcagg ggatgccccg ctgtggtcac ccagagaatc 2880
acccttctcg gtctacagat ggaagctgca ggttggtgac tttgcaaag cacttccctac 2940
agatgaacta ttaaaagacc tgcaacattg aaaaaactca tttttccac caaaaccttg 3000
gccaggtaac ctaccttagg cacctgcaaa gaacagggaag tgatggctgt ctcgcaacag 3060
agcctgggct gctcctcctg ctctggggag tctaggccgt ggggactgtt ctggggaggc 3120
tcatgctgtc tccatgacgt ctgtggcagg agtccctgag gacgggagct gcctagctac 3180
agttttcttg ccaaggcagc gtgttttctg aatctgtgct gatgtaatgt gcaccttcac 3240
gtatttatgc atgtggcaag cgttacttcc tgtgcacgta gccagccctg ggtctgtctc 3300
tggggtaatg aaaaaggacc ctaataaaca cctgctcact ggctgggtat tcttcgtaa 3359

```

<210> 62

<211> 1134

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 62

```

ttgcagggca gtggcatgga gcccctcttc cccgcgccgt tctgggaggt tatctacggc 60
agccaccttc agggcaacct gtccctcctg agccccaacc acagtctgct gccccgcgat 120
ctgctgtctc atgccagcca cggcgccctc ctgcccctcg ggctcaaggc caccatcgtg 180
gggctctacc tggcctgtgt tgtcggaggg ctccctgggga actgccttgt catgcacacc 240
aaaatgaaga cagccaccaa tatttacatc tttaacctgg ccctggccga cactctggtc 300
ctgctgacgc tgccttcca gggcacggac atcctcctgg gcttctggcc gtttgggaat 360
gcgctgtgca agacagtcac tgccattgac tactacaaca tgttcaccag caccttcacc 420
ctaactgcca tgagtgtgga tcgctatgta gccatctgcc accccatccg tgccctcgac 480
gtccgcacgt ccagcaaagc ccaggctgtc aatgtggcca tctgggccct ggctctgtt 540
gtcgggtgtc ccgttgccat catgggctcg gcacaggctg aggatgaaga gatcgagtgc 600
ctgggtggaga tccctacccc tcaggattac tggggcccgg tgtttgccat ctgcatcttc 660
ctcttctcct tcctcgtccc cgtgctcgtc atctctgtct gctacagcct catgatccgg 720
cggctccgtg gagtccgctt gctctcgggc tcccgagaga aggaccgga cctgcggcgc 780
atcactcggc tgggtcgtgt ggtagtggct gtgttcgtgg gctgctggac gcctgtccag 840
gtcttctgtc tggcccaagg gctgggggtt cagccgagca gcgagactgc cgtggccatt 900
ctgcgcttct gcacggccct gggctacgtc aacagctgcc tcaaccccat cctctacgcc 960
ttcctggatg agaacttcaa ggcctgcttc cgcaagttct gctgtgcatc tgccctgcgc 1020
cgggacgtgc aggtgtctga ccgcgtgcgc agcattgcca aggacgtggc cctggcctgc 1080
aagacctctg agacggtacc gcgcccgca tgactaggcg tggacctgcc catg 1134

```

<210> 63

<211> 1774

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 63

```

ccgaggagcc tgcggctgct cctggctcac agcgtccgg gcgaggagag cgggaggagc 60
ccgggggctg ggccgggtgcg ggccggcagg caggcggagc aggcgcagag acagcggggc 120
ggccggggcg cggcagcccg cggcgtcggg gcccggcct ctgccttgc gctccctcg 180
cgtcggatcc ccgcgcccag ggccgacggt ggagaggagc gcggcggagc cggccggcag 240
ccatggaacc ggccccctcc gccggcgccg agctgcagcc cccgctcttc gccaacgcct 300
cggacgccta ccctagcgcc tgcggcagcg ctggcgccaa tgcgtcgggg ccggcaggcg 360
cgcggagcgc ctgcctccct gccctggcaa tcgccatcac cgcgtctac tcggccgtgt 420
gcgcgtggg gctgctgggc aacgtgcttg tcatgttcgg catcgtccgg taaactaaga 480
tgaagacggc caccaacatc tacatcttca acctggcctt agccgatgcg ctggccacca 540
gcacgctgcc tttccagagt gccaaagtacc tgatggagac gtggcccttc ggcgagctgc 600
totgcaaggc tgtgtctctc atcgactact acaatatgtt caccagcatc ttcacgctca 660
ccatgatgag tgttgaccgc tacatcgctg tctgccaccc tgtcaaggcc ctggacttcc 720
gcacgcctgc caaggccaag ctgatcaaca tctgtatctg ggtcctggcc tcaggcggtg 780
gcgtgcccc catggtcatg gctgtgaccc gtccccggga cggggcagtg gtgtgcatgc 840
tccagttccc cagccccagc tggactggg acacggtgac caagatctgc gtgttctct 900
tcgccttcgt ggtgcccatc ctcatcatca ccgtgtgcta tggcctcatg ctgctgcgcc 960
tgcgcagtgt gcgcctgctg tcgggctcca aggagaagga ccgcagcctg cggcgcatca 1020
cgcgcagtgt gctggtggtt gtgggcgcct tcgtggtgtg ttgggcgccc atccacatct 1080
tcgtcatcgt ctggacgctg gtggacatcg accggcgga cccgctggtg gtggctgcgc 1140
tgcacctgtg catcgcgctg ggctacgcca atagcagcct caaccccggt ctctacgctt 1200
tcctcgacga gaacttcaag cgtgcttcc gccagctctg ccgcaagccc tgcggccgcc 1260
cagaccccag cagcttcagc cgcggccgcg aagccacggc ccgcgagcgt gtcaccgcct 1320
gcaccccgtc cgtggtccc ggcggtggcg ctggcgctg accaggccat ccggccccc 1380
gagcggccct ccctagtgc ccggaggcca catgagtcct agtgggaggc gcgagccatg 1440
atgtggagtg gggcagtaga aggtcggagg cttgggaccg ccagatgggg cctctgttcc 1500
ggagacggga ccgggcccgt agatgggcat ggggtgggcc tctggtttgg ggcgaggcag 1560
aggacagatc aatggcgagc tgcctctggt ctgggtgccc cgtccacggc tctaggtggg 1620
gcgggaaagc cagtgcctcc aggagaggag cgggacctgt ggctctacaa ctgagtcctt 1680
aaacagggca tctccaggaa ggcggggctt caaccttgag acagcttcgg tttctaactt 1740
ggagccggac tttcggagtt gggggtccgg gcc 1774

```

<210> 64

<211> 1773

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 64

```

ccgaggagcc tgcgctgctc ctggctcaca gcgtccggg ccgaggagagc gggcggaccg 60
ggggggctgg ccggtgcggg cggcagggca ggccgagag gcgcagagac agcggggcgg 120
ccggggcgcg gcacgcggcg ggtcggggcc ggctctgcc ttgcgctcc cctcgcgtcg 180
gatccccgcg cccaggcagc cggtgagag ggacgcggcg gacgccgga gccatggaac 240
cggccccctc cgcggcgcc gagctgcagc cccgctctt cccaacgcc tcggacgcct 300
accctagcgc cttcccagc gctggcgcca atgcgtcgg gccgccaggc gcgcggagcg 360
cctcgtccct cgcctggca atcgccatca ccgcgtcta ctgcgctg tgcgcgtg 420
ggctgctggg caacgtgctt gtcattgtcg gcatcgtcc gtactaag atgaagacgg 480
ccaccaacat ctacatcttc aacctggcct tagccgatg gctggccacc agcagctgc 540
ctttccagag tgccaagtac ctgatggaga cgtggccctt cggcgagctg ctctgcaagg 600
ctgtgctctc catcgactac tacaatatgt tcaccagcat cttcacgct accatgatga 660
gtgttgaccg ctacatcgct gtctgccacc ctgtcaagg cctggacttc cgcacgcctg 720
ccaaggccaa gctgatcaac atctgtatct gggctcctgg ctcaggcggt ggcgtgcca 780
tcattggtcat ggctgtgacc cgtccccggg acggggcagt ggtgtgcatg ctccagttcc 840
ccagccccag ctggtactgg gacacgggta ccaagatctg cgtgttctc ttcgcttcg 900
tgggtgccc atctcatc accgtgtgct atggcctcat gctgctgcgc ctgcgagtg 960
tgcgctgct gtcgggctcc aaggagaagg accgcagct gcggcgcatc acgcgcatgg 1020
tgctggtggt tgtggcgcc tctgtggtgt gttggcgcc catccacatc ttcgtcatcg 1080
tctggacgct ggtggacatc gaccggcgcg acccgtggt ggtggctgcg ctgcacctgt 1140
gcacgcgct gggctacgcc aatagcagcc tcaacccgt gctctacgt tctcgcagc 1200
agaacttcaa gcgtgcttc cgcagctct gccgaagcc ctgcggcgcc ccagaccca 1260
gcagcttcag ccgcgcccgc gaagccacgg cccgcgagcg tgccaccgcc tgcaccccg 1320

```

```

ccgatgggtcc cggcgggtggc gctgcccgcct gaccaggcca tccggccccc agacgcccct 1380
ccctagtgtgt acccgggagc cacatgagtc ccagtgggag gcgcgagcca tgatgtggag 1440
tggggccagt agataggtcg gagggctttg ggaccgccag atggggcctc tgtttcggag 1500
acgggaccgg gccgctagat gggcatgggg tgggcctctg gtttggggcg aggcagagga 1560
cagatcaatg gcgcagtgcc tctgggtctg gtgccccgt ccacggctct aggtggggcg 1620
ggaaagccag tgactccaag agaggagcgg gacctgtggc tctacaactg agtccttaa 1680
cagggcatct ccaggaaggc ggggcttcaa ccttgagaca gcttcgggtt ctaacttgga 1740
gccggacttt cggagttggg gggtcggggg ccc

```

<210> 65

<211> 1154

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 65

```

atggactccc cgatccagat cttccgcggg gagccggggc ctacctgcgc cccgagcgcc 60
tgcctgcccc ccaacagcag cgcctggttt cccggctggg ccgagcccga cagcaacggc 120
agcgccggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc catcccggtc 180
atcatcacgg cggctctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tgggtgggcaa ctcgctggtc 240
atgttcgtga tcatccgata cacaaagatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300
ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac ggtctacttg 360
atgaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480
tgccaccccg tgaaggcttt ggacttccgc acaccttga aggcaaagat catcaatc 540
tgcatctggc tgctgtcgtc atctgttggc atctctgcaa tagtccttgg aggcaccaa 600
gtcaggggaa acgtcgatgt cattgagtgc tccttgcagt tcccagatga tgactactcc 660
tgggtgggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcacttttg ccttcgtgat ccctgtcctc 720
atcatcatcg tctgctacac cctgatgatc ctgcgtctca agagcgtccg gctcctttct 780
ggctcccag agaaagatcg caacctgcgt aggatcacca gactggtcct ggtggtggg 840
gcagtcttcg tcgtctgctg gactccatt cacatattca tcctggtgga ggctctggg 900
agcacctccc acagcacagc tgctctctcc agctattact tctgcatcgc cttaggctat 960
accaacagta gctgaatcc cattctctac gcctttcttg atgaaaactt caagcgggtg 1020
ttccgggact tctgctttcc actgaagatg aggatggagc ggcagagcac tagcagagtc 1080
cgaaatacag ttcaggatcc tgcttacctg agggacatcg atgggatgaa taaaccagta 1140
tgactagtcg tgga

```

<210> 66

<211> 1143

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 66

```

atggaatccc cgattcagat cttccgcggg gagccggggc ctacctgcgc cccgagcgcc 60
tgcctgcccc ccaacagcag cgcctggttt cccggctggg ccgagcccga cagcaacggc 120
agcgccggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc catcccggtc 180
atcatcacgg cggctctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tgggtgggcaa ctcgctggtc 240
atgttcgtga tcatccgata cacaaagatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300
ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac ggtctacttg 360
atgaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480
tgccaccccg tgaaggcttt ggacttccgc acaccttga aggcaaagat catcaatc 540
tgcatctggc tgctgtcgtc atctgttggc atctctgcaa tagtccttgg aggcaccaa 600
gtcaggggaa acgtcgatgt cattgagtgc tccttgcagt tcccagatga tgactactcc 660
tgggtgggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcacttttg ccttcgtgat ccctgtcctc 720
atcatcatcg tctgctacac cctgatgatc ctgcgtctca agagcgtccg gctcctttct 780
ggctcccag agaaagatcg caacctgcgt aggatcacca gactggtcct ggtggtggg 840
gcagtcttcg tcgtctgctg gactccatt cacatattca tcctggtgga ggctctggg 900
agcacctccc acagcacagc tgctctctcc agctattact tctgcatcgc cttaggctat 960
accaacagta gctgaatcc cattctctac gcctttcttg atgaaaactt caagcgggtg 1020

```



```

ttccgggact tctgctttcc actgaagatg aggatggagc ggcagagcac tagcagagtc 1080
cgaaatacag ttcaggatcc tgcttacctg agggacatcg atgggatgaa taaaccagta 1140
tga 1143

```

<210> 67

<211> 2738

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 67

```

cctgtaaaga aaatgatgag ggctaaatcc atcagcacca aagctgggaa gccctccagg 60
ttcatttga agaaaatact cctctgagct caaaggaagt gtgatctgtc acaatattgt 120
atgcctgcac taagtttgca tcctgaaaac tcaactggaag ataggaaagc aagcatgaaa 180
aagcagccgg gtcagacagg cttctggatt cagtgtgtgg acatgacttt gcctgcatga 240
attgccctt tctcctacaa acaagagaat tcgggtcaagt ggatgtggca gaactgggct 300
gctctgagat gatagaaaag ggctcctgct tttcctgtaa ttgcagcccc ttgttcttgt 360
ggttgttaca tgcaataaat gtaattctat gagaaggacc agcccttaca toccatcaaa 420
atgtttcctg gaaacctgga gcacagaact ctgatatcct ctacactgt ggcaggagaa 480
gcagcacaa gcaaatgct gaaatagcat ggtccaggat gtgtttgcac agaagagtgc 540
ccagtgaaga gacctaactc ttggatcgtc ttgcgcaaaa tccaccctt tccctcctc 600
cctcccttc agcctccgaa tcccgcatgg ccacgctcc cctcctgcag cgggtgcgggg 660
cagccaaggac tggtttctgt aagaaacagc aggagctgtg gcagcggcga aaggaagcgg 720
ctgaggcgtc tggaaccoga aaagtctcgg tgctcctggc tacctgcac agcgggtgcc 780
gcccggcgtc cagtaccatg gacagcagcg ctgccccac gaacgccagc aattgcactg 840
atgccttggc gtactcaagt tgctcccag caccagccc cggttcctgg gtcaacttgt 900
cccacttaga tggcaacctg tccgacctat gcggtccgaa cgcaccgac ctgggcggga 960
gagacagcct gtgccctccg accggcagtc cctccatgat cacggccatc acgatcatgg 1020
cctctactc catcgtgtgc gtggtggggc tottcggaaa cttcctggtc atgtatgtga 1080
ttgtcagata caccaagatg aagactgcc ccaacatcta cattttcaac cttgctctgg 1140
cagatgcctt agccaccagt accctgccct tccagagtgt gaattaccta atgggaacat 1200
ggccatttgg aaccatcctt tgcaagatag tgatctccat agattactat aacatgttca 1260
ccagcatatt caccctctgc accatgagtg ttgatcgata cattgcagtc tgccaccctg 1320
tcaaggcctt agatttccgt actccccgaa atgccaaaat tatcaatgtc tgcaactgga 1380
tcctctcttc agccatttgt cttcctgtaa tgttcatggc tacaacaaaa tacaggcaag 1440
gttccataga ttgtacacta acattctctc atccaacctg gtactgggaa aacctgctga 1500
agatctgtgt tttcatcttc gccttcatta tgccagtgtc catcattacc gtgtgctatg 1560
gactgatgat cttgcgcctc aagagtgtcc gcatgctctc tggctccaaa gaaaaggaca 1620
ggaatcttcg aaggatcacc aggatggtgc tgggtggtgt ggctgtgttc atcgtctgct 1680
ggactcccat tcacatttac gtcatcatta aagccttgtt tacaatccca gaaactacgt 1740
tccagactgt ttcttggcac ttctgcattg ctctaggtta cacaacagc tgccctcaacc 1800
cagtccttta tgcatctctg gatgaaaact tcaaacgatg cttcagagag ttctgtatcc 1860
caacctcttc caacattgag caacaaaact ccaactgaat tcgtcagaac actagagacc 1920
acccctccac ggccaataca gtggatagaa ctaatcatca gctagaaaat ctggaagcag 1980
aaactgctcc gttgccttaa cagggtctca tgccattccg accttcacca agcttagaag 2040
ccaccatgta tgtggaagca ggttgcttca agaattgtga ggaggctcta attctctagg 2100
aaagtgcctg cttttaggtc atccaacctc tttcctctct ggccactctg ctctgcacat 2160
tagagggaca gcaaaaagta agtggagcat ttggaaggaa aggaatatac cacaccgagg 2220
agtcagattt gtgcaagaca ccagtgga ccaaaacca tcgtggtatg tgaattgaag 2280
tcatcataaa agtgaccct tctgtctgta agattttatt ttcaagcaaa tatttatgac 2340
ctcaacaaag aagaaccatc ttttgtaag ttaccgtag taacacataa agtaaatgct 2400
acctctgac aaagcacctt gaatggaagg tccgagctt tttagtgttt tgcaagggaa 2460
tgaatccatt attctatctt agacttttaa cttcacctta aaattagcat ctggctaagg 2520
catcatcttc acctccattt cttggttttg tattgtttaa aaaaataaca tctctttcat 2580
ctagctccat aattgcaagg gaagagatta gcatgaaagg taatctgaaa cacagtcag 2640
tgtcagctgt agaaaggtt attctcatgc actgcaaaata cttccaaaga gtcacatg 2700
gggatttttc attcttaggc tttcagtggt ttgttcct 2738

```

<210> 68

<211> 2053

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 68

```

catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
gctgtctttc ctccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacctgtcac tgacccccca 180
gcccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg gaaagcacc 300
gtcgtatgct gcaactgggt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctcgatcgtg tcgaagaagg catgaaccat atcaaccaag 420
acatgaagga ggctgagaaa aatttaaaag atttagggaa atgctgtggc cttttcatat 480
gtccttgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtggg gccagccag cctgctcgtg tagtgagcga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggcct catccgcagg gtaacaaatg atgcccaga aaatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gagcggcatc atcggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaaagtgt taagtgtgcc 840
caccctgtgt ctctccaaa tgctgcggg caagatagct ccttcatgct tttctcatgg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtc accccattg tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttggtctct 1020
ttctttccaa aggttgtaaa tagtggtcat ttggtggctc taactccttg atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcgtggg atttgcgtga taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200
cagagttact gccacggctc tttgagtgtc aggcctgtaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttcctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcatt attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgcaactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380
attttttagat tcctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcactatg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaaacac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat gtcagattt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact ttttccctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tcctttttta aaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca ttccagcaa aatatatgtt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggaatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtggtgatg taaattttat aaggctgact cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtac aattctttgt tgcttaatct agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaattat aaattcctcc 1980
tgtctcctct gtcagtttgt gaagtgtatt acattttgta gctagtttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc 2053

```

<210> 69

<211> 2053

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 69

```

catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
gctgtctttc ctccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacctgtcac tgacccccca 180
gcccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg gaaagcacc 300
gtcgtatgct gcaactgggt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctggaacgca ttgaggaagg gatggacca atcaataagg 420
acatgaaaga agcagaaaaa aatttgacgg acctaggaaa attctgcggg ctttgtgtgt 480
gtccctgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtggg gccagccag cctgctcgtg tagtgagcga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggcct catccgcagg gtaacaaatg atgcccaga aaatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gagcggcatc atcggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780

```

```

ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct ggggaagtggg taagtgtgcc 840
caccctgtgt ctcctccaaa tgctgtcggg caagatagct ccttcatgct 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 cctcgggtggc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtcc tttgagtgtc aggtctgaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttcctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcatg attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgcactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380
atttttagat tcctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcactatg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac acaaaagcat gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact tttttcctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tcctttttta aaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca ttccagcaa aatatatgtt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtggtgatg taaattttat aaggctgact cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtac aattctttgt tgcttaatct agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaatat aaattcctcc 1980
tgtctcctct gtcagtttgt gaagtgattg acattttgta gctagttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc 2053

```

```

<210> 70
<211> 266
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<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 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> DHK
 <213> Mus musculus

<400> 71
 caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaagg cttctggcta catcttcaact 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 aagggaccac ggtcaccgtc tctca 336

<210> 72
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 73
 <211> 336
 <212> DHK
 <213> Mus musculus

<400> 73
 caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
 tcctgcaagg cttctgggta caccttcaact 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 aagggaccac ggtcaccgtc tctca 336

<210> 74
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<213> Mus musculus

caggttcagc	tgcagcagtc	cgacgtgag	tgtgtgaaac	ctggggcttc	agtgaagata	60
tcttgcaggg	cttctggcta	caccttcact	gaccattcta	ttcactgggt	gaagcagcag	120
cctggccagg	gcctggaatg	gatcggatat	atttttcccg	gaaatggaaa	tattgaatac	180
aatgacaaat	tcaagggcaa	ggccacactg	actgcagaca	aatcctccgg	cactgcctac	240
atgcagctca	acagcctgac	atctcaggat	tctgcagtgt	atttctgtaa	aaggatgggg	300
tactggggtc	aaggaacctc	atgcaccgtc	tctcta			336

<213> Mus musculus

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

<213> Mus musculus

caggtcaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60

```

tctgtcaagg cttctggcta caccttcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagaag 120
cctggacagg gcctagaatg gattggatat ctttttcccg gaaatggtaa ttttgagtac 180
aatgaaaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgtctac 240
atgtacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tctca 336

```

<210> 78
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

<400> 78
Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1          5          10          15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
      20          25          30
Ser Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35          40          45
Gly Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
      50          55          60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Val Tyr
      65          70          75          80
Met Tyr Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
      85          90          95
Lys Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      100          105          110

```

<210> 79
 <211> 336
 <212> DHK
 <213> Mus musculus

```

<400> 79
caggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tctgtcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120
cctgggacagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggccctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcgtgtc attactgtgc aagaatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tctca 336

```

<210> 80
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

<400> 80
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 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 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 81
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 81
 caggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaatgggg 300
 tactggggcc aagggaccac gggtcacctc tcctca 336

<210> 82
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<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 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 Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 83
 <211> 342
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 83
 gatgttttga tgaccctaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctt caaccgattt 180
 tctggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttcct 300
 cctacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ct 342

<210> 84
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<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> Mus musculus

<400> 85

```

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gaacaactga aaatatattac agttattttg tatggtctca gcagagacag 120
ggaaaatctc ctcagctccg ggtctataat gcaaaatcct tagcagaagg tgtgccatca 180
agtttcaatg tcagtgtatc aggcacacag ttttctctga agatcaatag cctgcagcct 240
gaagattttg ggacttatca ctgtcaacac cattatggta ctccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaggc tggaaataag acgg                                     324

```

<210> 86

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<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 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> 339

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 87
 gatgttttg atgacccaaac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca accagcttcc 60
 atctcttgca aagtcagtcga gagcctctta tataactaatg gaaaaacctt tttgacttgg 120
 ttattccag aggccaggcca gtctccaaaa cgcctaactct atctgggtgc tgaattggac 180
 tctggagtc cctgacagggt cagtggcagt gggtcaggga cagatttcac actggaaatc 240
 accagagtg gaggtgagga tttgggagtt tattactgct tgcagagtgc acattttcca 300
 ttcacgttc ggctcgggcac caagctggaa atcaaacgg 339

<210> 88
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 89
 <211> 339
 <212> DHK
 <213> Mus musculus

<400> 89
 gatgttgatga tgacccaaac tccactcact ctgtcgggta ccattggaca accagcgttc 60
 atctcttgca agtcagtcga gagcctcttt aacactaatg gaaaaacctt tttgacttgg 120
 ttaattcaga ggccaggcca gtctccacag cgcctgatct atctgggtgc caaattggac 180
 tctggcgtcc cggacagggt cagtggcagt gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggtgagga tctgggagtt tattactgcc tgcagagtag ccattttccg 300
 tttacgttcg gctcgggcac caagctggaa atcaaacgg 339

<210> 90
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

```

Arg

<210> 91
 <211> 327
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

```

<400> 91
gatgttgtgc taactcagtc tctgtccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtcagt 60
ctttcctgca gggccagcca aaatattggc aactacctac actggtatca acagaaatca 120
catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc 180
aggttcagtg gcagtggtac agtcacagat ttcactctca atatcaacag tgtggagact 240
gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtgacacct ggctctcac gttcgggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa acgggct 327

```

<210> 92
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

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

```

<210> 93
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

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

```

<210> 94
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 95
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 96
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<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> PRT
 <213> Mus musculus

<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> PRT
 <213> Mus musculus

<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> PRT
 <213> Mus musculus

<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> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 100
 Lys Arg Met Gly Tyr
 1 5

<210> 101
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 101
 Lys Lys Met Asp Tyr
 1 5

<210> 102
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 102
 Ala Arg Met Asp Tyr
 1 5

<210> 103
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<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> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 105
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 105

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 106

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 106

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 107

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Asn Tyr Leu His
1 5 10

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 108

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 109

Asn Ala Lys Ser Leu Ala Glu
1 5

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 110

Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser
1 5

<210> 111

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 111

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 112

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 113

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 114

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 115

Leu Gln Ser Ala His Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 116

Leu Gln Ser Ser His Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 117
 Gln Gln Ser Asp Thr Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 118
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 118
 Asp His Ser Ile His
 1 5

<210> 119
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 119
 Asn Tyr Val Ile His
 1 5

<210> 120
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 120
 Asp His Ala Leu His
 1 5

<210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 123

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 124
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 125
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 125
 Ser Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 126
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 126
 Glu Asn Ile Tyr Ser
 1 5

<210> 127
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 127
 Thr Ser Gly Tyr Ser
 1 5

<210> 128
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 128
 Gln Asp Ile Lys Ser
 1 5

<210> 129
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 129
 Gln Asn Ile Gly Asn
 1 5

<210> 130
 <211> 911
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Ендопептидаза зі зміненою націленістю

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

```

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

```

```

785              790              795              800
Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile
      805              810              815
Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val
      820              825              830
Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu
      835              840              845
Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp
      850              855              860
Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val
865              870              875              880
Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val
      885              890              895
Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
      900              905              910

```

<210> 131

<211> 904

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ендопептидаза зі зміненою націленістю

<400> 131

```

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

```

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

Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
 740 745 750
 Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
 755 760 765
 Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
 770 775 780
 Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
 785 790 795 800
 Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
 805 810 815
 Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
 820 825 830
 Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
 835 840 845
 Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
 850 855 860
 Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
 865 870 875 880
 Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
 885 890 895
 Thr Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
 900

<210> 132
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 132
 caggtgaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacatctc 300
 gctaatacct actactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

<210> 133
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 133
 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 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 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 134
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 134
 Ala Arg Met Gly Tyr
 1 5

<210> 135
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 135
 Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 136
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 136
 Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Trp Pro
 1 5 10 15
 Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
 20 25 30
 Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
 35 40 45
 Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
 50 55 60
 Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
 65 70 75 80
 Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
 85 90 95
 Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
 100 105 110
 Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
 115 120 125
 Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
 130 135 140
 Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp
 145 150 155 160
 Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu
 165 170 175
 Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro
 180 185 190
 Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly
 195 200 205
 Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu
 210 215 220
 Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala
 225 230 235 240
 Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Val Phe

```

                245                250                255
Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe
                260                265                270
Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala
                275                280                285
His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala
                290                295                300
Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys
305                310                315                320
His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu Asn Lys Ser
                325                330                335
Arg Ile Asp Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val
                340                345

```

<210> 137
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 137
Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Trp Pro
 1                5                10                15
Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
                20                25                30
Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
                35                40                45
Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
 50                55                60
Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
65                70                75                80
Asp Leu Ala Tyr Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
                85                90                95
Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
                100                105                110
Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
                115                120                125
Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
130                135                140
Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp
145                150                155                160
Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu
                165                170                175
Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro
                180                185                190
Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly
                195                200                205
Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu
210                215                220
Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala
225                230                235                240
Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Val Phe
                245                250                255
Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe
                260                265                270
Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala
                275                280                285
His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala
290                295                300

```

Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys
 305 310 315 320
 His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu Ser Lys Ser
 325 330 335
 Arg Ile Asp Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val
 340 345

<210> 138
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 138
 Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Cys Pro
 1 5 10 15
 Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
 20 25 30
 Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
 35 40 45
 Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
 50 55 60
 Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
 65 70 75 80
 Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
 85 90 95
 Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
 100 105 110
 Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
 115 120 125
 Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
 130 135 140
 Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp
 145 150 155 160
 Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu
 165 170 175
 Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro
 180 185 190
 Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly
 195 200 205
 Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu
 210 215 220
 Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala
 225 230 235 240
 Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Val Phe
 245 250 255
 Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe
 260 265 270
 Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala
 275 280 285
 His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala
 290 295 300
 Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys
 305 310 315 320
 His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu Asn Lys Ser
 325 330 335
 Arg Ile Asp Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val
 340 345

<210> 139
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 139

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

<210> 140
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 140

```

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

```

<210> 141
 <211> 1050
 <212> DHK
 <213> Homo sapiens

<400> 141

```

atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gcccccgcc 60
ccggagcccc ggccgctggt cggcacggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcacctg gctggcgcg 180
agcaagccgg gcaagccggg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcacccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtccgc aacgcgtgc tgggcgtggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctgcgccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgc 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgaacc ctgccacaa gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tgggtgttg aatctcctgg 780
ctgcgcgacc acatcatcca tctctgggct gagtttgag ttttcccgct gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaaa gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

```

<210> 142

<211> 1050

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 142

```

atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gcccccgcc 60
ccggagcccc ggccgctggt cggcacggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcacctg gctggcgcg 180
agcaagccgg gcaagccggg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcacccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtccgc aacgcgtgc tgggcgtggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctgcgccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgc 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgaacc ctgccacaa gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tgggtgttg aatctcctgg 780
ctgcgcgacc acatcatcca tctctgggct gagtttgag ttttcccgct gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaaa gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa gtaaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

```

<210> 143

<211> 1050

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 143

```

atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctgtccgga gcccccgcc 60
ccggagcccc ggccgctggt cggcacggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg cgtgctgggc aacagcctag tgatcacctg gctggcgcg 180
agcaagccgg gcaagccggg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcacccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360

```



```

gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcaactcg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgcatggc ctgcgccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgc 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgcacc ctgccacaaa gaaggcctac 600
gtgggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatacatt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagtctcg gtgggtggtg tgggtgttg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttgag ttttcccgt gacgcggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgccactgc ctggcgtaga gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg ctttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattogca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

```

<210> 144
 <211> 1164
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

```

<400> 144
atgaacgtct cgggctgcc aggggcccgg aacgcgagcc aggggggaggc 60
tggaccccgc aggcggtcat cgtgcccctg ctcttcgcgc tcattctcct cgtgggcacc 120
tggggcaaca cgtggtgct ctgcgcggcg gccaggcggg cagcactacc 180
aacctgttca tccttaacct gggcgtagcc gacctgtgtt tcctcctgtg ctgctgccc 240
ttccaggcca ccactacac cctggacggc tgggtgttcg gctcgtgct gtgcaaggcg 300
gtgcaacttc tcattctcct caccatgcac gccagcagct tcacgctggc cgcgctctcc 360
ctggacaggt atctggccat ccgctaccgc ctgcaactcc gcgagctgcg cagcctcga 420
aacgcgctgg cagccatcgg gctcatctgg gggctgtcgc tgctcttctc cgggcccctac 480
ctgagctact accgccagtc gcagctggcc aacctgaccg tgtgccatcc cgcgtggagc 540
ggccctcgcc gccgcgcat ggacatctgc acctcgtct tcagctacct gcttctctgt 600
ctggttctcg gctgacctc cgcgcgcacc ttgcgtacc tctggcgcg cgtcgaccgc 660
gtggccgcgg gctcgggtgc ccggcgcgcc aagcgcaagg tgacacgcat gatcctcatc 720
gtggccgcgc tcttctgct ctgctggatg ccccaccacg cgtcatcct ctgctgtgtg 780
ttcggccagt tcccgctcac gcgcgcaact tatgcgttc gcatcctctc gcacctggtc 840
tcctaegcca actcctgcgt caaccccate gtttacgcgc tggctctcaa gcacttccgc 900
aaaggettcc gcacgatctg cgcgggcctg ctgggcccgtg cccagggccg agcctcgggc 960
cgtgtgtgcg ctgccgcgcg gggcaccac agtggcagcg tgttgagcg cagctccagc 1020
gacctgttc acatgagcga ggcggcgggg gcccttcgtc cctgccccgg cgttcccag 1080
ccatgcaccc tcgagccctg tccgtgcccg tccgtgcagg gccaaaaggc aggcgacagc 1140
atcctgacgg ttgatgtggc ctga 1164

```

<210> 145
 <211> 1107
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

```

<400> 145
atggtgatg ccagaaacat ttactggac agcccaggga gtgtgggggc cgtggcagtg 60
cctgtggtct ttgcctaata ctctctgctg ggcacagtgg gcaatgggct ggtgctggca 120
gtgctcctgc agcctggccc gactgctgg caggagcctg gcagaccac ggacctgttc 180
atcctcaacc tggcggtggc tgacctctgc ttcactctgt gctgctgccc cttccaggcc 240
accatctaca cgtggatgc ctggctcttt ggggcctcgt tctgcaaggc cgtgcacctg 300
ctcatctacc tcaccatgta cggcagcagc tttacgctgg ctgctgtctc cgtggacagg 360
tacctggcgc tgcggcacc cgtgctctgc cgcgcctgc gcacgcgcg taacgcccgc 420
ggcgagtg ggctggtgtg gctgctggcg gcgctctct cggcgcccta cctcagctac 480
tacggcaccg tgcgtacgg cgcgctggag ctctgctgc ccgctggga ggacgcgcg 540
cgccgcgccc tggacgtggc caccttcgt gcgcgtacc tgctgccgt ggctgtgtg 600
agcctggcct acgggcgcac gctgcgttc ctgtgggcc cgtgggtcc cgcggcgcg 660

```



```

gcggcgggccc aggcgcgggcg gagggcgacg ggccgcgcgcg ggcgcgccat gctggcggtg 720
gccgcgtctt acgcgctctg ctgggggtccg caccacgcgc tcatcctgtg cttctggtac 780
ggcgcgttcg ccttcagccc ggccacctac gcctgcgcgc tggcctcaca ctgcctggcc 840
tacgccaact cctgcctcaa cccgctcgtc tacgcgctcg cctcgcgcc cttccgcgcg 900
cgcttcgcgc gcctgtggcc gtgcggccgc cgacgcgcgc accgtgccc cgcgcgcttg 960
cgtcgcgtcc gcccgcgctc ctcgggcccc cccggtgccc ccggagacgc ccggcctagc 1020
gggaggctgc tggctggtgg cggccagggc ccggagcccc gggagggacc cgtccacggc 1080
ggagaggctg cccgaggacc ggaataa 1107

```

<210> 146

<211> 889

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент LhN/A

<221> VARIANT

<222> (453)...(455)

<223> Хаа являє собою будь-яку амінокислоту

<400> 146

```

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

```

	755						760						765						
Tyr	Asn	Gln	Tyr	Thr	Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Asn	Ile	Asn	Phe	Asn	Ile				
770							775					780							
Asp	Asp	Leu	Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala	Met	Ile				
785					790					795					800				
Asn	Ile	Asn	Lys	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn				
				805					810					815					
Ser	Met	Ile	Pro	Tyr	Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Ala	Ser				
			820					825					830						
Leu	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly	Thr	Leu				
		835					840					845							
Ile	Gly	Gln	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser				
	850					855					860								
Thr	Asp	Ile	Pro	Phe	Gln	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Asp	Asn	Gln	Arg	Leu				
865					870					875					880				
Leu	Ser	Thr	His	His	His	His	His	His											
				885															

<210> 147

<211> 2661

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент LhA/A

<400> 147

```

atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
tatatcaaaa tcccgaatgc ggggtcaaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
aaaattttggg tgatcccggg ggcgcgatacg ttcacgaacc cggaagaagg agattttaa 180
ccaccgcctg aggctaaaca ggtcccgttg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
gacaatgaaa aggacaacta cctgaaagggt gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
acagatctcg gtcgcatgtt gctgacttct attgtgcgcg gcattccgtt ttgggggtgg 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
gatgggagct accggtccga agagcttaac ctgcgtaatca ttggcccag cgcggtatatt 480
atccaattcg aatgtaaata ttttgggcat gaagtcctga atctgacgcg gaatggctat 540
ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca ttgtcacat ttggatttga agaaagcctc 600
gaagtgtgata cgaaccctct ttttagcgcg gaaaaattcg cgacggaccc agcggtgacc 660
ttggcacatg aacttattca tgcgggcat cgcttgtatg gaatcgccat taaccgaac 720
cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgtat tacgagatgt cgggcttaga agtgtccttt 780
gaagaactgc gcacgtttgg cggtcgatgt gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaac 840
gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaaa 960
tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
ctgtataaaa tgctcacga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggct 1080
ttgaatcgga aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcgggcaac 1200
tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctactgaa aaattttacc 1260
ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggtt ttatcaccag caaaaccaa 1320
tccttgggcg gtggtggcga aaacctgtac ttccagggcg gtggcggttg tgataagggc 1380
tataacaagg cttcaatga tttatgcata aagtgaaaca actgggactt gtttttctct 1440
ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag aggaattac ttccgatacc 1500
aacatcgaag cagcgaaga gaattattag ctgatctta ttcaacaata ttacctgacc 1560
tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcatc 1620
ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgctttccta atggaaagaa atatgaattg 1680
gacaaatata ccatgttcca ctatctccgc gcgcaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
attgctctga ccaattcggg aaacgaagcc cttttaaatc cttcgcgtgt gtacaccttt 1800
ttctcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcgcgcat gtttttggga 1860

```

```

tgggtggaac aactggtata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920
aaaattgccg atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgcactgaa cattggtaac 1980
atgctgtata aagatgattt tgtggggcgc ctgatctttt caggcgctgt taccctgctg 2040
gaatttatcc cggaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgcgctggt gtcctatata 2100
gcaacaaag ttttgactgt ccagacgac gacaacgcgc tcagtaaacy taacgaaaaa 2160
tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaaa caccagatt 2220
gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280
attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caacttcaac 2340
atcgacgact tatcttcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat taatattaac 2400
aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacggtgtg 2460
aaacgtctgg aagacttcga tgcaagcctt aaagatgcc ttctgaagta tatttacgat 2520
aatcgcgaa ctcttattgg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580
agtacagaca tcccttttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgctt gctgtccacg 2640
caccatcacc atcaccacta a 2661

```

<210> 148

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Прямий олігонуклеотидний праймер ORL-1

<400> 148

cactcggtcg gtgctggtgg

20

<210> 149

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Зворотний олігонуклеотидний праймер ORL-1

<400> 149

aatggccacg gcagtctcgc

20

<210> 150

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Прямий олігонуклеотидний праймер рецептора Галаніну 1

<400> 150

cccatcatg tcatccacct

20

<210> 151

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Зворотний олігонуклеотидний праймер рецептора Галаніну

<400> 151

atgggggttca ccgaggagtt

20

<210> 152
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Прямий олігонуклеотидний праймер рецептора Галаніну 2

<400> 152
 catcgtggcg gtgctttt 18

<210> 153
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Зворотний олігонуклеотидний праймер рецептора Галаніну 2

<400> 153
 agcgggaagc gaccaaac 18

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб виявлення активності ендопептидаз зі зміненою націленістю, який включає етапи:
 - а) обробки клітини зі стабільної клітинної лінії зразком, що містить ендопептидазу зі зміненою націленістю, причому зазначена клітина зі стабільної клітинної лінії чутлива до активності зазначеної ендопептидази зі зміненою націленістю при концентрації ендопептидази зі зміненою націленістю;
- 10 б) виділення з обробленої клітини компонента SNAP-25, що містить продукт розщеплення SNAP-25, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A;
- в) здійснення контакту компонента SNAP-25 з *анти*-SNAP-25 антитілом, іммобілізованим на твердофазній підкладці,
- 15 при цьому *анти*-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25;
- г) виявлення присутності комплексу антитіло-антиген, що включає *анти*-SNAP-25 антитіло й продукт розщеплення SNAP-25,
- 20 при цьому виявлення комплексу антитіло-антиген є показником активності ендопептидази зі зміненою націленістю,
- при цьому *анти*-SNAP-25 антитіло зв'язується з епітопом, карбоксильний кінець якого відповідає залишку P₁ розрізаного зв'язку у сайті розщеплення токсином BoNT/A, із продукту розщеплення SNAP-25;
- 25 при цьому *анти*-SNAP-25 антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності, що кодує послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 або SEQ ID NO: 81, або послідовність нуклеїнової кислоти, яка щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81;
- 30 і при цьому *анти*-SNAP-25 антитіло включає варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності, що кодує послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 або SEQ ID NO: 91; або послідовність нуклеїнової кислоти, яка щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 або SEQ ID NO: 91.
- 35 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що *анти*-SNAP-25 антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності, вибрані з групи, що складається з SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80; і SEQ ID NO: 82; і

варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності, вибрані із групи, що складається з SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 та SEQ ID NO: 92.

3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що продукт розщеплення SNAP-25 являє собою SNAP-25₁₉₇.

5 4. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що присутність комплексу антитіло-антиген детектують з використанням "сендвіч"-методу твердофазного ІФА.

5. *Анти*-SNAP-25 антитіла, які зв'язуються з епітопом, на карбоксильному кінці якого знаходиться залишок P₁ розрізуваного зв'язку у сайті розщеплення BoNT/A з продукту розщеплення SNAP-25,

10 при цьому *анти*-SNAP-25 антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності, що кодує послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 або SEQ ID NO: 81; або послідовність нуклеїнової кислоти, яка щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 або SEQ ID NO: 81;

15 і при цьому *анти*-SNAP-25 антитіло включає варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності, що кодує послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 або SEQ ID NO: 91, або послідовність нуклеїнової кислоти, яка щонайменше на 90 % ідентична SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 або SEQ ID NO: 91.

20 6. Антитіло за п. 5, яке **відрізняється** тим, що варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності, вибрані із групи, що складається з SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80; і SEQ ID NO: 82; і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності, вибрані із групи, що складається з SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 і SEQ ID NO: 92.

25 7. Антитіло за п. 5 або 6, яке **відрізняється** тим, що продукт розщеплення SNAP-25 являє собою SNAP-25₁₉₇.

8. Антитіло або спосіб за будь-яким з пп. 1-7, які **відрізняються** тим, що *анти*-SNAP-25 антитіло одержане від гібрида 1D3B8, вказане антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 84.

30 9. Антитіло або спосіб за будь-яким з пп. 1-7, які **відрізняються** тим, що *анти*-SNAP-25 антитіло одержане від гібрида 2E2A6, вказане антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 88.

35 10. Антитіло або спосіб за будь-яким з пп. 1-7, які **відрізняються** тим, що *анти*-SNAP-25 антитіло одержане від гібрида 3C1A5, вказане антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 90.

40 11. Антитіло або спосіб за будь-яким з пп. 1-7, які **відрізняються** тим, що *анти*-SNAP-25 антитіло одержане від гібрида 3C3E2, вказане антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 80 або SEQ ID NO: 82, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 92.

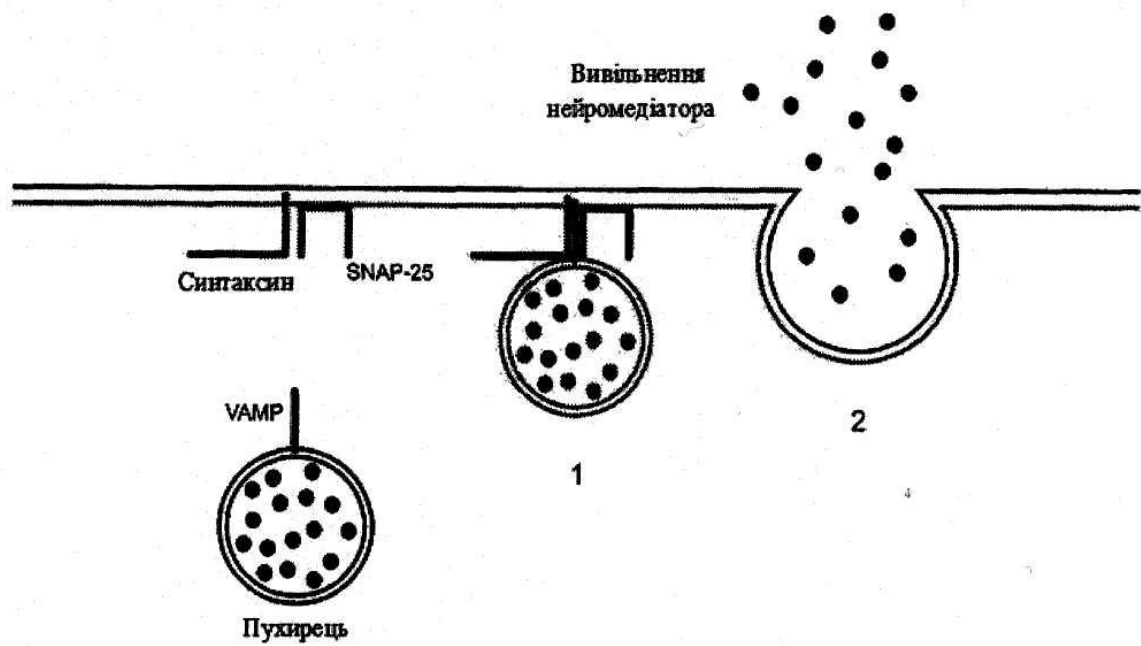


Fig. 1A

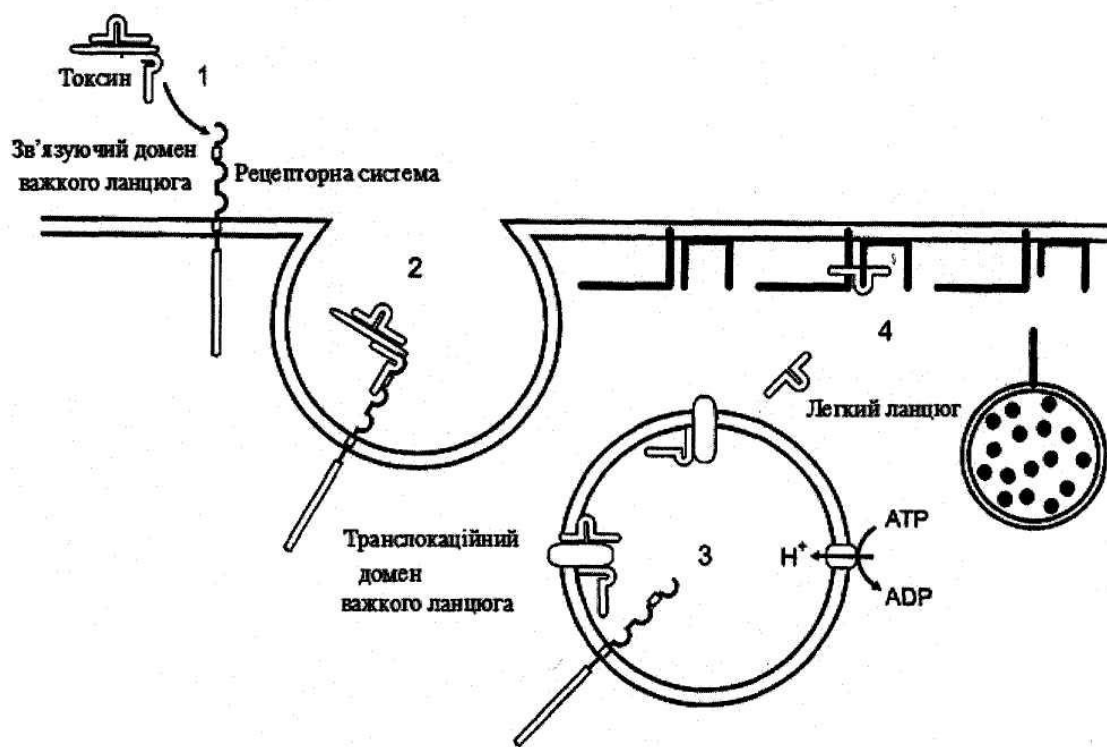
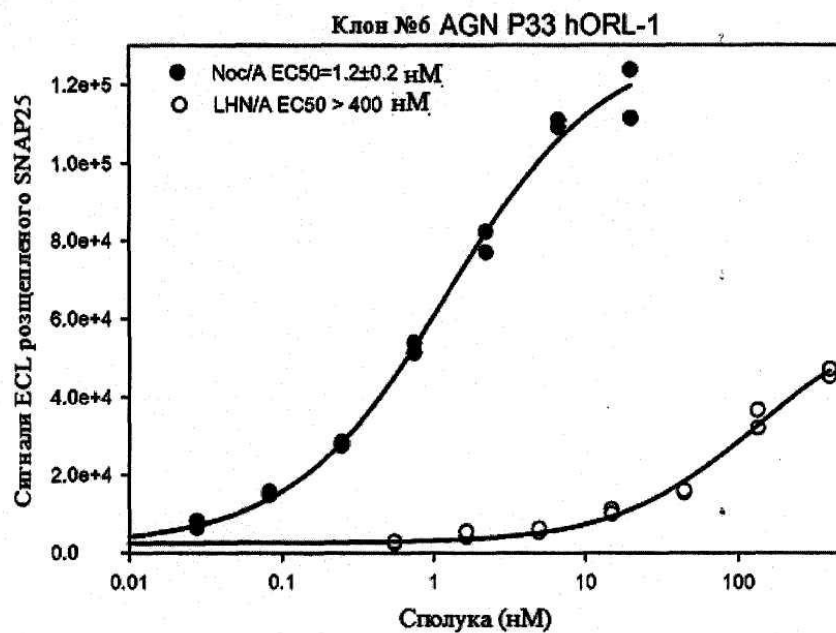


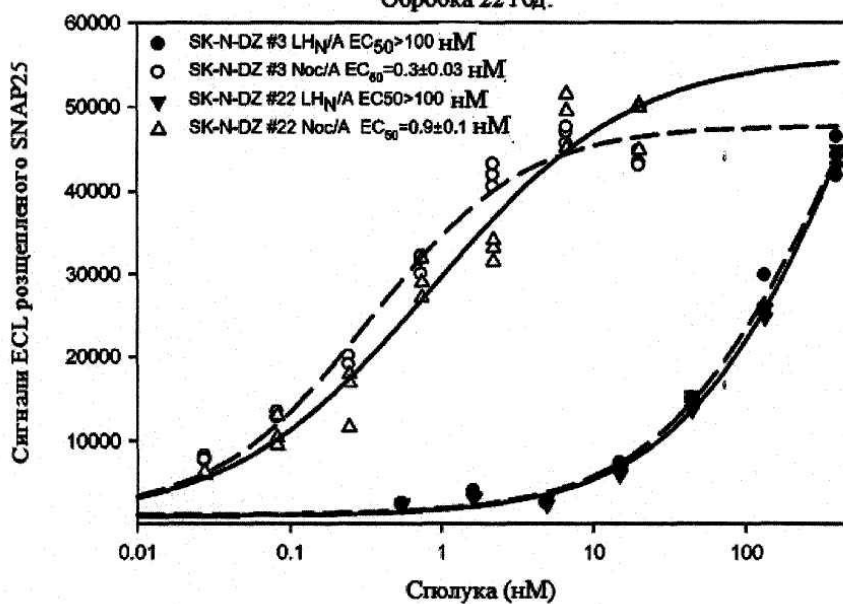
Fig. 1B



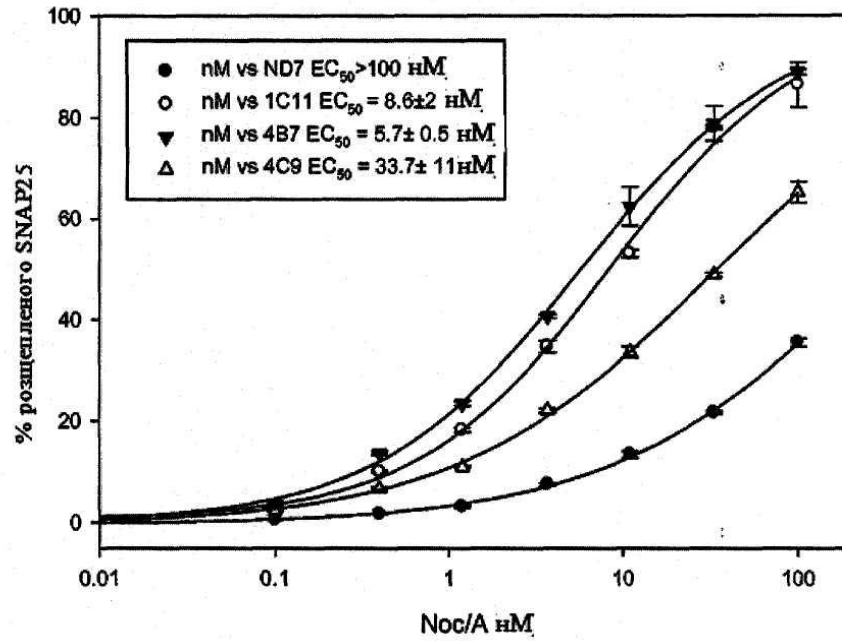
Фіг. 2

Noc/A vs. LHN/A

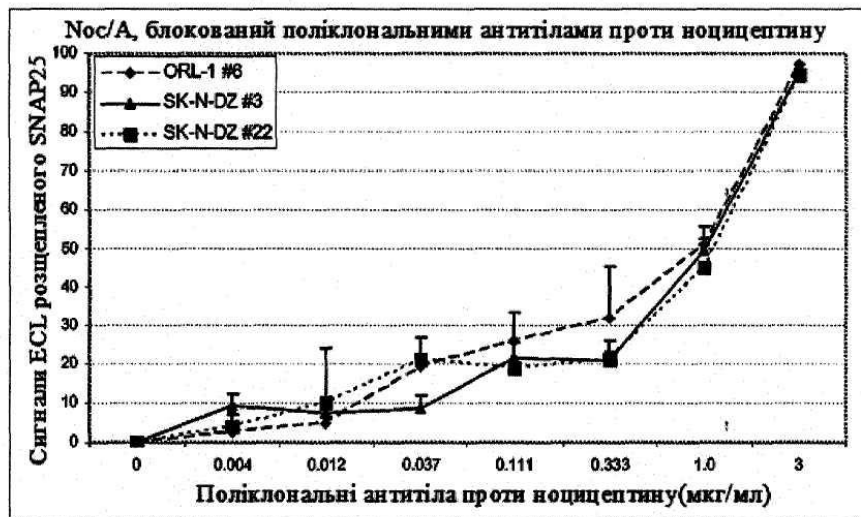
SK-N-DZ №3 і №22 @ 150 ЛІ клітин/лунка в СБС на полі-D-лізині
Обробка 22 год.



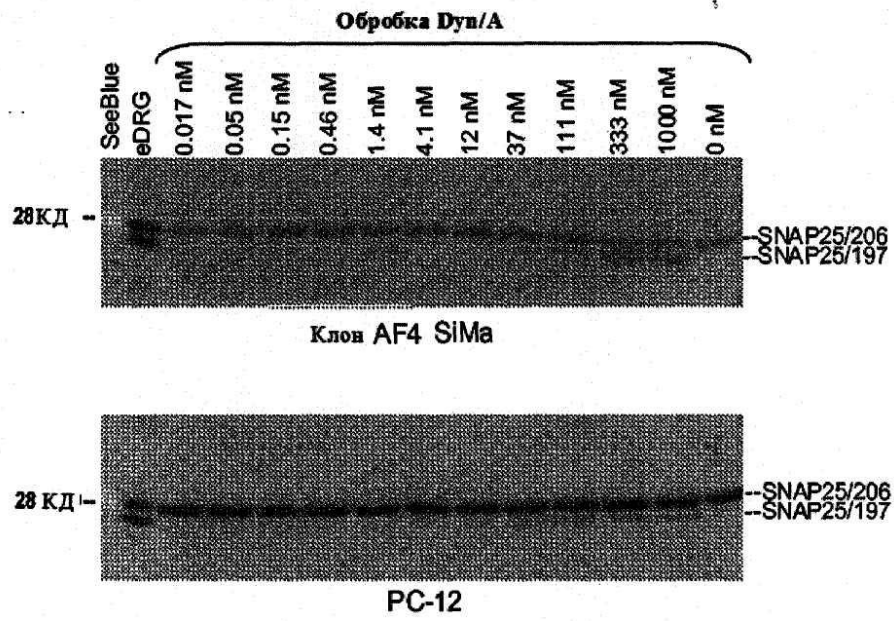
Фіг. 3



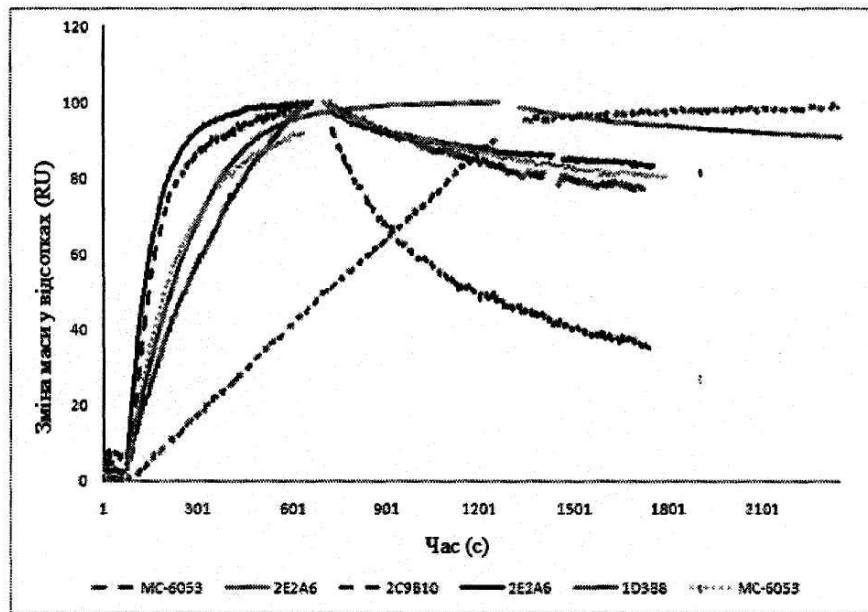
Фіг. 4



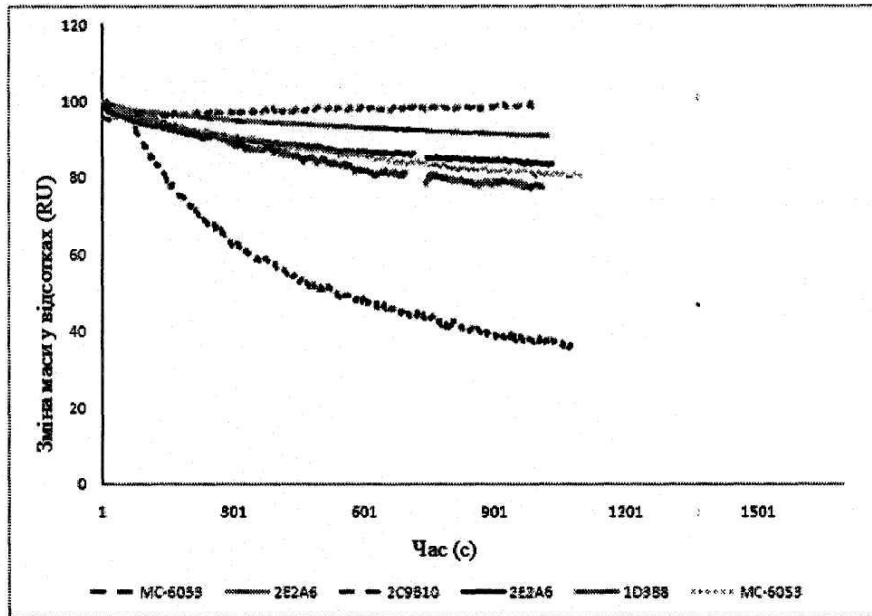
Фіг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7А



Фіг. 7Б

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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