



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114746450 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 12

(21) 申请号 202080067794.7

(22) 申请日 2020.08.21

(30) 优先权数据

62/889,963 2019.08.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.03.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/047503 2020.08.21

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/035179 EN 2021.02.25

(71) 申请人 科达生物治疗医药有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·梅金森 小安东尼·刘

小俄里翁·P·开菲尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

A61P 25/06 (2006.01)

权利要求书7页 说明书93页

序列表84页 附图12页

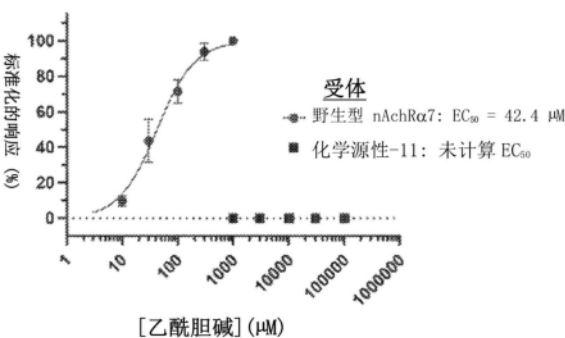
(54) 发明名称

用于神经学疾病的组合物和方法

(57) 摘要

提供了使用经工程改造的受体、多核苷酸编码的经工程改造的受体、和包含编码经工程改造的受体的多核苷酸的基因疗法载体来调节细胞活性的组合物和方法。这些组合物和方法具体地用于调节神经元的活性,例如在疾病的治疗中或在神经元回路的研究中。

乙酰胆碱剂量响应



化学源性-11 (CR-11): Y115D+L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中

1. 一种经工程改造的受体,其包含:

a. 从人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)衍生出的并且包含来自人甘氨酸受体 $\alpha 1$ 亚基的Cys-环结构域的配体结合结构域;和

b. 从人甘氨酸受体 $\alpha 1$ 亚基衍生出的离子孔结构域,

其中所述配体结合结构域包含:(i) 在选自以下成员组成的集合的一对氨基酸残基处的两个氨基酸置换:L131和S172,Y115和S170,以及Y115和L131;或(ii) L131E的氨基酸置换,其中所述氨基酸残基对应于 $\alpha 7$ -nAChR的氨基酸残基,

其中所述经工程改造的受体是嵌合的配体门控离子通道(LGIC)受体。

1.1 根据权利要求1所述的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列进一步包含在选自以下成员组成的集合的一对氨基酸残基处的两个氨基酸置换:L131和S172,Y115和S170,以及Y115和L131;或L131E的氨基酸置换,其中所述氨基酸残基对应于 $\alpha 7$ -nAChR的氨基酸残基。

2. 根据权利要求1或1.1所述的经工程改造的受体,其中所述配体结合结构域包含在选自以下成员组成的集合的一对氨基酸残基处的两个氨基酸置换:L131和S172,Y115和S170,以及Y115和L131。

3. 根据权利要求1、1.1或2中任一项所述的经工程改造的受体,其中所述配体结合结构域包含选自以下成员组成的集合的一对氨基酸置换:L131S和S172D,L131T和S172D,L131D和S172D,Y115D和S170T,Y115D和L131Q,以及Y115D和L131E。

3.1 根据权利要求1-3中任一项所述的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列进一步包含选自以下成员组成的集合的一对氨基酸置换:L131S和S172D,L131T和S172D,L131D和S172D,Y115D和S170T,Y115D和L131Q,以及Y115D和L131E。

4. 根据权利要求1或1.1所述的经工程改造的受体,其中所述配体结合结构域包含L131E的氨基酸置换。

4.1 根据权利要求1-4中任一项所述的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列进一步包含L131E的氨基酸置换。

5. 根据权利要求1-4.1中任一项所述的经工程改造的受体,其中所述Cys-环结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸166-172。

6. 根据权利要求1-4.1中任一项所述的经工程改造的受体,其中所述Cys-环结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸166-180。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的经工程改造的受体,其中所述受体包含来自人甘氨酸受体 $\alpha 1$ 亚基的 $\beta 1$ -2环结构域。

8. 根据权利要求7所述的经工程改造的受体,其中所述 $\beta 1$ -2环结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸81-84。

8.1 根据权利要求1-8中任一项所述的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体包含选自以下成员组成的集合的氨基酸序列:SEQ ID No.58-63。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体对乙酰胆碱的效能低于人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对乙酰胆碱的效能。

10. 根据权利要求9所述的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体对乙酰胆碱

的效能比人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体 ($\alpha 7$ -nAChR) 对乙酰胆碱的效能低至少2倍。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的经工程改造的受体, 其中所述经工程改造的受体对非天然配体的效能与人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体 ($\alpha 7$ -nAChR) 对非天然配体的效能大约相同。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的经工程改造的受体, 其中所述经工程改造的受体对非天然配体的效能高于人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体 ($\alpha 7$ -nAChR) 对非天然配体的效能。

13. 根据权利要求12所述的经工程改造的受体, 其中所述经工程改造的受体对非天然配体的效能比人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体 ($\alpha 7$ -nAChR) 对非天然配体的效能高至少2倍。

14. 根据权利要求9-13中任一项所述的经工程改造的受体, 其中确定所述效能包括确定EC50。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的经工程改造的受体, 其中在有非天然配体存在下所述经工程改造的受体的效力高于在有非天然配体存在下人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体 ($\alpha 7$ -nAChR) 的效力。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的经工程改造的受体, 其中在有非天然配体存在下所述经工程改造的受体的效力比在有非天然配体存在下人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体 ($\alpha 7$ -nAChR) 的效力高至少2倍。

17. 根据权利要求15-16中任一项所述的经工程改造的受体, 其中确定所述效力包括确定在有非天然配体存在下在体外穿过经工程改造的受体的电流的量。

18. 根据权利要求11-17中任一项所述的经工程改造的受体, 其中所述非天然配体选自由以下成员组成的集合: AZD-0328、TC-6987、ABT-126、APN-1125、TC-5619和Facinicine/RG3487。

19. 根据权利要求18所述的经工程改造的受体, 其中所述非天然配体选自由以下成员组成的集合: ABT-126, RG3487, 和APN-1125。

20. 根据权利要求18所述的经工程改造的受体, 其中所述非天然配体是TC-5619。

21. 一种多核苷酸, 其包含编码根据权利要求1-20中任一项所述的经工程改造的受体的核酸。

22. 根据权利要求21所述的多核苷酸, 其中所述多核苷酸包含可操作地连接至编码经工程改造的受体的核酸的启动子。

23. 根据权利要求22所述的多核苷酸, 其中所述启动子是可调节的启动子。

24. 根据权利要求23所述的多核苷酸, 其中所述可调节的启动子在可兴奋细胞中是有活性的。

25. 根据权利要求24所述的多核苷酸, 其中所述可兴奋细胞是神经元或肌细胞。

26. 根据权利要求25所述的多核苷酸, 其中所述可兴奋细胞是神经元。

27. 一种载体, 其包含根据权利要求21-26中任一项所述的多核苷酸。

28. 根据权利要求27所述的载体, 其中所述载体是质粒或病毒载体。

29. 根据权利要求28所述的载体, 其中所述载体是选自由以下成员组成的集合的病毒载体: 腺病毒载体、逆转录病毒载体、腺相关病毒 (AAV) 载体和单纯疱疹-1病毒载体 (HSV-1)。

30. 根据权利要求29所述的载体, 其中所述病毒载体是AAV载体, 并且其中所述AAV载体

是AAV5或其变体、AAV6或其变体或AAV9或其变体。

31. 一种组合物,其包含根据权利要求1-20中任一项所述的经工程改造的受体、根据权利要求21-26中任一项所述的多核苷酸、或根据权利要求27-30中任一项所述的载体。

32. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-20中任一项所述的经工程改造的受体、根据权利要求21-26中任一项所述的多核苷酸、或根据权利要求27-30中任一项所述的载体;和药学上可接受的载体。

33. 一种在神经元中产生经工程改造的受体的方法,所述方法包括使所述神经元与根据权利要求21-26中任一项所述的多核苷酸、根据权利要求27-30中任一项所述的载体、根据权利要求31所述的组合物或根据权利要求32所述的药物组合物接触。

34. 根据权利要求33所述的方法或根据权利要求26所述的多核苷酸,其中所述神经元是周围神经系统的神经元。

35. 根据权利要求33或34所述的方法或根据权利要求26所述的多核苷酸,其中所述神经元是中枢神经系统的神经元。

36. 根据权利要求33-35中任一项所述的方法或根据权利要求26所述的多核苷酸,其中所述神经元是感受伤害的神经元。

37. 根据权利要求33-36中任一项所述的方法或根据权利要求26所述的多核苷酸,其中所述神经元是非感受伤害的神经元。

38. 根据权利要求33-37中任一项所述的方法或根据权利要求26所述的多核苷酸,其中所述神经元是背根神经节(DRG)神经元、三叉神经节(TG)神经元、运动神经元、兴奋性神经元、抑制性神经元或感觉神经元。

39. 根据权利要求33-38中任一项所述的方法或根据权利要求26所述的多核苷酸,其中所述神经元是A δ 传入纤维、C纤维或A β 传入纤维。

40. 根据权利要求39所述的方法或根据权利要求26所述的多核苷酸,其中所述神经元是A β 传入纤维。

41. 根据权利要求40所述的方法或根据权利要求26所述的多核苷酸,其中A β 传入纤维是受损伤的A β 传入纤维。

42. 根据权利要求40所述的方法或根据权利要求26所述的多核苷酸,其中A β 传入纤维是未受损伤的A β 传入纤维。

43. 根据权利要求33-42中任一项所述的方法或根据权利要求26所述的多核苷酸,其中所述神经元表达神经丝200(NF200)、piezo 2和TLR-5。

44. 根据权利要求33-43中任一项所述的方法或根据权利要求26所述的多核苷酸,其中所述神经元不表达TrpV1、前列腺酸性磷酸酶、NaV1.1。

45. 根据权利要求33-44中任一项所述的方法,其中在体外、离体或在体内进行接触步骤。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中在受试者中在体内进行所述接触步骤。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述接触步骤包括将所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用给所述受试者。

48. 根据权利要求45所述的方法,其中在体外或离体进行所述接触步骤。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述接触步骤包括脂质体转染、纳米颗粒递送、

颗粒轰击、电穿孔、声处理或显微注射。

50. 根据权利要求33-49中任一项所述的方法, 其中所述经工程改造的受体能够定位至所述神经元的细胞表面。

51. 一种抑制神经元活性的方法, 所述方法包括 (a) 使所述神经元与根据权利要求1-20中任一项所述的经工程改造的受体、根据权利要求21-26中任一项所述的多核苷酸、根据权利要求27-30中任一项所述的载体、根据权利要求31所述的组合物或根据权利要求32所述的药物组合物接触, 和 (b) 使所述神经元与所述经工程改造的受体的非天然配体接触。

51.1 根据权利要求51所述的方法, 其中所述神经元是周围神经系统的神经元。

51.2 根据权利要求51所述的方法, 其中所述神经元是中枢神经系统的神经元。

52. 根据权利要求51-51.2中任一项所述的方法, 其中所述神经元是感受伤害的神经元。

53. 根据权利要求51-51.2中任一项所述的方法, 其中所述神经元是非感受伤害的神经元。

54. 根据权利要求51-53中任一项所述的方法, 其中所述神经元是背根神经节 (DRG) 神经元、三叉神经节 (TG) 神经元、运动神经元、兴奋性神经元、抑制性神经元或感觉神经元。

55. 根据权利要求51-54中任一项所述的方法, 其中所述神经元是A δ 传入纤维、C纤维或AB传入纤维。

56. 根据权利要求55所述的方法, 其中所述神经元是AB传入纤维。

57. 根据权利要求56所述的方法, 其中AB传入纤维是受损伤的AB传入纤维。

58. 根据权利要求56所述的方法, 其中AB传入纤维是未受损伤的AB传入纤维。

59. 根据权利要求51-58中任一项所述的方法, 其中所述神经元表达神经丝200 (NF200)、piezo 2和TLR-5。

60. 根据权利要求51-59中任一项所述的方法, 其中所述神经元不表达TrpV1、前列腺酸性磷酸酶、NaV1.1。

61. 根据权利要求51-60中任一项所述的方法, 其中在体外、离体或在体内进行接触步骤(a)。

62. 根据权利要求51-61中任一项所述的方法, 其中在体外、离体或在体内进行接触步骤(b)。

63. 根据权利要求51-62中任一项所述的方法, 其中在受试者中在体内进行所述接触步骤(a)和/或(b)。

64. 根据权利要求63所述的方法, 其中所述接触步骤(a)包括将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体或所述药物组合物施用给所述受试者; 和/或所述接触步骤(b)包括将所述非天然配体施用给所述受试者。

65. 根据权利要求51-64中任一项所述的方法, 其中所述接触步骤(a)和/或(b)包括脂质体转染、纳米颗粒递送、颗粒轰击、电穿孔、声处理或显微注射。

66. 根据权利要求51-65中任一项所述的方法, 其中所述经工程改造的受体能够定位至所述神经元的细胞表面。

67. 一种在有此需要的受试者中治疗神经学障碍和/或延迟神经学障碍的发作的方法, 所述方法包括:

a. 给所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1-20中任一项所述的经工程改造的受体、根据权利要求21-26中任一项所述的多核苷酸、根据权利要求27-30中任一项所述的载体、根据权利要求31所述的组合物或根据权利要求32所述的药物组合物,和

b. 给所述受试者施用所述经工程改造的受体的非天然配体。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中在步骤(a)之后给所述受试者施用所述非天然配体。

69. 根据权利要求67所述的方法,其中与步骤(a)并行地给所述受试者施用所述非天然配体。

70. 根据权利要求67-69中任一项所述的方法,其中所述神经学障碍是癫痫发作障碍、运动障碍、进食障碍、脊髓损伤、神经源性膀胱障碍、痛觉超敏、痉挛状态障碍、瘙痒、阿尔茨海默氏病、帕金森病、创伤后应激障碍(PTSD)、胃食管反流疾病(GERD)、成瘾、焦虑、抑郁症、记忆丧失、痴呆、睡眠呼吸暂停、中风、发作性睡病、尿失禁、特发性震颤、三叉神经痛、口腔烧灼综合征或心房颤动。

71. 根据权利要求70所述的方法,其中所述神经学障碍是痛觉超敏。

72. 根据权利要求67-71中任一项所述的方法,其中所述非天然配体选自以下成员组成的集合:AZD-0328、ABT-126、TC6987、APN-1125、TC-5619和Facinicine/RG3487。

73. 根据权利要求67-72中任一项所述的方法,其中口服地、皮下地、局部地或静脉内地施用所述非天然配体。

74. 根据权利要求73所述的方法,其中口服地施用所述非天然配体。

75. 根据权利要求67-74中任一项所述的方法,其中皮下地、口服地、鞘内地、局部地、静脉内地、神经节内地、神经内地、颅内地、椎管内地或向小脑延髓池施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。

76. 根据权利要求67-75中任一项所述的方法,其中通过经椎间孔注射或鞘内地施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。

77. 根据权利要求67-76中任一项所述的方法,其中所述受试者遭受三叉神经痛,并且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的三叉神经节(TG)。

78. 根据权利要求67-76中任一项所述的方法,其中所述受试者遭受神经性疼痛,并且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的背根神经节(DRG)。

79. 根据权利要求67-78中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

80. 根据权利要求67-79中任一项所述的方法,其中所述治疗有效量减轻所述神经学障碍的征象和/或症状的严重程度。

81. 根据权利要求67-80中任一项所述的方法,其中所述治疗有效量延迟所述神经学障碍的征象和/或症状的发作。

82. 根据权利要求67-81中任一项所述的方法,其中所述治疗有效量消除所述神经学障碍的征象和/或症状。

83. 根据权利要求80-82中任一项所述的方法,其中所述神经学障碍的征象是神经损伤、神经萎缩和/或癫痫发作。

84. 根据权利要求83所述的方法,其中所述神经损伤是周围神经损伤。
85. 根据权利要求80-84中任一项所述的方法,其中所述神经学障碍的症状是疼痛。
86. 一种在有此需要的受试者中治疗疼痛和/或延迟疼痛发作的方法,所述方法包括:
- a. 给所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1-20中任一项所述的经工程改造的受体、根据权利要求21-26中任一项所述的多核苷酸、根据权利要求27-30中任一项所述的载体、根据权利要求31所述的组合物或根据权利要求32所述的药物组合物,和
 - b. 给所述受试者施用所述经工程改造的受体的非天然配体。
87. 根据权利要求86所述的方法,其中在步骤(a)之后给所述受试者施用所述非天然配体。
88. 根据权利要求86所述的方法,其中与步骤(a)并行地给所述受试者施用所述非天然配体。
89. 根据权利要求86-88中任一项所述的方法,其中所述非天然配体选自由以下成员组成的集合:AZD-0328、ABT-126、TC6987、APN-1125、TC-5619和Facinicine/RG3487。
90. 根据权利要求86-89中任一项所述的方法,其中口服地、皮下地、局部地或静脉内地施用所述非天然配体。
91. 根据权利要求90所述的方法,其中口服地施用所述非天然配体。
92. 根据权利要求86-91中任一项所述的方法,其中皮下地、口服地、鞘内地、局部地、静脉内地、神经节内地、神经内地、颅内地、椎管内地或向小脑延髓池施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。
93. 根据权利要求86-92中任一项所述的方法,其中通过经椎间孔注射或鞘内地施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。
94. 根据权利要求86-93中任一项所述的方法,其中所述受试者遭受三叉神经痛,并且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的三叉神经节(TG)。
95. 根据权利要求86-94中任一项所述的方法,其中所述受试者遭受神经性疼痛,并且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的背根神经节(DRG)。
96. 根据权利要求86-95中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。
97. 根据权利要求85-96中任一项所述的方法,其中所述疼痛是神经性疼痛。
98. 根据权利要求85-97中任一项所述的方法,其中所述疼痛与化学疗法有关,由化学疗法造成,或起因于化学疗法。
99. 根据权利要求85-98中任一项所述的方法,其中所述疼痛与创伤有关,由创伤造成,或起因于创伤。
100. 根据权利要求85-99中任一项所述的方法,其中所述受试者遭受痛觉超敏。
101. 根据权利要求85-100中任一项所述的方法,其中所述疼痛在医学操作后出现。
102. 根据权利要求85-101中任一项所述的方法,其中所述疼痛与分娩或剖腹产术有关,由分娩或剖腹产术造成,或起因于分娩或剖腹产术。
103. 根据权利要求85-102中任一项所述的方法,其中所述疼痛与偏头痛有关,由偏头痛造成,或起因于偏头痛。

104. 根据权利要求85-103中任一项所述的方法, 其中所述治疗有效量暂时减轻所述受试者中的疼痛, 永久地减轻所述受试者中的疼痛, 预防所述受试者中的疼痛发作, 和/或消除所述受试者中的疼痛。

105. 根据权利要求85-104中任一项所述的方法, 其中在所述受试者中出现疼痛之前进行步骤(a) 和(b)。

用于神经学疾病的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年8月21日提交的美国临时专利申请系列号62/889,963的权益,其内容通过引用整体并入本文。

[0003] 电子提交的文本文件的描述

[0004] 与本申请相关的序列列表以文本格式代替纸质副本提供,并特此通过引用并入说明书中。包含序列列表的文本文件的名称是“SWCH02901W0-Sequence_Listing”。文本文件是200kb,创建于2020年8月21日,并正在通过EFS-Web以电子方式提交。

技术领域

[0005] 本公开内容涉及经工程改造的受体以及经工程改造的受体和小分子配体用于调节细胞活性并治疗疾病的用途。

背景技术

[0006] 顽固性神经学疾病经常与异常地起作用的神经元相关联。与所述疾病相关联的易处理的靶蛋白的缺乏已经阻碍了开发用于治疗这些病症的疗法的尝试。例如,在美国和世界范围内,无法缓解的慢性疼痛是一个严重的健康问题。医学研究所(Institute of Medicine)的一份报告估计,1.16亿美国人遭受持续数周到数年的疼痛,导致每年超过5.6亿美元的费用。对于慢性疼痛患者,没有适当的长期疗法,这给社会和个人都带来了巨大的费用。疼痛经常会导致残疾,而且即使没有残疾,也会对生活质量产生深远影响。即使在诸如以下护理情况最佳时,疼痛治疗也常常失败:专心的、训练有素的医师;容易获得阿片样物质;使用辅助镇痛药;患者控制的镇痛的可获得性;以及如神经传导阻滞和IT泵等程序的基于证据的使用。

[0007] 关于慢性疼痛最常用的疗法是应用阿片样镇痛剂和非甾体类抗炎药,但这些药物可以导致成瘾并可能产生副作用,诸如药物依赖性、耐受性、呼吸抑制、镇静、认知失败、幻觉以及其它系统性副作用。尽管广泛使用药物,但其在缓解疼痛方面的成功率非常低。使用各种药物的大型随机研究发现,每两或三名患者中只有一名实现了至少至少50%的疼痛缓解(Finnerup等人,2005)。使用最先进的药理学治疗的随访研究发现了相同的结果,表明用于疼痛的药物的效力没有改善(Finnerup等人,Pain,150(3):573-81,2010)。

[0008] 用于治疗疼痛的更侵入性选择包括神经传导阻滞和电刺激。神经传导阻滞是通常在脊髓中的局部麻醉剂注射,以中断到大脑的疼痛信号,其作用仅持续数周到数月。在大多数情况下,神经传导阻滞不是推荐的治疗选择(Mailis和Taenzer,Pain Res Manag.17(3):150-158,2012)。电刺激涉及提供电流以阻断疼痛信号。尽管作用可能比神经传导阻滞持续得更久,但电导线本身会引起并发症:脱位、感染、破裂或电池快要没电。一项综述发现,用电刺激治疗神经病的患者中的40%经历了装置的这些问题中的一个或多个问题(Wolter,2014)。

[0009] 用于管理疼痛的最侵入性的且最不优选的方法是引起疼痛的神经或其部分的完

全手术除去。仅当患者已用尽前者和其它更少侵入性的治疗并发现它们无效时,才推荐此选项。射频神经消融使用热来破坏有问题的神经并且提供比神经传导阻滞更长的疼痛缓解。但是,一项研究发现,在背根神经节(DRG)因慢性腰骶神经根痛而有部分射频损伤方面,在对照组与治疗组之间没有差异(Geurts等人,2003)。用于手术除去疼痛神经的其它手术方法具有类似的缺点并且具有长期的严重副作用(包括感觉或运动缺陷)或在其它地方引起疼痛。

[0010] 用于治疗神经学障碍的方法应当是安全的、高效的和有成本效益的。基因疗法可以为多种神经学疾病提供非侵入性治疗选择,包括管理疼痛。但是,迄今为止,基因疗法尚未广泛用于治疗神经学疾病。本公开内容解决了这些需求。

附图说明

[0011] 当结合附图阅读时,从以下详细描述最好地理解本公开内容。本专利或申请文件含有至少一幅彩色附图。具有彩图的该专利或专利申请公开文本的复制件将在请求并支付必要的费用后由专利局提供。应当强调的是,根据通常实践,附图的各个特征不是按比例绘制。相反,为了清楚起见,各个特征的尺寸被任意放大或缩小。在附图中包括以下图:

[0012] 图1A-图1G显示了经工程改造的嵌合受体SEQ ID NO:33的突变体中YFP荧光猝灭百分比的热图,该突变体在不同剂量的乙酰胆碱或指示的非天然配体的刺激后包含指示的双氨基酸置换。配体剂量写在每个图表的顶部。框中的数字指示观察到的猝灭的绝对量。深蓝色=YFP报告物的80%最大猝灭。浅蓝色=30-80%的猝灭。白色=10-30%。橙色=0-10%猝灭。负值代表由于刺激伪像而具有负猝灭的无应答者。SEQ ID NO:29是用作阴性对照的无反应嵌合体。非天然配体名称的缩写:abt:ABT-126;ach:乙酰胆碱;apn:APN-1125;azd:AZD-0328;brd:TC-5619;fac:RG3487;tc6:TC-6987。

[0013] 图2A-图2B显示了在HEK 293细胞中表达的CR-11(化学成因(Chemogenic)受体-11,一种经工程改造的受体,其包含具有在SEQ ID NO:33中的Y115D和L131Q的氨基酸置换的氨基酸序列)对乙酰胆碱以及对非天然配体RG-3487(SA-2,合成激动剂-2)的浓度-响应曲线。使用手动膜片箴电生理学评价应答。将电流标准化为统一以获得最大应答。穿过数据点的连续线是用Hill方程式获得的最佳拟合,并且从浓度-响应曲线估计每种配体的 EC_{50} 。图2A显示了野生型和CR-11受体对乙酰胆碱的浓度-响应曲线。图2B显示了野生型和CR-11受体对RG-3487(SA-2)的浓度-响应曲线。

[0014] 图3显示了RG-3487(SA-2)在成年大鼠DRG神经元中诱导的示例性氯离子电流,所述神经元被表达CR-11的慢病毒(化学成因(Chemogenic)受体-11,一种经工程改造的受体,其包含具有在SEQ ID NO:33中的Y115D和L131Q的氨基酸置换的氨基酸序列)转导。

[0015] 图4A显示了表达CR-11(经工程改造的受体,其包含具有在SEQ ID NO:33中的Y115D和L131Q的氨基酸置换的氨基酸序列)的转导的DRG神经元或对照DRG神经元(没有CR-11表达)在不同电流注射(50pA至700pA)下的诱发动作电位。上面的小图显示了对照DRG神经元的诱发动作电位。左下小图显示了在有3 μ M RG-3487(SA-2)存在下表达CR-11的转导的DRG神经元的诱发动作电位。右下小图显示了在RG-3487(SA-2)被洗掉后,表达CR-11的转导的DRG神经元的诱发动作电位。图4B显示了对照DRG神经元和表达CR-11的转导的DRG神经元在没有或有指定配体存在下的基本电流强度值(激发动作电位所需的电流)。

[0016] 图5显示了正在表达经工程改造的受体的HA-标签阳性细胞的百分比,标准化为表达SEQ ID NO:33的氨基酸序列的对照细胞(“平均HA标签%”);和正在表达经工程改造的受体的 α -银环蛇毒素阳性细胞的百分比,标准化为表达SEQ ID NO:33的氨基酸序列的对照细胞(“标准化的AB%”)。图5还显示了使用抗-HA抗体(“平均HA MFI”)或缀合至Alexa Fluor 647的荧光地标记的 α -银环蛇毒素(“标准化的AB MFI”)所评价的表达经工程改造的受体的细胞的中值荧光强度(MFI),标准化为表达SEQ ID NO:33的氨基酸序列的对照细胞。

发明内容

[0017] 本公开内容提供了经工程改造的受体,其包含:从人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)衍生出的并且包含来自人甘氨酸受体 $\alpha 1$ 亚基的Cys-环结构域的配体结合结构域;和从人甘氨酸受体 $\alpha 1$ 亚基衍生出的离子孔结构域。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体是嵌合的配体门控离子通道(LGIC)受体。在某些实施方案中,所述配体结合结构域包含:(i)在选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸残基处的两个氨基酸置换:L131和S172,Y115和S170,以及Y115和L131;或(ii)L131E的氨基酸置换,其中所述氨基酸残基对应于 $\alpha 7$ -nAChR的氨基酸残基。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列进一步包含在选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸残基处的两个氨基酸置换:L131和S172,Y115和S170,以及Y115和L131;或L131E的氨基酸置换,其中所述氨基酸残基对应于 $\alpha 7$ -nAChR的氨基酸残基。

[0018] 在某些实施方案中,所述配体结合结构域包含在选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸残基处的两个氨基酸置换:L131和S172,Y115和S170,以及Y115和L131。在某些实施方案中,所述配体结合结构域包含选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸置换:L131S和S172D,L131T和S172D,L131D和S172D,Y115D和S170T,Y115D和L131Q,以及Y115D和L131E。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列进一步包含选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸置换:L131S和S172D,L131T和S172D,L131D和S172D,Y115D和S170T,Y115D和L131Q,以及Y115D和L131E。

[0019] 在某些实施方案中,所述配体结合结构域包含L131E的氨基酸置换。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列进一步包含L131E的氨基酸置换。

[0020] 在某些实施方案中,所述Cys-环结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸166-172。在某些实施方案中,所述Cys-环结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸166-180。在某些实施方案中,所述受体包含来自人甘氨酸受体 $\alpha 1$ 亚基的 $\beta 1$ -2环结构域。在某些实施方案中,所述 $\beta 1$ -2环结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸81-84。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体包含选自由以下成员组成的集合的氨基酸序列:SEQ ID No.58-63。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体包含选自由以下成员组成的集合的氨基酸序列:SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:63。

[0021] 在某些实施方案中,所述经工程改造的受体对乙酰胆碱的效能低于人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对乙酰胆碱的效能。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体对乙酰胆碱的效能比人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对乙酰胆碱的效能低至少2倍。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体对非天然配体的效能与人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -

nAChR) 对非天然配体的效能大约相同。

[0022] 在某些实施方案中,所述经工程改造的受体对非天然配体的效能高于人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对非天然配体的效能。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体对非天然配体的效能比人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对非天然配体的效能高至少2倍。在某些实施方案中,确定所述效能包括确定EC50。

[0023] 在某些实施方案中,在有非天然配体存在下所述经工程改造的受体的效力高于在有非天然配体存在下人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)的效力。在某些实施方案中,在有非天然配体存在下所述经工程改造的受体的效力比在有非天然配体存在下人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)的效力高至少2倍。在某些实施方案中,确定所述效力包括确定在有非天然配体存在下在体外穿过经工程改造的受体的电流的量。

[0024] 在某些实施方案中,所述非天然配体选自由以下成员组成的集合:AZD-0328、TC-6987、ABT-126、APN-1125、TC-5619和Facinicine/RG3487。在某些实施方案中,所述非天然配体选自由以下成员组成的集合:ABT-126、RG3487和APN-1125。在某些实施方案中,所述非天然配体是TC-5619。

[0025] 本公开内容提供了多核苷酸,其包含编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的核酸。在某些实施方案中,所述多核苷酸包含可操作地连接至编码经工程改造的受体的核酸的启动子。在某些实施方案中,所述启动子是可调节的启动子。在某些实施方案中,所述可调节的启动子在可兴奋细胞中是有活性的。在某些实施方案中,所述可兴奋细胞是神经元或肌细胞。在某些实施方案中,所述可兴奋细胞是神经元。

[0026] 本公开内容提供了载体,其包含本文公开的多核苷酸中的任一种。在某些实施方案中,所述载体是质粒或病毒载体。在某些实施方案中,所述载体是选自由以下成员组成的集合的病毒载体:腺病毒载体、逆转录病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体和单纯疱疹-1病毒载体(HSV-1)。在某些实施方案中,所述病毒载体是AVV载体,且其中所述AAV载体是AAV5或其变体、AAV6或其变体或AAV9或其变体。

[0027] 本公开内容提供了组合物,其包含本文公开的经工程改造的受体中的任一种、本文公开的多核苷酸中的任一种或本文公开的载体中的任一种。本公开内容进一步提供了药物组合物,其包含本文公开的经工程改造的受体中的任一种、本文公开的多核苷酸中的任一种或本文公开的载体中的任一种;和药学上可接受的载体。

[0028] 本公开内容提供了在神经元中产生经工程改造的受体的方法,该方法包括使所述神经元与本文公开的多核苷酸中的任一种、本文公开的载体中的任一种、本文公开的组合物中的任一种或本文公开的药物组合物中的任一种接触。在某些实施方案中,所述神经元是周围神经系统的神经元。在某些实施方案中,所述神经元是中枢神经系统的神经元。在某些实施方案中,所述神经元是感受伤害的神经元。在某些实施方案中,所述神经元是非感受伤害的神经元。在某些实施方案中,所述神经元是背根神经节(DRG)神经元、三叉神经节(TG)神经元、运动神经元、兴奋性神经元、抑制性神经元或感觉神经元。在某些实施方案中,所述神经元是A δ 传入纤维、C纤维或A β 传入纤维。在某些实施方案中,所述神经元是A β 传入纤维。在某些实施方案中,所述A β 传入纤维是受损伤的A β 传入纤维。在某些实施方案中,所述A β 传入纤维是未受损伤的A β 传入纤维。在某些实施方案中,其中所述神经元表达神经丝200(NF200)、piezo 2和TLR-5。在某些实施方案中,所述神经元不表达TrpV1、前列腺酸性磷

酸酶、NaV1.1。

[0029] 在某些实施方案中,在体外、离体或在体内进行所述接触步骤。在某些实施方案中,在受试者中在体内进行所述接触步骤。在某些实施方案中,所述接触步骤包括将所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用给所述受试者。在某些实施方案中,在体外或离体进行所述接触步骤。在某些实施方案中,所述接触步骤包括脂质体转染、纳米颗粒递送、颗粒轰击、电穿孔、声处理或显微注射。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体能够定位至所述神经元的细胞表面。

[0030] 本公开内容提供了抑制神经元活性的方法,该方法包括 (a) 使所述神经元与本文公开的经工程改造的受体中的任一种、本文公开的多核苷酸中的任一种、本文公开的载体中的任一种、本文公开的组合物中的任一种或本文公开的药物组合物中的任一种接触,和 (b) 使所述神经元与所述经工程改造的受体的非天然配体接触。在某些实施方案中,所述神经元是周围神经系统的神经元。在某些实施方案中,所述神经元是中枢神经系统的神经元。在某些实施方案中,所述神经元是感受伤害的神经元。在某些实施方案中,所述神经元是非感受伤害的神经元。在某些实施方案中,所述神经元是背根神经节 (DRG) 神经元、三叉神经节 (TG) 神经元、运动神经元、兴奋性神经元、抑制性神经元或感觉神经元。在某些实施方案中,所述神经元是A δ 传入纤维、C纤维或AB传入纤维。在某些实施方案中,所述神经元是AB传入纤维。在某些实施方案中,所述AB传入纤维是受损伤的AB传入纤维。在某些实施方案中,所述AB传入纤维是未受损伤的AB传入纤维。在某些实施方案中,所述神经元表达神经丝200 (NF200)、piezo 2和TLR-5。在某些实施方案中,所述神经元不表达TrpV1、前列腺酸性磷酸酶、NaV1.1。

[0031] 在某些实施方案中,在体外、离体或在体内进行所述接触步骤 (a)。在某些实施方案中,在体外、离体或在体内进行所述接触步骤 (b)。在某些实施方案中,在受试者中在体内进行所述接触步骤 (a) 和/或 (b)。在某些实施方案中,所述接触步骤 (a) 包括将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体或所述药物组合物施用给所述受试者;和/或所述接触步骤 (b) 包括将所述非天然配体施用给所述受试者。在某些实施方案中,所述接触步骤 (a) 和/或 (b) 包括脂质体转染、纳米颗粒递送、颗粒轰击、电穿孔、声处理或显微注射。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体能够定位至所述神经元的细胞表面。

[0032] 本公开内容提供了在有此需要的受试者中治疗神经学障碍和/或延迟神经学障碍的发作的方法,所述方法包括:给所述受试者施用治疗有效量的本文公开的经工程改造的受体中的任一种、本文公开的多核苷酸中的任一种、本文公开的载体中的任一种、本文公开的组合物中的任一种或本文公开的药物组合物中的任一种,和给所述受试者施用所述经工程改造的受体的非天然配体。在某些实施方案中,在步骤 (a) 之后给所述受试者施用所述非天然配体。在某些实施方案中,与步骤 (a) 并行地给所述受试者施用所述非天然配体。

[0033] 在某些实施方案中,所述神经学障碍是癫痫发作障碍、运动障碍、进食障碍、脊髓损伤、神经源性膀胱障碍、痛觉超敏、痉挛状态障碍、瘙痒、阿尔茨海默氏病、帕金森病、创伤后应激障碍 (PTSD)、胃食管反流疾病 (GERD)、成瘾、焦虑、抑郁症、记忆丧失、痴呆、睡眠呼吸暂停、中风、发作性睡病、尿失禁、特发性震颤、三叉神经痛、口腔烧灼综合征或心房颤动。在某些实施方案中,所述神经学障碍是痛觉超敏。在某些实施方案中,所述非天然配体选自以下成员组成的集合:AZD-0328、ABT-126、TC6987、APN-1125、TC-5619和Facinicine/

RG3487。

[0034] 在某些实施方案中,口服地、皮下地、局部地或静脉内地施用所述非天然配体。在某些实施方案中,口服地施用所述非天然配体。在某些实施方案中,皮下地、口服地、鞘内地、局部地、静脉内地、神经节内地、神经内地、颅内地、椎管内地或向小脑延髓池施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。在某些实施方案中,通过经椎间孔注射或鞘内地施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。在某些实施方案中,所述受试者遭受三叉神经痛,且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的三叉神经节(TG)。在某些实施方案中,所述受试者遭受神经性疼痛,且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的背根神经节(DRG)。在某些实施方案中,所述受试者是人。

[0035] 在某些实施方案中,所述治疗有效量减轻所述神经学障碍的征象和/或症状的严重程度。在某些实施方案中,所述治疗有效量延迟所述神经学障碍的征象和/或症状的发作。在某些实施方案中,所述治疗有效量消除所述神经学障碍的征象和/或症状。在某些实施方案中,所述神经学障碍的征象是神经损伤、神经萎缩和/或癫痫发作。在某些实施方案中,所述神经损伤是周围神经损伤。在某些实施方案中,所述神经学障碍的症状是疼痛。

[0036] 本公开内容提供了在有此需要的受试者中治疗疼痛和/或延迟疼痛发作的方法,该方法包括:给所述受试者施用治疗有效量的本文公开的经工程改造的受体中的任一种、本文公开的多核苷酸中的任一种、本文公开的载体中的任一种、本文公开的组合物中的任一种或本文公开的药物组合物中的任一种,和给所述受试者施用所述经工程改造的受体的非天然配体。在某些实施方案中,在步骤(a)之后给所述受试者施用所述非天然配体。在某些实施方案中,与步骤(a)并行地给所述受试者施用所述非天然配体。在某些实施方案中,所述非天然配体选自由以下成员组成的集合:AZD-0328、ABT-126、TC6987、APN-1125、TC-5619和Facinicine/RG3487。

[0037] 在某些实施方案中,口服地、皮下地、局部地或静脉内地施用所述非天然配体。在某些实施方案中,口服地施用所述非天然配体。在某些实施方案中,皮下地、口服地、鞘内地、局部地、静脉内地、神经节内地、神经内地、颅内地、椎管内地或向小脑延髓池施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。在某些实施方案中,通过经椎间孔注射或鞘内地施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。

[0038] 在某些实施方案中,所述受试者遭受三叉神经痛,且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的三叉神经节(TG)。在某些实施方案中,所述受试者遭受神经性疼痛,且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的背根神经节(DRG)。

[0039] 在某些实施方案中,所述受试者是人。在某些实施方案中,所述疼痛是神经性疼痛。在某些实施方案中,所述疼痛与化学疗法有关,由化学疗法造成,或起因于化学疗法。在某些实施方案中,所述疼痛与创伤有关,由创伤造成,或起因于创伤。在某些实施方案中,所述受试者遭受痛觉超敏。在某些实施方案中,所述疼痛在医学操作后出现。在某些实施方案

中,所述疼痛与分娩或剖腹产术有关,由分娩或剖腹产术造成,或起因于分娩或剖腹产术。在某些实施方案中,所述疼痛与偏头痛有关,由偏头痛造成,或起因于偏头痛。在某些实施方案中,所述治疗有效量暂时减轻所述受试者中的疼痛,永久地减轻所述受试者中的疼痛,预防所述受试者中的疼痛发作,和/或消除所述受试者中的疼痛。在某些实施方案中,在所述受试者中出现疼痛之前进行步骤(a)和(b)。

具体实施方式

[0040] A. 概述

[0041] 提供了用于调节细胞的活性的组合物和方法,其使用经工程改造的配体门控离子通道(LGIC)受体、多核苷酸编码的经工程改造的LGIC受体和包含编码经工程改造的LGIC受体的多核苷酸的基因疗法载体。这些组合物和方法具体地用于调节神经元的活性,例如在疾病的治疗中或在神经元回路的研究中。另外,提供了用于实践主题方法的试剂、装置及其试剂盒。

[0042] 具体地,本公开内容提供了经工程改造的受体,其结合已知的药物、配体和/或结合剂并响应于已知的药物、配体和/或结合剂而发信号。在某些实施方案中,本文描述的经工程改造的受体对已知的激动剂结合剂表现出增加的亲和力。在某些实施方案中,本文描述的经工程改造的受体对拮抗剂或调节剂结合剂表现出亲和力并对所述拮抗剂和/或调节剂做出应答,如同它们是激动剂。本公开内容进一步提供了在有此需要的受试者中治疗神经学疾病的方法。本公开内容通过利用以不同于野生型内源性受体的方式对已知药物做出应答的经工程改造的受体增加已知药物可以应用的临床适应症的数量。

[0043] 在描述本发明的方法和组合物之前,应当理解,本公开内容不限于所描述的特定方法或组合物,因此当然可以改变。还应该理解,本文所使用的术语仅仅是为了描述具体实施方案的目的,且无意进行限制,因为本公开内容的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0044] 在提供值的范围的情况下,应当理解,也明确地公开了在该范围的上限和下限之间的每个插入值(至下限的单位的十分之一,除非上下文另外清楚地指明)。在所述范围内的任何所述值或插入值与所述范围内的任何其它所述值或插入值之间的每个更小范围被涵盖在本公开内容内。这些更小范围的上限和下限可以独立地在所述范围内包括或排除,并且每个范围(其中在所述更小范围内包括任一个限值、两个限值或不包含限值)也被涵盖在本公开内容内,具有在所述范围中的任何具体地排除的限制。在所述范围包括一个或两个限值的情况下,排除了那些被包含的限值中的任一个或两个的范围也被包括在本公开内容内。

[0045] 除非另外定义,否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料都可以用于实践或试验本公开内容,但是现在描述一些潜在的和优选的方法和材料。在本文中提及的所有出版物都通过引用并入本文,以公开和描述与所述出版物引用的对象有关的方法和/或材料。应当理解,在存在矛盾的情况下,本公开内容替代所并入的出版物的任何公开内容。

[0046] 正如本领域技术人员在阅读本公开内容以后会明白的,本文描述和解释的每个单独实施方案具有离散的组分和特征,所述组分和特征可以在不偏离本公开内容的范围或精

神的情况下容易地与其它几个实施方案中的任一个的特征分离或组合。任何提及的方法可以按提及的事件的顺序进行,或按逻辑上可行的任意其它顺序进行。

[0047] 在本文中讨论的出版物仅针对它们在本申请的提交日之前的公开内容而提供。本文中的任何内容均不应被解释为承认本公开内容由于先前出版物而丧失先于这样的出版物的资格。此外,提供的出版物的日期可能不同于实际的出版日期,后者可能需要独立地确认。

[0048] B. 定义

[0049] 在本说明书和所附权利要求中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数所指,除非上下文另外清楚地指示。因而,例如,对“一个细胞”的提及包括多个这样的细胞,并且对“所述肽”的提及包括对本领域技术人员已知的一种或多种肽及其等同物(例如多肽)等的提及。

[0050] 如在本说明书中所使用的,在本公开内容中使用术语“和/或”表示“和”或“或”,除非另外指出。

[0051] 贯穿本说明书,除非上下文另外要求,否则词语“包含”或变体诸如“包括”或“含有”表示包括所述的要素或整数、或者多个要素或整数的集合,但不排除任何其它要素或整数、或者多个要素或整数的集合。进一步,贯穿本说明书对数值范围的陈述具体地包括在之间的所有整数和小数点。

[0052] 贯穿本说明书,除非上下文另外要求,否则短语“基本上由……组成”表示所描述的组合物、方法或试剂盒的范围限于不会实质上影响本主题公开内容的基本和新颖特征的指定材料或步骤。例如,“基本上由所公开的序列组成”的配体结合结构域具有所公开的序列的氨基酸序列加上或减去在序列边界处的约5个氨基酸残基,例如比所列出的约束氨基酸残基少约5个残基、4个残基、3个残基、2个残基或约1个残基,或比所列出的约束氨基酸残基多约1个残基、2个残基、3个残基、4个残基或5个残基。

[0053] 贯穿本说明书,除非上下文另外要求,否则短语“由……组成”表示从所述组合物、方法或试剂盒排除在权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。例如,“由所公开的序列组成”的配体结合结构域仅由所公开的氨基酸序列组成。

[0054] 如在本申请中使用的,术语“约”和“大约”等同地使用。在本申请中使用的任何数字,不论有没有约/大约,都意在覆盖相关领域的普通技术人员所理解的任何正常波动。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”表示在所述参考值的任一个方向(大于或更小)落在25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小内的值的范围,除非另有说明或另外从上下文中显而易见(这样的数字会超过可能值的100%的情况除外)。

[0055] 本文中使用的术语“分离的”是指实质上或基本上不含有在其天然状态下发现通常伴随它的组分的物质。在某些实施方案中,术语“得到”或“衍生”与分离同义地使用。

[0056] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中互换地用于表示脊椎动物,诸如哺乳动物。哺乳动物可以是,例如,小鼠、大鼠、兔、猫、狗、猪、绵羊、马、非人灵长类动物(例如,食蟹猴、黑猩猩)或人。也涵盖在体内得到的或在体外培养的受试者的组织、细胞或其衍生物。人受试者可以是成年人、青少年、儿童(2岁至14岁)、婴儿(1个月至24个月)或新生儿(直到1个月)。在某些实施方案中,所述成年人是约65岁或更老或约60岁或更老的老年人。在某些实

施方案中,所述受试者是孕妇或意图怀孕的女性。

[0057] 术语“样品”表示一定体积和/或质量的要进行分析的生物学材料。在某些实施方案中,样品包括组织样品、细胞样品、流体样品等。在某些实施方案中,样品取自受试者(例如,人受试者)或由其提供。在某些实施方案中,样品包括取自任何内部器官、癌性、癌前或非癌性肿瘤、脑、皮肤、毛发(包括根)、眼、肌肉、骨髓、软骨、白色脂肪组织和/或褐色脂肪组织的组织的一部分。在某些实施方案中,流体样品包括口腔拭子、血液、脐带血、唾液、精液、尿液、腹水液、胸膜液、脊髓液、肺灌洗液、泪液、汗液等。本领域普通技术人员会明白,在某些实施方案中,“样品”是“原始样品”,因为其直接从来源(例如,受试者)获得。在某些实施方案中,“样品”是原始样品的加工的结果,例如所述加工为了除去某些潜在污染组分、分离某些组分和/或纯化某些感兴趣的组分。在某些实施方案中,样品是细胞或细胞(例如,神经元细胞)的群体。细胞样品可以直接衍生自受试者(例如,原始样品)或者可以是细胞系。细胞系可以包括非哺乳动物细胞(例如,昆虫细胞、酵母细胞和/或细菌细胞)或哺乳动物细胞(例如,永生化的细胞系)。

[0058] 本文中使用的“治疗”表示将组合物(例如,经工程改造的受体和/或结合剂)递送给受试者和/或细胞群体以影响生理学结果。在特定实施方案中,治疗导致一种或多种疾病症状的改善(例如,减少、减轻或修复)。所述改善可以是可观察的或可测量的改善,或者可以是受试者的健康状况的总体感受的改善。疾病的治疗可以表示疾病症状的严重程度的降低。在某些实施方案中,治疗可以表示将疾病症状的严重程度降低到与疾病发作之前的水平相当的水平。在某些实施方案中,治疗可以表示疾病症状的短期(例如,暂时或急性)和/或长期(例如,持续或慢性)减少。在某些实施方案中,治疗可以表示疾病症状的缓解。在某些实施方案中,治疗可以表示处于发生特定疾病的风险中的受试者的预防性治疗,以便预防疾病发展。预防疾病发展可以表示完全预防疾病症状,延迟疾病发作,减轻随后发展的疾病的症状的严重程度,或减少疾病发展的可能性。

[0059] 本文中使用的“管理”或“控制”表示使用本文所涵盖的组合物或方法来改善患有特定疾病的个体的生活质量。在某些实施方案中,本文描述的组合物和方法为遭受疼痛的受试者提供镇痛。

[0060] “治疗有效量”是达到期望的治疗结果所需的组合物的量。治疗有效量可以根据诸如、但不限于疾病状态以及受试者的年龄、性别和体重等因素而变化。通常,治疗有效量也是其中治疗有益效果超过组合物的任何毒性或有害作用的量。“治疗有效量”包括有效治疗受试者的组合物的量。

[0061] “增加”表示与参考或对照水平相比至少5%的值的增加(例如,增加的结合亲和力、增加的生理学应答、增加的治疗效果等)。例如,增加可以包括5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、500%、1000%或更多的增加。增加还意指比参考或对照水平高1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)的增加。

[0062] “减少”、“降低”、“减小”或其同义词表示与参考或对照水平相比至少5%的值的减少(例如,减少的结合亲和力、减少的生理学应答、减少的治疗效果、受试者中疼痛的减少等)。例如,减少可以包括5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、500%、1000%或更多的减

少。减少还意指比参考或对照水平低1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)的减少。

[0063] “维持”、“保留”、“保持”或“无变化”或“无实质性变化”或“无实质性减少”通常表示,与媒介物或对照分子/组合物引起的效果相当的生理学和/或治疗效果。相当的应答是与参考应答没有显著差异或可测量的差异的应答。

[0064] 术语“参考”或“对照”水平在本文中可互换地使用,并且表示在未用本文描述的组合物治疗的受试者或样品中或在已经用媒介物对照治疗的受试者或样品中的特定生理学和/或治疗效果的值。在某些实施方案中,参比水平表示在施用本文描述的组合物之前在受试者或样品中测量的特定生理学和/或治疗效果的值(例如,基线水平)。

[0065] 本文中使用的“配体”表示结合另一种较大分子的分子。在某些实施方案中,所述配体结合受体。在某些实施方案中,所述配体与所述受体的结合会改变所述受体的功能——以活化或抑制其功能。在某些实施方案中,所述配体与受体诸如配体门控离子通道(LGIC)的结合会导致所述离子通道的打开或关闭。

[0066] “受体-配体结合”和“配体结合”在本文中可互换地使用,并且表示受体(例如, LGIC)与配体之间的物理相互作用。本文中使用的术语“配体”可以表示内源性的或天然存在的配体。例如,在某些实施方案中,配体表示神经递质(例如, λ -氨基丁酸(GABA)、乙酰胆碱、血清素等)和信号传递中间体(例如,4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP_2)),氨基酸(例如,甘氨酸)或核苷酸(例如,ATP)。在某些实施方案中,配体可以表示非天然的、即合成的或非天然存在的配体(例如,结合剂)。例如,在某些实施方案中,配体表示小分子。通过本领域已知的多种方法(例如,检测与放射性地标记的配体的缔合),可以测量配体结合。

[0067] “结合亲和力”通常表示受体的单个结合位点与配体之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指出,否则本文中使用的“结合亲和力”表示反映结合对(例如,受体和配体)的成员之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对它的配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(K_d)表示。通过本领域已知的常见方法(包括本文描述的那些),可以测量亲和力。

[0068] 术语“特异性结合亲和力”或“特异性结合”在本说明书和权利要求书中互换使用,并且表示在成对的分子物质(例如,受体和配体)之间发生的结合。当所述两种物质的相互作用产生非共价结合的复合物时,发生的结合通常是静电结合、氢键合的结合或亲脂相互作用的结果。在不同的实施方案中,一种或多种物质之间的特异性结合是直接的。在一个实施方案中,特异性结合的亲和力比背景结合(非特异性结合)大了约2倍、比背景结合大了约5倍、比背景结合大了约10倍、比背景结合大了约20倍、比背景结合大了约50倍、比背景结合大了约100倍或比背景结合大了约1000倍或更多。

[0069] “信号传递”表示由于配体与受体的结合(例如,由于结合剂与本文描述的经工程改造的受体的结合)而引起的生化或生理学应答。

[0070] 术语“野生型”或“天然的”是技术人员理解的本领域的术语,并且是指不同于突变体或变体形式的在自然界中发生的生物体、菌株、基因、蛋白或特征的典型形式。例如,野生型蛋白是在自然界中发生的该蛋白的典型形式。

[0071] 术语“非天然的”、“变体”和“突变体”在本说明书和权利要求书中互换使用以表示天然的或野生型组合物的突变体,例如与天然的或野生型序列具有小于100%序列同一性

的变体多肽。

[0072] 氨基酸修饰可以是氨基酸置换、氨基酸缺失和/或氨基酸插入。氨基酸置换可以是保守的氨基酸置换或非保守的氨基酸置换。保守替换(也称为保守突变、保守置换或保守变异)是这样的蛋白的氨基酸置换:其将给定的氨基酸变成具有类似生化性能(例如电荷、疏水性和大小)的不同氨基酸。本文中使用的“保守变异”表示将一个氨基酸残基用另一种生物学上类似的残基替换。保守变异的例子包括:一个疏水残基诸如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸置换另一个疏水残基;或一个极性残基置换另一个极性残基,诸如精氨酸置换赖氨酸、谷氨酸置换天冬氨酸、或谷氨酰胺置换天冬酰胺等。保守置换的其它示例性例子包括以下变化:丙氨酸变为丝氨酸;精氨酸变为赖氨酸;天冬酰胺变为谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸盐变为谷氨酸盐;半胱氨酸变为丝氨酸;谷氨酰胺变为天冬酰胺;谷氨酸盐变为天冬氨酸盐;甘氨酸变为脯氨酸(praline);组氨酸变为天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸变为亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸变为缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸变为精氨酸,谷氨酰胺,或谷氨酸盐;甲硫氨酸变为亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸变为酪氨酸,亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸变为苏氨酸;苏氨酸变为丝氨酸;色氨酸变为酪氨酸;酪氨酸变为色氨酸或苯丙氨酸;缬氨酸变为异亮氨酸或亮氨酸,等。

[0073] 术语“亲本”或“起始”在本说明书和权利要求书中互换使用以表示最初的组合物或蛋白,其被突变、修饰或衍生化,以建立具有新颖性能的经工程改造的组合物。在某些实施方案中,所述亲本蛋白是嵌合蛋白。

[0074] 术语“经工程改造的”在本说明书和权利要求书中用于表示非天然存在的组合物或蛋白,其具有与其来源亲本组合物或蛋白不同的性能。

[0075] 一般而言,“序列同一性”或“序列同源性”分别表示两个多核苷酸或多肽序列的核苷酸与核苷酸或氨基酸与氨基酸的对应关系。通常,用于确定序列同一性的技术包括:确定多核苷酸的核苷酸序列和/或确定由其编码的氨基酸序列,并将这些序列与第二个核苷酸或氨基酸序列进行对比。两个或多个序列(多核苷酸或氨基酸)可以通过确定其“同一性百分比”来进行对比。两个序列(无论是核酸序列还是氨基酸序列)的同一性百分比是两个比对序列之间的精确匹配数目除以较短序列的长度并且乘以100。例如,通过使用可从国立卫生研究院(National Institutes of Health)获得的高级BLAST计算机程序(包括版本2.2.9)对比序列信息,也可以确定同一性百分比。BLAST程序是基于Karlin和Altschul, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268(1990)的比对方法,并且如在以下文献中所讨论:Altschul, 等人, J.Mol.Biol.215:403-410(1990);Karlin和Altschul, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877(1993);和Altschul等人, Nucleic Acids Res.25:3389-3402(1997)。简而言之,BLAST程序将同一性定义为相同的比对符号(通常为核苷酸或氨基酸)的数目除以两个序列中的较短者中的符号的总数。该程序可以用于确定在所对比的蛋白的整个长度上的同一性百分比。提供默认参数以优化用短查询序列的搜索,例如用blastp程序。该程序还允许使用SEG过滤器屏蔽查询序列的区段,如通过Wootton和Federhen, Computers and Chemistry 17:149-163(1993)的SEG程序所确定的。期望的序列同一性程度的范围为大约80%到100%以及插入的整数值。通常,公开的序列与要求保护的序列之间的同一性百分比为至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%。

[0076] 本文中使用的“基本上相同的”表示具有85%或更多、例如90%或更多、例如95%、

96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或100%的序列同一性,其中所述组合物的活性不会被导致序列同一性差异的序列修饰改变。

[0077] 本文中使用的术语“启动子”表示指导可操作地连接的核酸的转录的一个或多个核酸控制序列。启动子可以包括在转录起始位点附近的核酸序列,诸如TATA元件。启动子还可以包括可以被转录因子结合的顺式作用多核苷酸序列。“组成型”启动子是在大多数环境和发育条件下有活性的启动子。“诱导型”启动子是在环境或发育调节下有活性的启动子。术语“可操作地连接”表示在核酸表达控制序列(诸如启动子、或转录因子结合位点的阵列)和第二核酸序列之间的功能连接,其中所述表达控制序列指导与第二序列对应的核酸的转录。

[0078] 本文中使用的术语“病毒性载体”、“病毒载体”或“基因递送载体”表示作为核酸递送媒介物起作用的病毒颗粒,并且其包含被包装在病毒粒子内的核酸(例如,AAV表达盒)。本公开内容的示例性病毒载体包括腺病毒载体、腺相关病毒载体(AAV)、慢病毒载体和逆转录病毒载体。

[0079] 本文中使用的“神经元活性”、“神经元的活性”、“神经元点火”及其变体和同义词表示由神经元的刺激或激发引起的电活动性。在某些实施方案中,使用自动化的或手工的膜片箝技术测量神经元活性。在某些实施方案中,确定神经元活性包括确定兴奋性突触后电位(EPSP)、抑制性突触后电位(IPSP)和/或神经元的动作电位。在某些实施方案中,神经元的活性水平依赖于兴奋性突触后电位(EPSP)、抑制性突触后电位(IPSP)和/或动作电位,或者受兴奋性突触后电位(EPSP)、抑制性突触后电位(IPSP)和/或动作电位影响。

[0080] 本文中使用的“神经学疾病”或“神经学障碍”表示神经系统的疾病或障碍。在某些实施方案中,所述神经学疾病与脑、脊髓、神经或神经系统的任何组分中的结构、生化和/或电异常有关,由所述异常造成,或起因于所述异常。

[0081] 本文中使用的疾病的“征象”表示被视为指示疾病状况的身体或心理特征。在某些实施方案中,征象是疾病的客观指征。在某些实施方案中,由患者以外的人(诸如医生)客观地评价、检查、观察或测量征象。

[0082] 本文中使用的疾病的“症状”表示被视为指示疾病状况的身体或心理特征,特别是患者显而易见的这样的特征。在某些实施方案中,所述症状由患者主观地评价。例如,在某些实施方案中,所述症状是疼痛。

[0083] 本文中使用的“效能”表示产生蛋白(诸如LGIC)的特定活性水平所需的配体的量。在某些实施方案中,蛋白(诸如LGIC)的活性表示离子通道的打开或关闭。在某些实施方案中,确定效能包括确定在特定条件下蛋白(诸如LGIC)对配体的半数最大有效浓度(EC50)。EC50表示在特定暴露时间以后诱导基线和最大值之间的部分应答的配体的浓度。

[0084] 本文中使用的“效力”表示在有配体存在下蛋白(诸如LGIC)的活性的量度。在某些实施方案中,效力表示在特定条件下,诸如在有特定浓度的配体存在下,穿过LGIC的电流的量。在某些实施方案中,确定效力包括确定穿过受体的电流的量,和/或受体的基本电流强度。

[0085] 本文中使用的“应答性”表示在有配体存在下蛋白(诸如LGIC)的总功能的量度。确定应答性可以包括确定和考虑一种或多种因素,诸如蛋白的效能、效力和亚细胞定位。

[0086] C.经工程改造的受体

[0087] 本公开内容涉及经工程改造的受体、经工程改造的受体突变体及其使用方法。本文中使用的术语“受体”表示位于细胞的表面上并且可以介导向细胞和/或自细胞的信号传递的任何蛋白。术语“经工程改造的受体”在本文中用于表示已经经过实验改变使得其在物理上和/或在功能上不同于对应的亲本受体的受体。在某些实施方案中,所述亲本受体是野生型受体。术语“野生型受体”在本文中用于表示具有与在自然界中发现的蛋白的多肽序列相同的多肽序列的受体。野生型受体包括天然存在于人类中的受体以及天然存在于其它真核生物(例如原生生物、真菌、植物或动物,例如酵母、昆虫、线虫、海绵、哺乳动物、非哺乳动物脊椎动物)中的直系同源物。在某些实施方案中,所述亲本受体是非天然受体;也就是说,它是在自然界中不存在的受体,例如,从野生型受体工程改造而来的受体。例如,亲本受体可以是包含来自一种野生型受体的一个或多个亚基和来自第二种野生型受体的一个或多个亚基的经工程改造的受体。因此,所得的蛋白包含来自两种或更多种野生型受体的亚基。因此,在某些实施方案中,所述亲本受体是嵌合受体。本公开内容的经工程改造的受体包括例如亲本受体、亲本受体突变体和开关受体。

[0088] 在某些方面,本公开内容的经工程改造的受体包含相对于对应的亲本受体的至少一个氨基酸突变,例如,在野生型受体的一个或多个结构域中的一个或多个突变。“氨基酸突变”意指氨基酸序列相对于对应的亲本序列的任何差异,例如氨基酸置换、缺失和/或插入。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体与对应的亲本受体共享约99%、约98%、约95%、约90%、约85%、约80%、约70%、约60%、约50%或更少的序列同一性,包括位于之间的所有值和子范围。在某些实施方案中,所述亲本受体突变体与对应的亲本受体具有85%或更多的序列同一性,例如,90%或更多或95%或更多,例如,与对应的亲本受体具有约96%、约97%、约98%或约99%同一性,包括位于之间的所有值和子范围。在某些实施方案中,通过易错PCR产生经工程改造的受体(例如,亲本受体突变体)。

[0089] 在某些实施方案中,所述氨基酸突变是相对于对应亲本受体的功能缺失氨基酸突变。“功能缺失”氨基酸突变表示这样的—个或多个突变:其相对于亲本受体降低、基本上减少或消除经工程改造的受体的功能,例如通过相对于内源性配体与亲本受体的结合降低内源性配体与经工程改造的受体的结合,或通过降低在经工程改造的受体下游的一个或多个信号传递途径的活性,所述信号传递途径通常响应于结合剂与对应的亲本受体的结合而活化。

[0090] 在某些实施方案中,所述氨基酸突变是相对于对应亲本受体的功能获得氨基酸突变。“功能获得”氨基酸突变表示这样的—个或多个突变:其相对于亲本受体改变经工程改造的受体的功能,例如通过相对于内源性配体与亲本受体的结合改变或增强经工程改造的受体对结合剂的亲和力,或通过相对于内源性配体与对应的亲本受体的结合改变或增强信号传递途径的活性,所述信号传递途径响应于结合剂与经工程改造的受体的结合而活化。在某些实施方案中,功能获得突变导致经工程改造的受体对结合剂的亲和力增加。在特定实施方案中,功能获得突变导致经工程改造的受体对激动剂结合剂的亲和力增加。在某些实施方案中,功能获得突变导致拮抗剂结合剂在与经工程改造的受体结合后充当激动剂结合剂(例如,导致激动剂信号传递途径而不是拮抗剂信号传递途径的活化)。在某些实施方案中,功能获得突变导致调节剂结合剂在与经工程改造的受体结合后充当激动剂结合剂。在某些实施方案中,本公开内容的主题经工程改造的受体包含相对于对应亲本受体的一个

或多个功能缺失氨基酸突变和一个或多个功能获得氨基酸突变。

[0091] 在某些实施方案中,功能缺失突变和功能获得突变处于相同残基处,即它们是相同突变。在其它实施方案中,功能缺失突变和功能获得突变是在不同氨基酸残基处的突变。在某些实施方案中,包含功能缺失突变和/或功能获得突变的主题经工程改造的受体与对应的亲本受体(例如野生型受体或非天然受体)共享约99%、约98%、约95%、约90%、约85%、约80%、约70%、约60%、约50%或更少的序列同一性。在某些实施方案中,所述主题经工程改造的受体与对应的亲本受体共享85%或更多的序列同一性,例如85%、90%或95%或更多的序列同一性,在某些情况下96%、97%、98%或更多的序列同一性,例如99%或99.5%或更多的序列同一性,包括位于之间的所有值和子范围。

[0092] 在某些方面,本公开内容的经工程改造的受体包括由一个或多个氨基酸序列的组合产生的受体,例如来自一种野生型受体的亚基与一个或多个氨基酸序列,例如来自第二种野生型受体的亚基。换言之,经工程改造的受体包含彼此异源的氨基酸序列,其中“异源”意指不在自然界中一起出现。这样的受体在本文中被称作“嵌合受体”。在某些实施方案中,嵌合受体充当从其产生本公开内容的经工程改造的受体的亲本受体。

[0093] 在某些实施方案中,亲本受体突变体表现出增加的对激动剂结合剂的亲和力。在某些实施方案中,在与野生型受体结合时充当拮抗剂或调节剂的配体或结合剂在与亲本受体突变体结合时充当激动剂。

[0094] 在某些实施方案中,所述经工程改造的受体是“配体门控的离子通道”或LGIC。LGIC表示在被特异性配体(例如,化学剂或结合剂)活化后允许离子穿过的一大组跨膜蛋白。LGIC由至少两个结构域组成:配体结合结构域和跨膜离子孔结构域。配体与LGIC的结合会导致LGIC的活化和离子孔的打开。配体结合会造成通道对一种或多种特定离子的渗透率的剧烈变化;当通道无活性或关闭时,基本上没有离子可以穿过通道,但是在配体结合后每秒多达 10^7 个离子可以穿过。在某些实施方案中,LGIC对胞外配体(例如,神经递质)做出应答并促进离子向胞质溶胶中的流入。在某些实施方案中,LGIC对胞内配体(例如,核苷酸诸如ATP和信号传递中间体诸如 PIP_2)做出应答并促进离子从胞质溶胶向胞外环境中的流出。重要的是,LGIC的活化导致离子(例如, Ca^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 等)跨细胞膜的运输,且不导致配体本身的运输。

[0095] LGIC受体包含多个亚基并且可以是同聚体受体或异聚体受体。同聚体受体包含全部是相同类型的亚基。异聚体受体包含这样的亚基:其中至少一个亚基不同于在受体内包含的至少一个其它亚基。例如,甘氨酸受体包含5个亚基,其中有两种类型: α -亚基,其中有四个异形体(α_1 - α_4);和 β -亚基,其中有单个已知的异形体。一种示例性的同聚体GlyR是包含5个 α_1 -GlyR亚基的GlyR。类似地,同聚体 GABA_A 受体可以包含 β_3 - GABA_A 亚基,并且nAChR受体可以包含 α_7 -nAChR亚基。一种示例性的异聚体GlyR可以包含一个或多个 α -亚基和一个或多个 β -亚基(例如, $\alpha_1\beta$ -GlyR)。在表1中示出了实施例LGIC受体的亚基。

[0096] 表1:LGIC受体和亚基

[0097]

受体	亚基	亚基异形体
GlyR	GLRA1	
	GLRA2	
	GLRB	
5HT ₃	5-HT3A	
	5-HT3B	
	5-HT3C	
	5-HT3D	
	5-HT3E	
nAChR	α	$\alpha 1$
		$\alpha 2$
		$\alpha 3$
		$\alpha 4$
		$\alpha 5$
		$\alpha 6$
		$\alpha 7$
		$\alpha 8$
		$\alpha 9$

[0098]

受体	亚基	亚基异形体
		$\alpha 10$
	β	$\beta 1$
		$\beta 2$
		$\beta 3$
		$\beta 4$
	γ	γ
	δ	δ
	ε	ε
GABA _A	α	$\alpha 1$
		$\alpha 2$
		$\alpha 3$
		$\alpha 4$
		$\alpha 5$
GABA _A	α	$\alpha 6$
	β	$\beta 1$
		$\beta 2$
		$\beta 3$
	γ	$\gamma 1$
		$\gamma 2$
		$\gamma 3$
	δ	δ
	ε	ε
	π	π
	ρ	$\rho 1$
		$\rho 2$
		$\rho 3$
P2X	P2X1	
	P2X2	
	P2X3	
	P2X4	
	P2X5	
	P2X6	
	P2X7	

[0099]

受体	亚基	亚基异形体
KCNQ	α	K _v α 1
		K _v α 2
		K _v α 3
		K _v α 4
		K _v α 5
		K _v α 6
		K _v α 7
		K _v α 8
		K _v α 9
		K _v α 10
		K _v α 11
		K _v α 12
	β	K _v β 1
		K _v β 2
		K _v β 3
		minK
		MiRP1
		MiRP2
		MiRP3
		KCNE1-样
		KCNIP1
		KCNIP2
		KCNIP3
		KCNIP4

[0100] 适合用在特定实施方案中的LGIC家族的示例性例子包括、但不限于Cys-环受体诸如甘氨酸受体 (GlyR)、血清素受体 (例如, 5-HT₃受体)、 λ -氨基丁酸A (GABA-A) 受体和烟碱乙酰胆碱受体 (nAChR); 以及酸感知 (质子门控的) 离子通道 (ASIC)、上皮钠通道 (ENaC)、离子型谷氨酸受体、IP₃受体、P₂X受体、兰尼碱受体和锌活化通道 (ZAC)。

[0101] 适合用于与本文所述的方法一起使用的LGIC的具体非限制性例子包括: HTR3A; HTR3B; HTR3C; HTR3D; HTR3E; ASIC1; ASIC2; ASIC3; SCNN1A; SCNN1B; SCNN1D; SCNN1G; GABRA1; GABRA2; GABRA3; GABRA4; GABRA5; GABRA6; GABRB1; GABRB2; GABRB3; GABRG1; GABRG2; GABRG3; GABRD; GABRE; GABRQ; GABRP; GABRR1; GABRR2; GABRR3; GLRA1; GLRA2; GLRA3; GLRA4; GLRB; GRIA1; GRIA2; GRIA3; GRIA4; GRID1; GRID2; GRIK1; GRIK2; GRIK3; GRIK4; GRIK5; GRIN1; GRIN2A; GRIN2B; GRIN2C; GRIN2D; GRIN3A; GRIN3B; ITPR1; ITPR2; ITPR3; CHRNA1; CHRNA2;

CHRNA3; CHRNA4; CHRNA5; CHRNA6; CHRNA7; CHRNA9; CHRNA10; CHRNB1; CHRNB2; CHRNB3; CHRNB4; CHRNG; CHRND; CHRNE; P2RX1; P2RX2; P2RX3; P2RX4; P2RX5; P2RX6; P2RX7; RYR1; RYR2; RYR3; 和ZACN。

[0102] TRPV1、TRPM8和P2X₂是共享结构特征以及门控原理的大LGIC家族的成员。例如,类似于TRPV1的TRPV4也是由热而不是由辣椒辣素触发;并且P2X₃是由ATP触发,但比P2X₂更快脱敏。因此,TRPV1、TRPM8和P2X_n是适合用于特定实施方案的LGIC的非限制性例子。

[0103] 在一个实施方案中,所述经工程改造的受体是TRPV1或TRPM8受体或其突变蛋白。TRPV1和TRPM8是由周围神经系统的感受伤害的神经元表达的辣椒素和薄荷醇受体。认为两个通道作为非选择性的、钠和钙可渗透的同源四聚体起作用。另外,两个通道和它们的主要激动剂——分别是辣椒辣素和冷却化合物(诸如薄荷醇)——几乎不存在于中枢神经系统中。辣椒辣素和一些冷却化合物(包括薄荷醇和icilin)含有光不稳定的封闭基团的潜在受体位点。光不稳定的封闭基团与这样的受体的缔合将产生配体门控的离子通道,其中光通过释放活性配体而充当间接触发物。

[0104] 在一个实施方案中,所述经工程改造的受体是P2X₂受体或其突变蛋白。P2X₂是通过其慢脱敏速率来区分的ATP-门控的非选择性阳离子通道。P2X₂可以用作去极化电流的选择性可寻址源并且呈现用于产生完全缺乏天然激动剂的经工程改造的通道-配体组合的平台。

[0105] 可用于产生本公开内容的经工程改造的受体的野生型LGIC受体的序列的非限制性例子包括以下。在序列中,信号肽是斜体,配体结合结构域是粗体,且离子孔结构域带下划线:

[0106] 在某些实施方案中,所述野生型LGIC受体是人 $\alpha 1$ 甘氨酸受体(GlyR $\alpha 1$) (GenBank登记号NP_001139512.1,SEQ ID NO:2),其由GLRA1基因 (GenBank登记号NM_001146040.1 (SEQ ID NO:1) 编码:

(a) *MYSFNTLRRLYLWETIVFFSLAASKEAEAARSAPKPMSPSDFLDKLM*
GRTSGYDARIRPNFKGPPVNVSCNIFINSFGSIAETTM DYRVNIFLRQQ
WNDPRLAYNEYPDDSLDLDP SMLDSIWKPDLFFANEKGAHFHEITTD
NKLLRISRNGNVLYSIRITLTLACPMDLKNFPM DVQTCIMQLESFGYT
MNDLIFEWQE QGAVQVADGLTLPQFILKEEKDLRYCTKH YNTGKFT
CIEARFHLE RQMGYYLIQMYIPSL LILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT
VLTM TTQSSGSRASLPKVS YVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN FVSR
QHKELLRFRRKR RHHKSPMLNLFQE DEAGEGRFNFSAYGMGPAC LQAK
DGISVKGANNSNTTN PPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMA FLI
FNMFYWIIYKIVRREDVHNO (SEQ ID NO:2)。

[1019] 在某些实施方案中,所述野生型LGIC受体是人烟碱胆碱能受体 $\alpha 7$ 亚基($\alpha 7$ -nAChR)(GenBank登记号NP_000737.1,SEQ ID NO:4),其由CHRNA7基因(GenBank登记号NM_000746.5(SEQ ID NO:3)编码:

(a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVS LQGEFQRKLYKELVKNYNPLERP V
ANDSQPLTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLT TNIW LQMSWTDHYLQWN
VSEYPGVKTVRFPDGGIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGH
CQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPPDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQ
EADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYDPVTFTVTMRRTL
[0110] YYGLNLLIPCVLISALALLVFLLPADSGEKISLGITVLLSLTVFMLLVAEIM
PATSDSVPLIAQYFASTMIIVGLSVVVTIVVLQYHHHDPDGGKMPKWTRV
ILLNWCAWFLRMKRPGEDKVRPACQHKQRRCSLASVEMSAVAPPPASN
GNLLYIGFRGLDGVHCVPTPD SGVVCGRMACSPTHDEHLLHGGQPPEGD
PDLAKILEEVRYIANRFRQCDESEAVCSEWKFAACVVDRLCLMAFSVFTII
CTIGILMSAPNFVEAVSKDFA (SEQ ID NO:4)。*

[0111] 在某些实施方案中,所述野生型LGIC受体是人5-羟基色胺受体3A (5HT3A, GenBank 登记号NP_998786.2, SEQ ID NO:6), 其由HTR3A基因 (GenBank登记号NM_213621.3, SEQ ID NO:5) 编码:

(a) *MLGKLAMLLWVQQALLALLPTLLAQGEARRSRNTTRPALLRLS
DYLLTNYRKGV RPVRDWRKPTTVSIDVIVYAILNVDEKNQVLT TYIW
YRQYWTDEFLQWNPEDFDNITKLSIPTDSIWVPDILINEFVDVGKSPNI
PYVYIRHQGEVQNYKPLQVVTACSLDIYNFPFDVQNC SLTFTSWLHTI
QDINISLWRLPEKVKSDRSVFMNQGEWELLGVLPYFREFSMESSNYY
[0112] AEMKFYVVIRRRPLFYVVSLLLPSIFLMVMDIVGFYLPNSGERVSFKITL
LLGYSVFLIIVSDTLPAT AIGTPLIGKAPPGSRAQS GEKPAPSHLLHVSLAS
ALGCTGVYFVVC MALLVISLAETIFIVRLVHKQDLQQP VPAWLRHLVLER
IAWLLCLREQSTSQRPPATSQATKTDDCSAMGNHCSHMGGPQDFEKS PR
DRCSPPPPPREASLAVCGLLQELSSIRQFLEKRDEIREVARDWLRVGSVLD
KLLFHIYLLAVLAYSITLVMLWSIWQYA (SEQ ID NO:6)。*

[0113] 在某些实施方案中,所述野生型LGIC受体是人5-羟基色胺受体3B (5HT3B GenBank 登记号NP_006019.1, SEQ ID NO:57), 其由HTR3B基因 (GenBank登记号NM_006028.4, SEQ ID NO:56) 编码:

(a) *MLSSVMAPLWACILVAAGILATDTHHPQDSALYHLSKQLLQKYH
KEVRPVYNWTKATTVYLDL FVHAILDVDAENQILKTSVWYQEVWND
EFLSWNSSMFDEIREISLPLSAIWAPDIIINEFVDIERYPDL PYVYVNSS
GTIENYKPIQVVSACSLETYAFPFDVQNC SLTFKSILHTVEDVDLAFLR
SPEDIQHDKKAFLNDSEWELL SVSSTYSILQSSAGGFAQIQFNVMRR
[0114] HPLVYVVSLLIPSIFLMLVDLG SFYLPNCRARIVFKTSVLVGYTVFRVNM
SNQVPRSVGSTPLIGHFFTICMAFLVLSLAKSIVLVKFLHDEQRGGQE QPF
LCLRGDTDADRPRVEPRAQRAVVTESSLYGEHLAQPGTLKEVWSQLQSI
SNYLQTQDQTDQQEAEWLVLLSRFDRL LFQSYLFMLGIYTITLCSLWAL
WGGV (SEQ ID NO:57)。*

[0115] 在某些实施方案中,所述野生型LGIC受体是人 γ -氨基丁酸受体A (GABA-A)、亚基 β -3 (GABA-A β 3) (GenBank登记号NP_000805.1,SEQ ID NO:8),其由GABRB3基因 (GenBank登记号NM_000814.5,SEQ ID NO:7) 编码:

(a) **MWGLAGGRLFGIFSAPVLVAVVCCAQSVNDPGNMSFVKETVDKL
LKGYDIRLRPDFGGPPVCVGMNIDIASIDMVSEVNMDYTLTMYFQQY
WRDKRLAYSGIPLNLTLDNRVADQLWVPDITYFLNDKKS FVHGVTVK
NRMIRLHPDGT VLYGLRITTTAACMMDLRRYPLDEQNCTLEIESYGY
TTDDIEFYWRGGDKAVTGVERIELPQFSIVEHRLVSRNVVFATGAYP
RLSLSFRLKRNIGYFILQTYMPSILITLSWVSFWINYDASAARVALGITT
VLTMTTINTHLRETLPKIPYVKAIDMYLMGCFVFVFLALLEYAFVNYIFFG
RGPQRQKKLAEKTA KAKNDRSKSES NRVD AHGNILLTSLEVHNEMNEVS
GGIGDTRNSAISFDNSGIQYRKQSMPEGHGRFLGDRSLPHKKTHLRRRS
SQLKIKIPDLTDVNAIDRWSRIVFPFTFSLFNLVYWLYYVN (SEQ ID NO:8)。**

[0117] 在某些实施方案中,所述野生型LGIC受体是人GABA-A,亚基rho1 (ρ 1) (GABA-A ρ 1) (GenBank登记号NP_002033.2,SEQ ID NO:10),其由GABRR1基因 (GenBank登记号NM_002042.4,SEQ ID NO:9) 编码:

(a) **MLAVPNMRFGIFLLWWGWVLATESRMHWP GREVHEMSKKGRP
QRQRREVHEDAHKQVSPILRRSPDITKSPLTKSEQLLRIDDHDFSMRP
GFGGPAIPVGVDVQVESLDSISEVDMDFMTLYLRHYWKDERLSFPS
TNNLSMTFDGRLVKKIWVPDMFFVHRSKRSFIHDTTTDNVMLRVQPD
GKVLYSRLRVTVTAMCNMDFSRFPLDTQTCSLEIESYAYTEDDLMLY
WKKGNDSLKTDERISLSQFLIQEFHTTTKLAFYSSTGWYNRLYINFTL
RRHIFFFLLQTYFPATLMVMLSWVSFWIDRRV PARVPLGITT VLTMTSTII
TGVNASMPRVSYIKAVDIYLWVSFVFVFLSVLEYAAVNYLT TVQERKEQ
KLREKL PCTSGLP PRTAMLDGNYS DGEVNDLDNYMPENGEKPDRMMV
QLTLASERSSPQRKSQRSSYVSMRIDTHAIDKYSRIIFPAAYILFNL IYWSIF
S (SEQ ID NO:10)。**

[0120] 在某些实施方案中,所述野生型LGIC受体是人GABA-A,亚基rho2 (ρ 2) (GABA-A ρ 2) (GenBank登记号NP_002034.3,SEQ ID NO:12),其由GABRR2基因 (GenBank登记号NM_002043.4,SEQ ID NO:11) 编码:

[0121] (a) **MPYFTRLILFLFCLMVLVESRKPKRKRWTGQVEMPKPSHLYKK**
NLDVTKIRKGGKQQLLRVDEHDFSMRPAFGGPAIPVGVDVQVESLDS
ISEVDMDFMTMTLYLRHYWKDERLAFSSASNKSMTFDGRLVKKIWVP
DVFFVHSKRSTHDTTDDNIMLRVFPDGHVLYSMRITVTAMCNMDFS
HFPLDSQTCSLELESYAYTDEDLMLYWKNNGDESLKTDEKISLSQFLIQ
KFHSTSLAFYSSTGWYNRLYINFTLRRHIFFFLLQTYFPATLMVMLS
WVSFWIDRRRAVPARVSLGITTTLTMTTITGVNASMPRVSYVKAVDIYLW
VSVFVFLSVLEYAAVNYLTTVQERKERKLREKFPCMCGMLHSLTMMML
DGSYSESEANSLAGYPRSHILTEERQDKIVVHLGLSGEANAARKKGLLK
GQTGFRIFQNTHAIDKYSRLIFPASYIFFNLIYWSVFS (SEQ ID NO:12)。

[0122] 在某些实施方案中,所述野生型LGIC受体是人GABA-A,亚基rho3 ($\rho 3$) (GABA-A $\rho 3$) (GenBank登记号NP_001099050.1,SEQ ID NO:14),其由GABRR3基因 (GenBank登记号NM_001105580.2,SEQ ID NO:13) 编码:

[0123] (a) **MVLAFQLVSFTYIWIILKPNVCAASNIKMTHQRCSSSMKQTCKQE**
TRMKKDDSTKARPQKYEQLLHIEDNDFAMRPGFGGSPVPVGIDVHV
ESIDSISETNMDFTMTFYLRHYWKDERLSFPSTANKSMTFDHRLTRKI
WVPDIFFVHSKRSTFIHDTTMENIMLRVHPDGNVLLSLRITVSAMCFM
DFSRLPLDTQNCSELESYAYNEDDLMLYWKHGNKSLNTEEHMSLS
QFFIEDFSASSGLAFYSSTGWYNRLFINFVLRRHVFFFLQTYFPAILM
VMLSWVSFWIDRRRAVPARVSLGITTTLTMTSTITAVSASMPQVSYLKAVD
VYLWVSSLFVFLSVIEYAAVNYLTTVVEERKQFKKTGKISRMYNIDAVQA
MAFDGCYHDSEIDMDQTSLSLNSDFMRRKSICSPSTDSSRIKRRKSLGG
HVGRIILENNHVIDTYSRILFPIVYILFNLFYWGVIYV (SEQ ID NO:14)。

[0124] 在某些方面,主题经工程改造的受体是嵌合受体。在某些实施方案中,所述嵌合受体包含来自至少在第一LGIC处的配体结合结构域序列以及离子孔传导结构域序列,或更简单地,来自至少第二LGIC的“离子孔结构域序列”。在某些实施方案中,第一LGIC和第二LGIC是Cys-环受体。Cys-环受体的配体结合结构域序列和离子孔结构域序列是本领域众所周知的,并且可以通过使用公众可得到的软件 (例如PubMed、Genbank、Uniprot等) 从文献中容易地鉴别。在以上描述的序列中,配体结合结构域是粗体,且离子孔结构域带下划线。

[0125] 在某些实施方案中,所述嵌合受体的配体结合结构域包含人甘氨酸受体的配体结合结构域序列。在某些实施方案中,所述人甘氨酸受体是人GlyR $\alpha 1$ (SEQ ID NO:2)。在某些这样的实施方案中,所述配体结合结构域包含GlyR $\alpha 1$ 的约氨基酸29-235,例如SEQ ID NO:2的氨基酸29-235、氨基酸29-240、氨基酸29-246、氨基酸29-248、氨基酸29-250或氨基酸29-252。在某些这样的实施方案中,所述配体结合结构域基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸29-235组成,基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸29-240组成,基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸29-246组成,基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸29-248组成,基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸29-250组成,基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸29-252组成。在某些实施方案中,所述离子孔结构域序列来自除人GlyR $\alpha 1$ 以外的Cys-环受体。

[0126] 在某些实施方案中,所述嵌合受体的配体结合结构域包含人烟碱胆碱能受体的配

体结合结构域序列。在某些实施方案中,所述人烟碱胆碱能受体是人 $\alpha 7$ -nAChR。在某些这样的实施方案中,所述配体结合结构域包含 $\alpha 7$ -nAChR (SEQ ID NO:4) 的约氨基酸23-220,例如SEQ ID NO:4的氨基酸23-220、氨基酸23-226、氨基酸23-229、氨基酸23-230,在某些情况下氨基酸23-231。在某些这样的实施方案中,所述配体结合结构域基本上由SEQ ID NO:4的氨基酸23-220组成,基本上由SEQ ID NO:4的氨基酸23-226组成,基本上由SEQ ID NO:4的氨基酸23-229组成,基本上由SEQ ID NO:4的氨基酸23-230组成,或基本上由SEQ ID NO:4的氨基酸23-231组成。在某些实施方案中,所述离子孔结构域序列来自除人 $\alpha 7$ -nAChR以外的Cys-环受体。

[0127] 在某些实施方案中,所述嵌合受体的配体结合结构域包含人血清素受体的配体结合结构域序列。在某些实施方案中,所述人血清素受体是人5HT3A或5HT3B。在某些这样的实施方案中,所述配体结合结构域包含5HT3A (SEQ ID NO:6) 的约氨基酸23-247,例如SEQ ID NO:6的氨基酸23-240、氨基酸30-245、氨基酸23-247、氨基酸23-250,在某些情况下氨基酸30-255。在某些实施方案中,所述配体结合结构域基本上由SEQ ID NO:6的氨基酸23-240组成,基本上由SEQ ID NO:6的氨基酸23-245组成,基本上由SEQ ID NO:6的氨基酸30-247组成,基本上由SEQ ID NO:6的氨基酸23-250组成,基本上由SEQ ID NO:6的氨基酸23-255组成。在某些这样的实施方案中,所述配体结合结构域包含5HT3B (SEQ ID NO:57) 的约氨基酸21-239,例如SEQ ID NO:57的氨基酸21-232、氨基酸21-235、氨基酸21-240、氨基酸21-245,在某些情况下氨基酸21-247。在某些实施方案中,所述配体结合结构域基本上由SEQ ID NO:57的氨基酸21-239组成,基本上由SEQ ID NO:57的氨基酸21-232组成,基本上由SEQ ID NO:57的氨基酸21-235组成,基本上由SEQ ID NO:57的氨基酸21-240组成,基本上由SEQ ID NO:57的氨基酸21-245组成。在某些实施方案中,所述离子孔结构域序列来自除人5-羟色胺受体3以外的Cys-环受体。

[0128] 在某些实施方案中,所述嵌合受体的配体结合结构域包含人GABA受体的配体结合结构域序列。在某些实施方案中,所述人GABA受体是人GABA- $\text{A}\beta 3$ 。在某些这样的实施方案中,所述配体结合结构域包含GABA- $\text{A}\beta 3$ (SEQ ID NO:8) 的约氨基酸26-245,例如SEQ ID NO:8的氨基酸26-240、氨基酸26-245、氨基酸26-248、氨基酸26-250,在某些情况下氨基酸26-255。在某些这样的实施方案中,所述配体结合结构域基本上由SEQ ID NO:8的氨基酸26-240组成,基本上由SEQ ID NO:8的氨基酸26-245组成,基本上由SEQ ID NO:8的氨基酸26-248组成,基本上由SEQ ID NO:8的氨基酸26-250组成,或基本上由SEQ ID NO:8的氨基酸26-255组成。在某些实施方案中,所述离子孔结构域序列来自除人GABA-A受体以外的Cys-环受体。

[0129] 在某些实施方案中,配体结合结构域与其融合的离子孔结构域传导阴离子,例如,它包含人甘氨酸受体或人血清素受体的离子孔结构域序列。在其它实施方案中,配体结合结构域与其融合的离子传导孔结构域传导阳离子,例如,它包含人乙酰胆碱受体或人 γ -氨基丁酸受体A的离子孔结构域序列。

[0130] 在某些实施方案中,所述离子孔结构域包含人甘氨酸受体的离子孔结构域序列。在某些实施方案中,所述人甘氨酸受体是人GlyR $\alpha 1$ 。在某些这样的实施方案中,所述离子孔结构域包含GlyR $\alpha 1$ (SEQ ID NO:2) 的约氨基酸245-457,例如SEQ ID NO:2的氨基酸240-457、氨基酸245-457、氨基酸248-457、氨基酸249-457、氨基酸250-457、氨基酸255-457或氨

基酸260-457。在某些这样的实施方案中,所述离子孔结构域基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸245-457组成,基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸248-457组成,基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸249-457组成,或基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸250-457组成。

[0131] 在某些实施方案中,所述离子孔结构域包含人烟碱胆碱能受体的离子孔结构域序列。在某些实施方案中,所述人烟碱胆碱能受体是人 $\alpha 7$ -nAChR。在某些这样的实施方案中,所述离子孔结构域包含 $\alpha 7$ -nAChR (SEQ ID NO:4) 的约氨基酸230-502,例如氨基酸227-502、氨基酸230-502、氨基酸231-502、氨基酸232-502或氨基酸235-502。在某些这样的实施方案中,所述离子孔结构域基本上由SEQ ID NO:4的氨基酸227-502组成,基本上由SEQ ID NO:4的氨基酸230-502组成,基本上由SEQ ID NO:4的氨基酸231-502组成,基本上由SEQ ID NO:4的氨基酸232-502组成,或基本上由SEQ ID NO:4的氨基酸235-502组成。

[0132] 在某些实施方案中,所述离子孔结构域包含人血清素受体的离子孔结构域序列。在某些实施方案中,所述人血清素受体是人5HT3A或5HT3B。在某些这样的实施方案中,所述离子孔结构域包含5HT3A (SEQ ID NO:6) 的约氨基酸248-516,例如SEQ ID NO:6的氨基酸240-516、氨基酸245-516、氨基酸248-516、氨基酸250-516或氨基酸255-516。在某些这样的实施方案中,所述离子孔结构域基本上由SEQ ID NO:6的氨基酸240-516组成,基本上由SEQ ID NO:6的氨基酸245-516组成,基本上由SEQ ID NO:6的氨基酸248-516组成,基本上由SEQ ID NO:6的氨基酸250-516组成,或基本上由氨基酸253-516组成。在某些这样的实施方案中,所述离子孔结构域包含5HT3B (SEQ ID NO:57) 的约氨基酸240-441,例如SEQ ID NO:57的氨基酸230-441、氨基酸235-441、氨基酸240-441、氨基酸245-441或氨基酸250-441。在某些这样的实施方案中,所述离子孔结构域基本上由SEQ ID NO:57的氨基酸230-441组成,基本上由SEQ ID NO:57的氨基酸235-441组成,基本上由SEQ ID NO:57的氨基酸240-441组成,基本上由SEQ ID NO:57的氨基酸245-441组成,或基本上由氨基酸250-441组成。

[0133] 在某些实施方案中,所述离子孔结构域包含人GABA受体的离子孔结构域序列。在某些实施方案中,所述人GABA受体是人GABA-AB3。在某些这样的实施方案中,所述离子孔结构域包含GABA-AB3 (SEQ ID NO:8) 的约氨基酸246-473,例如SEQ ID NO:8的氨基酸240-473、氨基酸245-473、氨基酸247-473、氨基酸250-473或氨基酸253-473。在某些这样的实施方案中,所述离子孔结构域基本上由SEQ ID NO:8的氨基酸240-473、SEQ ID NO:8的氨基酸245-473、SEQ ID NO:8的氨基酸247-473、SEQ ID NO:8的氨基酸250-473或SEQ ID NO:8的氨基酸253-473组成。

[0134] 在某些实施方案中,主题嵌合的配体门控的离子通道的离子孔结构域包含与离子孔结构域的M2-M3接头结构域异源的M2-M3接头结构域。“M2-M3接头结构域”或“M2-M3接头”是指在LGIC的离子孔结构域内的序列,其在其氨基(N)端侧接受体的跨膜结构域2(M2)的C-末端并且在其羧基(C)端侧接受体的跨膜结构域3(M3)的N-末端。从本领域和/或通过使用任何公众可得到的蛋白分析工具,例如Expasy、UniProt等,可以容易地确定LGIC的M2-M3接头。通常,当嵌合受体的离子孔结构域包含异源M2-M3接头时,M2-M3接头衍生自与嵌合受体的配体结合结构域相同的受体。例如,当主题配体门控的离子通道包含来自AChR的配体结合结构域和来自GlyR的离子孔结构域时,主题配体门控的离子通道可以包含来自GlyR的离子孔结构域序列,但是除了M2-M3接头以外,其替代性地衍生自AChR。在某些实施方案中,所述离子孔结构域来自GlyR $\alpha 1$,且M2-M3接头来自 $\alpha 7$ -nAChR。在某些这样的实施方案中,

从GlyRa1除去的M2-M3接头序列是GlyRa1 (SEQ ID NO:2) 的约氨基酸293-311,例如氨基酸304-310、293-306、298-310、305-311等。在某些这样的实施方案中,插入的M2-M3接头是 α 7-nAChR (SEQ ID NO:4) 的约氨基酸281-295,例如氨基酸290-295、281-290、281-295、287-292等,或与 α 7-nAChR的氨基酸281-295具有约95%同一性或更多的序列。

[0135] 在某些实施方案中,主题嵌合的配体门控的离子通道的配体结合结构域包含与配体结合结构域的Cys-环序列异源的Cys-环结构域序列。“Cys-环结构域序列”或“Cys-环序列”是指在Cys-环LGIC的配体结合结构域内的结构域,其形成在N-端和C-端侧接半胱氨酸的环结构。不希望受理论的约束,据信,在配体与配体结合结构域结合后,Cys-环在结构上移动到与M2-M3环非常接近,此移动介导在胞外结构域中的配体结合向离子孔结构域中的信号转导的生物物理学翻译(如在Miller和Smart, Trends in Pharmacological Sci 2009:31 (4) 中所综述的)。用异源Cys-环序列对内源Cys-环序列的置换可以使LGIC的电导率增加1.5倍或更多,例如至少2倍、3倍或4倍,在某些情况下至少5倍或6倍,并且在某些剂量下至少7倍、8倍、9倍或10倍。从本领域和/或通过使用任何公众可得到的蛋白分析工具,例如Expasy、uniProt等,可以容易地确定Cys-环受体的Cys-环结构域。通常,当嵌合受体的配体结合结构域包含异源Cys-环序列时,Cys-环序列衍生自与嵌合受体的离子孔结构域相同的受体。例如,当主题嵌合的配体门控的离子通道包含来自AChR的配体结合结构域和来自GlyR的离子孔结构域时,主题配体门控的离子通道可以包含来自AChR的配体结合结构域序列,但是除了Cys-环结构域的序列以外,后者替代性地衍生自GlyR。在某些实施方案中,所述配体结合结构域来自 α 7-nAChR且所述Cys-环序列来自GlyRa1。在某些这样的实施方案中,从 α 7-nAChR除去的Cys-环序列是 α 7-nAChR (SEQ ID NO:4) 的约氨基酸150-164,例如 α 7-nAChR的氨基酸150-157。在某些这样的实施方案中,插入的Cys环序列是GlyRa1 (SEQ ID NO:2) 的约氨基酸166-180,例如GlyRa1的氨基酸166-172,或与GlyRa1的氨基酸166-180具有约95%或更多同一性的序列。

[0136] 在某些实施方案中,主题嵌合的配体门控的离子通道的配体结合结构域包含与配体结合结构域的 β 1-2环结构域序列异源的 β 1-2环结构域序列。“ β 1-2环结构域序列”或“ β 1-2环或 β 1- β 2环”是指在Cys-环LGIC的配体结合结构域内的结构域,其在其N-端侧接 β 1折叠的C-端且在其C-端侧接 β 2折叠的N-端。不希望受理论的约束,据信, β 1-2环有助于介导胞外结构域中的配体结合向离子孔结构域的生物物理学翻译和随后的信号转导(即,在GlyR的情况下的氯离子流入)。据信,在配体结合后, β 1-2环与Cys-环一起非常接近M2-M3环,以介导胞外结构域中的配体结合向M2-M3环所在的离子孔结构域中的信号转导的生物物理学翻译(如在Miller和Smart, 出处同上中所综述的)。用异源 β 1-2环序列对内源 β 1-2环序列的置换可以使LGIC的电导率增加1.5倍或更多,例如至少2倍、3倍或4倍,在某些情况下至少5倍或6倍,并且在某些剂量下至少7倍、8倍、9倍或10倍。从本领域和/或通过使用任何公众可得到的蛋白分析工具,例如Expasy、uniProt等,可以容易地确定Cys-环受体的 β 1-2环。通常,当嵌合受体的配体结合结构域包含异源 β 1-2环序列时, β 1-2环序列衍生自与嵌合受体的离子孔结构域相同的受体。例如,当主题嵌合的配体门控的离子通道包含来自AChR的配体结合结构域和来自GlyR的离子孔结构域时,主题配体门控的离子通道可以包含来自AChR的配体结合结构域序列,但是除了 β 1-2环结构域的序列以外,后者替代性地衍生自GlyR。在某些实施方案中,所述配体结合结构域来自 α 7-nAChR且所述 β 1-2环序列来自GlyRa1。在某些实

施方案中,从 $\alpha 7$ -nAChR除去的 $\beta 1$ -2环序列是 $\alpha 7$ -nAChR (SEQ ID NO:4) 的约氨基酸67-70,例如 $\alpha 7$ -nAChR的氨基酸67-70、66-71或64-72。在某些实施方案中,插入的 $\beta 1$ -2环序列是GlyRa1 (SEQ ID NO:2) 的约氨基酸79-85,例如GlyRa1的氨基酸81-84、79-85或81-84,或与GlyRa1的氨基酸79-85具有约95%或更多同一性的序列。

[0137] 本公开内容的嵌合LGIC受体的序列的非限制性例子包括在本文中公开为SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:52的序列。在某些实施方案中,嵌合LGIC受体或编码它的多核苷酸与本文的SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:52中提供的序列具有85%或更多的序列同一性,例如,与在SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:52中提供的序列具有90%或更多、93%或更多、或95%或更多(即约96%、约97%、约98%、约99%或约100%)的序列同一性。在序列中,信号肽是斜体,配体结合结构域是粗体,且离子孔结构域带下划线。

[0138] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1嵌合体(R229连接部),其包含人 $\alpha 7$ -nAChR信号肽(斜体)和配体结合结构域(粗体),后者与人GlyRa1离子孔结构域(带下划线)融合:

[0139] *MRCSPGGVWLALAASLLHVS***LQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAN**
DSQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVS
EYPGVKTVRFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQ
YLPPGIFKSSCYIDVRWFPPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMGEA
DISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRMGY
YLIQMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTTLTMTTQSSGSRASL
PKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN FVSRQHKELLRFRRKRRH
HKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTT
NPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRRE
DVHNQ (SEQ ID NO:16, 由 SEQ ID NO:15 编码)。

[0140] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1 (R228连接部) 嵌合体,其包含人 $\alpha 7$ -nAChR信号肽(斜体)和配体结合结构域(粗体),后者与人GlyRa1离子孔结构域(带下划线)融合:

[0141] *MRCSPGGVWLALAASLLHVS***LQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAN**
DSQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVS
EYPGVKTVRFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQ
YLPPGIFKSSCYIDVRWFPPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMGEA
DISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRQMGEY
YLIQMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTTLTMTTQSSGSRASL
PKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN FVSRQHKELLRFRRKRRH
HKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTT
NPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRRE
DVHNQ (SEQ ID NO:17)。

[0142] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1 (V224连接部) 嵌合体,其包含人 $\alpha 7$ -nAChR信号肽(斜体)和配体结合结构域(粗体),后者与人GlyRa1离子孔结构域

(带下划线)融合:

[0143] *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAN*
DSQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVS
EYPGVKTVRFPDGGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGH
CQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQM
QEA
DISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVHLERQMGYY
LIQMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTTLTMTTQSSGSRASLP
KVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN FVSRQHKELLRFRRKRRHH
KSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNP
[0144] *PPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRRED*
VHNQ (SEQ ID NO:18)。

[0145] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1 (Y233连接部) 嵌合体,其包含人 $\alpha 7$ -nAChR信号肽(斜体)和配体结合结构域(粗体),后者与人GlyR $\alpha 1$ 离子孔结构域(带下划线)融合:

[0146] *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAN*
DSQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVS
EYPGVKTVRFPDGGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGH
CQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQM
QEA
DISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRTLY
YLIQMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTTLTMTTQSSGSRASL
PKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN FVSRQHKELLRFRRKRRH
HKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTT
NPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRRE
DVHNQ (SEQ ID NO:19)。

[0147] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1嵌合体 (R229连接部),其包含人 $\alpha 7$ -nAChR信号肽(斜体)和配体结合结构域(粗体),后者与包含 $\alpha 7$ -nAChR M2-M3接头(小写字母)的人GlyR $\alpha 1$ 离子孔结构域(带下划线)融合:

[0148] (a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERP*
VANDSQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWN
VSEYPGVKTVRFPDGGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGH
CQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQM
Q
EADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRM
GYyliQMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTTLTMTTQSSGSei
mpatsdsvSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN FVSRQHKELLRFRRKR
RHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSN
TTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVR
REDVHNQ (SEQ ID NO:21, 由 SEQ ID NO:20 编码);

(b) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERP*
ANDSQPLTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLTNNIWLQMSWTDHYLQWN
[0149] *VSEYPGVKTVRFPDGGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGH*
CQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQ
EADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRM
GYyliQMYIPSLlIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLMTTQSSGSei
mpatsdsvpliaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNfVSRQHKELLRFRRKRR
[0150] *HHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNST*
TNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRR
EDVHNQ (SEQ ID NO:23, 由 SEQ ID NO:22 编码);

(c) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERP*
ANDSQPLTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLTNNIWLQMSWTDHYLQWN
VSEYPGVKTVRFPDGGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGH
CQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQ
EADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRM
[0151] *GYyliQMYIPSLlIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLMTTQSSGSR*
ASLPKVsdsvglIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNfVSRQHKELLRFRRKRR
HHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNST
TNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRR
EDVHNQ (SEQ ID NO:25, 由 SEQ ID NO:24 编码);

(d) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERP*
ANDSQPLTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLTNNIWLQMSWTDHYLQWN
VSEYPGVKTVRFPDGGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGH
CQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQ
EADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMERQM
[0152] *GYyliQMYIPSLlIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLMTTQSSGSei*
mpatsdsvpliaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNfVSRQHKELLRFRRKRR
HHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNST
TNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRR
EDVHNQ (SEQ ID NO:27, 由 SEQ ID NO:26 编码);

[0153] (e) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAN*
*DSQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLT**TNIWLQMSWTDHYLQWN*
VSEYPGVKTVRFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGH
CQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQ
EADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRT
*GYyliQMYIPSL**LIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT**VL**TMTTQSSGSei*
*mpatsdsvpliaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN**FVSRQHKELLRFRRKRR*
*HHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKD**GISVKGANN**SNT*
TNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRR
EDVHNQ (SEQ ID NO:29, 由 SEQ ID NO:28 编码);或者

[0154] (f) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAN*
*DSQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLT**TNIWLQMSWTDHYLQWN*
VSEYPGVKTVRFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGH
CQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQ
EADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRT
*LYyliQMYIPSL**LIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT**VL**TMTTQSSGSei*
*mpatsdsvpliaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN**FVSRQHKELLRFRRKRR*
*HHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKD**GISVKGANN**SNT*
TNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRR
EDVHNQ (SEQ ID NO:31, 由 SEQ ID NO:30 编码)。

[0155] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1嵌合体,其包含人 $\alpha 7$ -nAChR信号肽(斜体)和含有GlyR $\alpha 1$ Cys-环序列(小写字母)的配体结合结构域(粗体);后者与人GlyR $\alpha 1$ 离子孔结构域(带下划线)融合。在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体包含与SEQ ID NO:33具有80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多、97%或更多、98%或更多、99%或更多或100%的序列同一性的氨基酸序列:

[0156] *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAN*
*DSQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLT**TNIWLQMSWTDHYLQWNVS*
*EYPGVKTVRFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGH**CQ*
*YLPPGIFKSSepmdlknfpmdvqtcKLKFGSWSYGGWSLDLQM**QEADISG*
*YIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRM**GYyliQ*
*MYIPSL**LIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT**VL**TMTTQSSGSRASLPKV*
*SYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN**FVSRQHKELLRFRRKRRHHKS*
*PMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKD**GISVKGANN**SNTTNPPP*
APSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRR
EDVHNQ (SEQ ID NO: 33, 由 SEQ ID NO: 32 编码)。

(a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVS**LQGEFQRKLYKELVKNYNPLERP**V*
*ANDSQPLTVYFSL**SLLQIMDVDEKNQVLT**TNIWLQMSWTDHYLQWN*
*VSEYPGVKTVRFPDGQIW**KPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGH*
*CQYLPPGIFKSS**ScpmdlknFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQM**QEA*
[0157] *DISGYIPNGE**WDLVGIPGKRSE**RFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRM**MGY*
*YLIQMYIP**SLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT**VLTMTTQSSGSRAS*
*PKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN**FVSRQHKELLRFRRKRRH*
*HKSPMLNLFQE**DEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTT*
NPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRRE
[0158] *DVHNQ* (SEQ ID NO:35, 由 SEQ ID NO:34 编码)。

[0159] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1嵌合体,其包含人 $\alpha 7$ -nAChR信号肽(斜体)和含有GlyR $\alpha 1\beta 1$ -2环序列(小写字母)的配体结合结构域(粗体);后者与人GlyR $\alpha 1$ 离子孔结构域(带下划线)融合:

(a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVS**LQGEFQRKLYKELVKNYNPLERP**V*
*ANDSQPLTVYFSL**SLLQIMDV**DettmVLT**TNIWLQMSWTDHYLQWN**V*
*SEYPGVKTVRFPDGQIW**KPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHC*
*QYLPPGIFKSS**CYIDVRWF**PFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQM**QEA*
[0160] *ADISGYIPNGE**WDLVGIPGKRSE**RFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRM**MG*
*YYLIQMYIP**SLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT**VLTMTTQSSGSRAS*
*LPKVS**YVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN**FVSRQHKELLRFRRKRR*
*HHKSPMLNLFQE**DEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNT*
TNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRR
EDVHNQ (SEQ ID NO:37, 由 SEQ ID NO:36 编码)。

[0161] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1嵌合体,其包含人 $\alpha 7$ -nAChR信号肽(斜体)以及含有GlyR $\alpha 1\beta 1$ -2环序列(小写字母)和Cys-环序列(小写字母)的配体结合结构域(粗体);后者与人GlyR $\alpha 1$ 离子孔结构域(带下划线)融合:

(a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVS**LQGEFQRKLYKELVKNYNPLERP**V*
*ANDSQPLTVYFSL**SLLQIM**DiaettmdL**TNIWLQMSWTDHYLQWN**VSE*
*YPGVKTVRFPDGQIW**KPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQY*
*LPPGIFKSS**Scpmdlknfpmdvqtc**KLKFGSWSYGGWSLDLQM**QEA**DISGYI*
[0162] *PNGE**WDLVGIPGKRSE**RFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRM**MGYYLIQ*
*YIP**SLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT**VLTMTTQSSGSRAS**LPKVS*
*YVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN**FVSRQHKELLRFRRKRRHHKSPM*
*NLNFQE**DEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPPPAP*
SKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ
(SEQ ID NO:39, 由 SEQ ID NO:38 编码)。

(b) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPV*
*ANDSQPLTVYFSLSLQIMDV**Dettm**VLTTNIWLQMSWTDHYLQWNV*
SEYPGVKTVRFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHC
[0163] *QYLPPGIFKSScpmdlknfpmdvqtcKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADIS*
*GYIPNGEWDLVGIPGKRSEFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRM**MGYYLI*
QMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPK
VSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN FVSRQHKELLRFRRKRRHHK
SPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPP
[0164] *PAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDV*
HNQ (SEQ ID NO:41, 由 SEQ ID NO:40 编码)。

(c) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPV*
*ANDSQPLTVYFSLSLQIMDV**Dettm**VLTTNIWLQMSWTDHYLQWNV*
SEYPGVKTVRFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHC
[0165] *QYLPPGIFKSScpmdlknfpmdvqtcKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADIS*
*GYIPNGEWDLVGIPGKRSEFYECCKEPYPDVTFTVTMERQM**MGYYLI*
QMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPK
VSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN FVSRQHKELLRFRRKRRHHK
SPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPP
PAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDV
HNQ (SEQ ID NO:43, 由 SEQ ID NO:42 编码)。

(d) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPV*
*ANDSQPLTVYFSLSLQIM**Diaettmd**LTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSE*
YPGVKTVRFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQY
[0166] *LPPGIFKSScpmdlknfpmdvqtcKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYI*
*PNGEWDLVGIPGKRSEFYECCKEPYPDVTFTVTMERQM**MGYYLIQMY*
IPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPKVSYV
KAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN FVSRQHKELLRFRRKRRHHKSPML
NLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPP
PAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ
(SEQ ID NO:45, 由 SEQ ID NO:44 编码)。

[0167] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1嵌合体,其包含人 $\alpha 7$ -nAChR信号肽(斜体)和含有GlyR $\alpha 1\beta 1$ -2环序列(小写字母)的配体结合结构域(粗体);后者与包含人 $\alpha 7$ -nAChR M2-M3接头(小写字母)的人GlyR $\alpha 1$ 离子孔结构域(带下划线)融合:

[0168] (a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVS**LQGEFQRKLYKELVKNYNPLERP**V*
*ANDSQPLTVYFSL**SLLQIMDVDEK**NQVLT**TNIWLQMSWTDHYLQWN*
*SEYPGVKTVRFPDGQIWKPDILL**NSADERFDATFHTNVLVNSSGHC*
*QYLPPGIFKSSCYIDVRWF**PFVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQM**QE*
[0169] *ADISGYIPNGE**WDLVGIPGKRSE**RFYECCKEPYPDV**TFTVTMRRRM**GY*
*YYLIQMYIP**SL**LIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT**VL**TMTTQSSG**Seim*
*patds**vp**liaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN**FVSRQHKELLRFRRKRRH*
*HKSPMLNLFQE**DEAGEGRFNFSAYGMGPAC**LQAKDGI**SVKGANNSNTT*
*NPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGF**PMAFLIFNMFYWIIYKIVR**RE*
DVHNQ (SEQ ID NO:47, 由 SEQ ID NO:46 编码)。

[0170] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是CHRNA7/GLRA1嵌合体,其包含人 $\alpha 7$ -nAChR信号肽(斜体)和含有GlyR $\alpha 1$ Cys-环序列(小写字母)的配体结合结构域(粗体);后者与包含人 $\alpha 7$ -nAChR M2-M3接头(小写字母)的人GlyR $\alpha 1$ 离子孔结构域(带下划线)融合:

(a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVS**LQGEFQRKLYKELVKNYNPLERP**V*
*ANDSQPLTVYFSL**SLLQIMDVDEK**NQVLT**TNIWLQMSWTDHYLQWN*
*VSEYPGVKTVRFPDGQIWKPDILL**NSADERFDATFHTNVLVNSSGH*
*CQYLPPGIFKSS**Scpmdlknfpm**dvqtcKLKFGSWSYGGWSLDLQM**QEADI*
[0171] *SGYIPNGE**WDLVGIPGKRSE**RFYECCKEPYPDV**TFTVTMRRRM**MGYYL*
*IQMYIP**SL**LIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT**VL**TMTTQSSG**Seim**patds*
*vp**liaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN**FVSRQHKELLRFRRKRRHHKSP*
*MLNLFQE**DEAGEGRFNFSAYGMGPAC**LQAKDGI**SVKGANNSNTT**NPPPA*
*PSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGF**PMAFLIFNMFYWIIYKIVR**REDVHN*
Q (SEQ ID NO:49, 由 SEQ ID NO:48 编码)。

[0172] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是HTR3A/GLRA1嵌合体(R241连接部),其包含人5HT3A血清素受体信号肽(斜体)和配体结合结构域(粗体),后者与人GlyR $\alpha 1$ 离子孔结构域(带下划线)融合:

(a) *MLLWVQQALLALLPTLLAQGEARRSRNTTRPALLRLSDYLLTN*
*YRKGVRPVRDWRKPTTVSIDVIVYAILNVDEKNQVLT**TYIWYRQYW*
TDEFLQWNPEDFDNITKLSIPTDSIWVPDILINEFVDVGKSPNIPYVYIR
*HQGEVQNYKPLQVVTACSLDIYNFPFVQNC**SLTFTSWLHTIQDINIS*
[0173] *LWRLPEKVKSDRSVFMNQGEWELLGVLPYFREFSMESSNYAEMKF*
*YVVIRRRM**MGYYLIQMYIP**SL**LIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT**VL*
*MTTQSSGSRASLPKVS**YVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN**FVSRQH*
*KELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQE**DEAGEGRFNFSAYGMGPAC**LQAKDGI*
*SVKGANNSNTT**NPPPA**PSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGF**PMAFLIFN*
*MFYWIIYKIVR**REDVHNQ* (SEQ ID NO:50)。

[0174] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是HTR3A/GLRA1嵌合体(V236连接部),其包含人5HT3A血清素受体信号肽(斜体)和配体结合结构域(粗体),后者与人GlyR $\alpha 1$ 离子孔结

构域(带下划线)融合:

(a) *MLLWVQQALLALLPTLLAQGEARRSRNTTRPALLRLSDYLLTN*
[0175] **YRKGVRPVRDWRKPTTVSIDVIVYAILNVDEKNQVLTTYIWYRQYW**
TDEFLQWNPEDFDNITKLSIPTDSIWVDPDILINEFVDVGKSPNIPYVYIR
HQGEVQNYKPLQVVTACSLDIYNFPFDVQNCSTFTSWLHTIQDINIS
LWRLPEKVKSDRSVFMNQGEWELLGVLPYFREFSMESSNYAEMKF
YVHLERQMGYYLIQMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTTLT
[0176] MTTQSSGSRASLPKVSIVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFSRQH
KELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLOAKDGI
SVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPM AFLIFNM
FYWIIYKIVRREDVHNQ (SEQ ID NO:51)。

[0177] 在某些实施方案中,所述嵌合LGIC受体是GABRB3/GLRA1嵌合体(Y245连接部),其包含人GABA-A β 3信号肽(斜体)和配体结合结构域(粗体),后者与人GlyR α 1离子孔结构域(带下划线)融合:

(a) *MWGLAGGRLFGIFSAPVLVAVVCCAQSVNDPGNMSFVKETVDKL*
LKGYDIRLRPDFGGPPVCVGMNIDIASIDMVSEVNMDYTLTMYFQQY
WRDKRLAYSGIPLNLTLDNRVADQLWVPDTYFLNDKKSFVHGVTVK
NRMIRLHPDGTVLYGLRITTAAACMMDLRRYPLDEQNCTLEIESYGY
[0178] **TTDDIEFYWRGGDKAVTGVERIELPQFSIVEHRLVSRNVVFATGAYP**
RLSLSFRLKRNIQYMGYYLIQMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGL
GITTTLTMTTQSSGSRASLPKVSIVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVN
FVSRQHKELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACL
QAKDGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPM
AFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ (SEQ ID NO:52)。

[0179] 如以上所讨论的,在某些方面,主题经工程改造的受体包含至少一个氨基酸突变,相对于配体对未突变的亲本受体的效能,所述突变改变了配体对经工程改造的受体的效能。换言之,一个或多个氨基酸突变,例如功能缺失突变或功能获得突变,使经工程改造的受体对配体的应答性相对于未突变的亲本受体的应答性发生转变。在某些这样的实施方案中,一个或多个突变是在经工程改造的受体的配体结合结构域中。在某些实施方案中,当经工程改造的受体的配体结合结构域是Cys-环受体蛋白时,一个或多个氨基酸突变是在与 α 7-nAChR (SEQ ID NO:4)的选自由以下成员组成的集合的残基相对应的残基处的置换:W77、Y94、R101、W108、Y115、T128、N129、V130、L131、Q139、L141、Y151、S170、W171、S172、S188、Y190、Y210、C212、C213和Y217。在某些实施方案中,一个残基被置换。在某些实施方案中,2、3、4或5个或更多个残基被置换,例如6、7、8、9或10个残基被置换。在某些实施方案中,残基对应于 α 7-nAChR (SEQ ID NO:4)的选自由以下成员组成的集合的残基:W77、R101、Y115、N129、L131、S170、S172和S188。在某些实施方案中,一个或多个置换是在 α 7-nAChR序列内。

[0180] 在某些实施方案中,一个或多个置换使经工程改造的受体对乙酰胆碱和非天然配

体的应答性降低例如2倍或更多、3倍或更多、4倍或更多、5倍或更多、10倍或更多、20倍或更多、30倍或更多、50倍或更多、或100倍。在某些实施方案中,一个或多个置换是与 $\alpha 7$ -nAChR的R101I、R101S、R101D、Y115L、Y115M、Y115D、Y115T、T128M、T128R、T128I、N129I、N129V、N129P、N129W、N129T、N129D、N129E、L131E、L131P、L131T、L131D、L131S、L141S、L141R、W171F、W171H、S172F、S172Y、S172R、S172D、C212A、C212L或C213P对应的置换。在其它情况下,一个或多个置换选择性地降低乙酰胆碱在经工程改造的受体上的效能。换言之,一个或多个置换降低经工程改造的受体对乙酰胆碱的应答性,同时基本上维持对非天然配体的应答性,或相对于它降低经工程改造的受体对非天然配体的应答性,以其它方式使经工程改造的受体对乙酰胆碱的应答性降低2倍或更多,例如3倍、4倍、5倍或更多,在某些情况下10倍、20倍、50倍或100倍或更多。示例性的置换亦即与 $\alpha 7$ -nAChR的L131E、L131S、L131T、L131D或S172D对应的置换。在其它实施方案中,一个或多个置换选择性地降低非天然配体在经工程改造的受体上的效能。换言之,一个或多个置换降低经工程改造的受体对非天然配体的应答性,同时基本上维持对乙酰胆碱的应答性,或相对于它降低经工程改造的受体对乙酰胆碱的应答性,以其它方式使经工程改造的受体对非天然配体的应答性降低2倍或更多,例如3倍、5倍或更多,在某些情况下10倍、20倍或50倍或更多。示例性的置换包括与 $\alpha 7$ -nAChR的W77M、Y115W、S172T或S172C对应的置换。在某些实施方案中,一个或多个置换是在 $\alpha 7$ -nAChR序列内。在某些实施方案中,所述非天然配体选自AZD-0328、TC6987、ABT-126和Facinicline/RG3487。

[0181] 在其它实施方案中,一个或多个置换使经工程改造的受体对乙酰胆碱和/或非天然配体的应答性增加例如2倍或更多、3倍或更多、4倍或更多、5倍或更多、10倍或更多、20倍或更多、30倍或更多、50倍或更多或100倍。示例性的置换包括与L131N、L141W、S170G、S170A、S170L、S170I、S170V、S170P、S170F、S170M、S170T、S170C、S172T、S172C、S188I、S188V、S188F、S188M、S188Q、S188T、S188P或S188W对应的置换。在某些情况下,一个或多个置换增加乙酰胆碱和非天然配体的效能,例如与 $\alpha 7$ -nAChR的L131N、S170G、S170A、S170L、S170I、S170V、S170P、S170F、S170M、S170T、S170C、S172T、S188I、S188V、S188F、S188M、S188Q和S188T对应的置换。在其它情况下,一个或多个置换选择性地增加乙酰胆碱在经工程改造的受体上的效能。换言之,相对于它增加经工程改造的受体对非天然配体的应答性,一个或多个置换使经工程改造的受体对乙酰胆碱的应答性增加2倍或更多,例如3倍、4倍或5倍或更多,在某些情况下10倍、20倍、50倍或100倍,例如与 $\alpha 7$ -nAChR的L141W、S172T、S172C、S188P或S188W对应的置换。在某些实施方案中,一个或多个置换是在 $\alpha 7$ -nAChR序列内。在某些实施方案中,所述非天然配体选自AZD-0328、TC6987、ABT-126和Facinicline/RG3487。在再其它情况下,一个或多个置换选择性地增加非天然配体在经工程改造的受体上的效能。换言之,相对于它增加经工程改造的受体对乙酰胆碱的应答性,一个或多个置换使经工程改造的受体对非天然配体的应答性增加2倍或更多,例如3倍、5倍或更多,在某些情况下10倍、20倍或50倍或更多。

[0182] 在某些实施方案中,在主题经工程改造的受体中突变的氨基酸残基不是与野生型 $\alpha 7$ nAChR (SEQ ID NO:4) 的R27、E41、Q79、Q139、L141、G175、Y210、P216、Y217或D219对应的氨基酸。在某些实施方案中,在主题经工程改造的受体中突变的氨基酸残基是与野生型 $\alpha 7$ nAChR (SEQ ID NO:4) 的R27、E41、Q79、Q139、L141、G175、Y210、P216、Y217或D219对应的氨基

酸。在某些实施方案中,所述置换不是与野生型 $\alpha 7$ nAChR中的W77F、W77Y、W77M、Q79A、Q79Q、Q79S、Q79G、Y115F、L131A、L131G、L131M、L131N、L131Q、L131V、L131F、Q139G、Q139L、G175K、G175A、G175F、G175H、G175M、G175R、G175S、G175V、Y210F、P216I、Y217F或D219A对应的置换。在某些实施方案中,所述置换是与野生型 $\alpha 7$ nAChR中的W77F、W77Y、W77M、Q79A、Q79Q、Q79S、Q79G、Y115F、L131A、L131G、L131M、L131N、L131Q、L131V、L131F、Q139G、Q139L、G175K、G175A、G175F、G175H、G175M、G175R、G175S、G175V、Y210F、P216I、Y217F或D219A对应的置换。在某些实施方案中,当这样的置换存在于经工程改造的受体内时,它与本文描述的一个或多个氨基酸突变组合存在。

[0183] 例如,已经发现, $\alpha 7$ -nAChR (SEQ ID NO:4)的残基Y94、Y115、Y151和Y190介导天然配体乙酰胆碱的结合。在这些残基处的突变将减少乙酰胆碱的结合且因此是功能缺失突变。相反, $\alpha 7$ -nAChR的残基W77、Y115、N129、V130、L131、Q139、L141、S170、Y210、C212、C213和Y217介导非天然配体AZD0328与该受体的结合,且这些残基的突变可能增加AZD0328和/或其它配体对该受体的亲和力且因此是功能获得突变。在某些实施方案中,所述主题经工程改造的受体包含在 $\alpha 7$ -nAChR (SEQ ID NO:4)的配体结合结构域区域或含有 $\alpha 7$ -nAChR的配体结合结构域区域的嵌合受体的配体结合结构域的一个或多个氨基酸残基中的突变,其中所述一个或多个氨基酸残基选自由以下成员组成的集合:W77、Y94、Y115、N129、V130、L131、Q139、L141、Y151、S170、Y190、Y210、C212、C213和Y217。在某些实施方案中,在 $\alpha 7$ -nAChR (SEQ ID NO:4)的配体结合结构域区域或含有 $\alpha 7$ -nAChR的配体结合结构域区域的嵌合受体的配体结合结构域的一个或多个氨基酸残基中的突变是在选自由以下成员组成的集合的一个或多个氨基酸残基处的置换:W77、Y94、Y115、N129、V130、L131、Q139、L141、Y151、S170、Y190、Y210、C212、C213和Y217。

[0184] 作为另一个例子,已经发现, $\alpha 7$ -nAChR (SEQ ID NO:4)的残基Y115、L131、L141、S170、W171、S172、C212和Y217介导乙酰胆碱和/或烟碱的结合,且在这些残基中的一个或多个处的突变将减少乙酰胆碱和/或烟碱的结合。 $\alpha 7$ -nAChR的R101、Y115、L131、L141、W171、S172、S188、Y210和Y217介导非天然配体ABT126的结合,且预期这些残基中的一个或多个的突变会增加ABT126和/或其它配体对 $\alpha 7$ -nAChR的亲和力。 $\alpha 7$ -nAChR的R101、Y115、T128、N129、L131、L141、W171、S172、Y210、C212、C213和Y217介导非天然配体TC6987的结合,且预期这些残基中的一个或多个的突变会增加TC6987和/或其它配体对 $\alpha 7$ -nAChR的亲和力。 $\alpha 7$ -nAChR的R101、N120、L131、L141、S170、W171、S172、Y210和Y217介导非天然配体Facinicine/RG3487的结合,且预期这些残基中的一个或多个的突变会增加Facinicine/RG3487和/或其它配体对 $\alpha 7$ -nAChR的亲和力。在某些实施方案中,所述主题经工程改造的受体包含在 $\alpha 7$ -nAChR的配体结合结构域区域或含有 $\alpha 7$ -nAChR的配体结合结构域区域的嵌合受体的配体结合结构域的一个或多个氨基酸残基中的突变,其中所述一个或多个氨基酸残基选自由以下成员组成的集合:R101、Y115、T128、N120、N129、L131、L141、S170、W171、S172、S188、Y210、C212、C213和Y217。在某些实施方案中,所述一个或多个氨基酸残基改变乙酰胆碱和/或烟碱与 $\alpha 7$ -nAChR的结合,其中所述氨基酸选自由以下成员组成的集合: $\alpha 7$ -nAChR的Y115、L131、L141、S170、W171、S172、C212和Y217。在某些这样的实施方案中,所述氨基酸选自C212和S170。在某些实施方案中,所述一个或多个氨基酸残基中的突变改变ABT126与 $\alpha 7$ -nAChR的结合,其中一个或多个氨基酸残基选自由以下成员组成的集合: $\alpha 7$ -nAChR的R101、

Y115、L131、L141、W171、S172、S188、Y210和Y217。在某些这样的实施方案中,所述氨基酸选自R101、S188和Y210。在某些实施方案中,所述一个或多个氨基酸残基中的突变改变TC6987与 $\alpha 7$ -nAChR的结合,其中一个或多个氨基酸残基选自由以下成员组成的集合: $\alpha 7$ -nAChR的R101、Y115、T128、N129、L131、L141、W171、S172、Y210、C212、C213和Y217。在某些这样的实施方案中,所述氨基酸选自R101、T128、N129、Y210和C213。在某些实施方案中,所述一个或多个氨基酸残基中的突变改变Facinicine/RG3487与 $\alpha 7$ -nAChR的结合,其中一个或多个氨基酸残基选自由以下成员组成的集合: $\alpha 7$ -nAChR的R101、N120、L131、L141、S170、W171、S172、Y210和Y217。在某些这样的实施方案中,所述氨基酸选自Y210、R101和N129。

[0185] 作为另一个例子,已经发现,5HT3 (SEQ ID NO:6) 的残基W85、R87、Y136、Y138、G146、N147、Y148、K149、S177、S178、L179、Y228和Y229介导血清素的结合,且在这些残基中的一个或多个处的突变将减少血清素与5HT3的结合。5HT3的D64、I66、W85、R87、Y89、N123、G146、Y148、T176、S177、S178、W190、R191、F221、E224、Y228、Y229和E231介导非天然配体西兰司琼的结合,且预期这些残基中的一个或多个的突变会增加西兰司琼和/或其它配体对5HT3的亲合力。在某些实施方案中,所述主题经工程改造的受体包含在配体结合结构域区域5HT3A或含有5HT3的配体结合结构域区域的嵌合受体的配体结合结构域的一个或多个氨基酸残基中的突变,其中所述一个或多个氨基酸残基选自由以下成员组成的集合:D64、I66、W85、R87、Y89、N123、Y136、Y138、G146、N147、Y148、K149、T176、S177、S178、L179、W190、R191、F221、E224、Y228、Y229和E231。在某些实施方案中,所述一个或多个氨基酸残基中的突变改变血清素与5HT3的结合,其中所述氨基酸选自由以下成员组成的集合:5HT3A的W85、R87、Y136、Y138、G146、N147、Y148、K149、S177、S178、L179、Y228和Y229。在某些这样的实施方案中,所述氨基酸选自Y136、Y138、N147、K149和L179。在某些实施方案中,所述一个或多个氨基酸残基中的突变改变西兰司琼与5HT3的结合,其中一个或多个氨基酸残基选自由以下成员组成的集合:5HT3A的D64、I66、W85、R87、Y89、N123、G146、Y148、T176、S177、S178、W190、R191、F221、E224、Y228、Y229和E231。在某些这样的实施方案中,所述氨基酸选自D64、I66、Y89、N123、T176、W190、R191、F221、E224和E231。

[0186] 在某些实施方案中,影响配体调节LGIC的活性的能力的一个或多个突变位于LGIC的离子孔结构域中。例如,血清素受体5HT3A的残基T279介导配体调节通道的活性的方式,使得此残基向例如丝氨酸的突变(T279S)将效果从拮抗性(即,降低LGIC的活性)转换为激动性(即,促进通道的活性)。在某些实施方案中,主题配体门控离子通道包含在人5HT3A (SEQ ID NO:6) 的离子孔结构域或含有5HT3A的离子孔结构域的嵌合LGIC受体的离子孔结构域的一个或多个氨基酸残基中的突变,其中置换是在与SEQ ID NO:6的279相对应的氨基酸中。在某些实施方案中,置换是相对于SEQ ID NO:6的T279S置换。

[0187] 本公开内容提供了经工程改造的受体,其与亲本受体相比具有两个或更多个突变,诸如氨基酸置换。在某些实施方案中,所述亲本受体是嵌合受体。在某些实施方案中,所述亲本受体包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列。在某些实施方案中,与包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的亲本受体相比,所述经工程改造的受体包含两个氨基酸置换。

[0188] 在某些实施方案中,所述两个氨基酸置换是在选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸残基处:L131和S172,Y115和S170,以及Y115和L131。在某些实施方案中,所述配体结合结构域包含在选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸残基处的两个氨基酸置换:L131

和S172,Y115和S170,以及Y115和L131。在某些实施方案中,所述配体结合结构域包含选自以下成员组成的集合的一对氨基酸置换:L131S和S172D,L131T和S172D,L131D和S172D,Y115D和S170T,Y115D和L131Q,以及Y115D和L131E。在某些实施方案中,所述配体结合结构域包含L131E的氨基酸置换。

[0189] 在某些实施方案中,所述经工程改造的受体对乙酰胆碱的效能低于人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对乙酰胆碱的效能。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体对乙酰胆碱的效能比人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对乙酰胆碱的效能低至少约1.5倍(例如,低约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约12倍、约15倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍或约100倍,包括位于之间的所有子范围和值)。

[0190] 在某些实施方案中,所述经工程改造的受体对非天然配体的效能与人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对非天然配体的效能大约相同。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体对非天然配体的效能高于人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对非天然配体的效能。在某些实施方案中,所述经工程改造的受体对非天然配体的效能比人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对非天然配体的效能高至少约1.5倍(例如,高约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约12倍、约15倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍或约100倍,包括位于之间的所有子范围和值)。在某些实施方案中,确定所述效能包括确定EC50。

[0191] 在某些实施方案中,在有非天然配体存在下所述经工程改造的受体的效力高于在有非天然配体存在下人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)的效力。在某些实施方案中,在有非天然配体存在下所述经工程改造的受体的效力比在有非天然配体存在下人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)的效力高至少约1.5倍(例如,高约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约12倍、约15倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍或约100倍,包括位于之间的所有子范围和值)。在某些实施方案中,确定所述效力包括确定在有非天然配体存在下在体外穿过经工程改造的受体的电流的量。

[0192] 在某些方面,主题配体门控的离子通道包含一个或多个非脱敏突变。当在配体门控的离子通道的上下文中使用时,“脱敏”表示在激动剂的长期存在下离子通量的逐渐减小。这导致神经元对配体的应答性的逐渐丧失。非脱敏突变意指阻止LGIC对配体脱敏从而阻止神经元变得对配体低应答或无应答的氨基酸突变。通过将携带突变的LGIC引入到神经元中并分析长期暴露于配体期间随时间推移的电流通量,可以容易地鉴定非脱敏突变。如果LGIC不包含非脱敏突变,则在长期暴露期间电流将从峰值恢复到稳态,而如果LGIC包含非脱敏突变,则在暴露于配体的持续时间内电流将保持在峰值通量。导致脱敏的示例性氨基酸突变包括人GlyR $\alpha 1$ 中的V322L突变(在对前蛋白进行除去信号肽的处理后,V294L)和人GABA-A受体GABRB3中的L321V突变(在对前蛋白进行除去信号肽的处理后,L296V)。在某些实施方案中,所述脱敏突变是用脱敏序列替换在LGIC的C-端处或附近的氨基酸残基,所述脱敏序列是例如与衍生自由GABAR1编码的蛋白的C末端的

IDRLSRIAFPLLFGIFNLVYWATYLNREPQL (SEQ ID NO:53) 具有90%或更多同一性的序列,例如用IDRLSRIAFPLLFGIFNLVYWATYLNREPQL (SEQ ID NO:53) 替换GABRR1中的残基455-479。LGIC脱敏、用于测量LGIC的脱敏的方法和非脱敏突变是本领域众所周知的;参见,例如Gielen等

人.Nat Commun 2015年4月20日,6:6829,和Keramidas等人.Cell Mol Life Sci.2013年4月;70(7):1241-53,它们的完整公开内容通过引用并入本文。

[0193] 在某些方面,主题配体门控的离子通道包含一个或多个转换突变。转换突变意指这样的突变:其改变了LGIC的离子孔结构域的渗透性,使得它变成允许传导非天然离子,即,天然地不允许穿过的离子。在某些情况下,所述突变将渗透性从阳离子转换为阴离子,例如用肽序列PAKIGLGITVLLSLTTFMSGVAN (SEQ ID NO:55) 替换人 $\alpha 7$ -nAChR (CHRNA7) (EKISLGITVLLSLTVFMLLVAE,SEQ ID NO:54) 中的氨基酸残基260-281或另一种阳离子可渗透的LGIC中的对应氨基酸。在某些情况下,所述突变将渗透性从阴离子转换为阳离子,例如,将GLRA1的氨基酸残基279或另一种阴离子可渗透的LGIC中的对应氨基酸置换为谷氨酸(E) (这如GLRA1中的A293E置换那样,将LGIC从允许阴离子转换为允许钙),或GLRA1的氨基酸残基278或另一种阴离子可渗透的LGIC中的对应氨基酸的缺失,将GLRA1的氨基酸残基279或另一种阴离子可渗透的LGIC中的对应氨基酸置换为谷氨酸(E),以及将GLRA1的氨基酸残基293或另一种阴离子可渗透的LGIC中的对应氨基酸置换为缬氨酸(V) (这如GLRA1中的P278 Δ 、A279E、T293V那样,将LGIC从允许阴离子转换为允许阳离子)。

[0194] 通过体外筛选和验证方法,可以容易地鉴定除了本文描述的那些以外的另外的经工程改造的受体。在某些实施方案中,从有限数量的亲本受体产生亲本受体突变体的文库。使用本领域已知的方法,包括易错PCR,可以对亲本受体进行突变。在某些实施方案中,然后将亲本受体突变体的文库转染到酵母或哺乳动物细胞中,并且以高通量筛选以鉴定功能性受体(例如,以鉴定能够响应于结合剂或配体而进行信号传递的亲本受体突变体)。在某些实施方案中,然后将在此初步筛选中鉴定的功能性亲本受体突变体在哺乳动物细胞中表达,并且筛选对结合剂或配体的应答性,例如通过本文描述的平板读数和/或电生理学测定。然后可以选择对激动剂结合剂显示出增加的结合亲和力或使得能够在二次筛选中使用拮抗剂或调节剂结合剂作为激动剂的亲本受体突变体,并且用于进一步的在体外和/或在体内验证和表征测定。这样的筛选测定是本领域已知的,例如Armbruster,B.N.等人(2007)PNAS,104,5163-5168;Nichols,C.D.和Roth,B.L.(2009)Front.Mol.Neurosci.2,16;Dong,S.等人(2010)Nat.Protoc.5,561-573;Alexander,G.M.等人(2009)Neuron 63,27-39;Guettier,J.M.等人(2009)PNAS 106,19197-19202;Ellefson J.W.等人(2014)Nat Biotechnol.32(1):97-101;Maranhao AC和Ellington AD.(2017)ACS Synth Biol.20;6(1):108-119;Talwar S等人(2013)PLoS One;8(3):e58479;Gilbert D.F.等人(2009)Front Mol Neurosci.30;2:17;Lynagh和Lynch,(2010),Biol Chem.14:285(20),14890-14897;Islam R.等人(2016)ACS Chem Neurosci.21;7(12):1647-1657;和Myers等人(2008)Neuron.8:58(3):362-373。

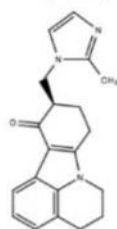
[0195] D. 结合剂

[0196] 术语“结合剂”或“药剂”在本文中可互换地使用,并且表示对哺乳动物细胞具有已知的作用机理(例如,已知充当受体的激动剂、拮抗剂或调节剂)的外源药物或化合物。结合剂可以包括蛋白、脂质、核酸和/或小分子。在某些实施方案中,结合剂包括已被美国食品和药品管理局(FDA)批准用于在临床应用中治疗特定疾病(例如,神经学疾病)的药物或化合物。在某些实施方案中,结合剂包括未经FDA批准用于临床应用、但已在一项或多项临床试验中经过试验、当前正在一项或多项临床试验中进行试验和/或预期在一项或多项临床试

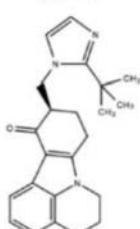
验中进行试验的药物或化合物。在某些实施方案中,结合剂包括未经FDA批准用于临床应用、但常规地用在实验室研究中的药物或化合物。在某些实施方案中,结合剂是前述药剂之一的类似物。在特定实施方案中,结合剂选自表2-9中的药剂中的任一种。在某些实施方案中,所述结合剂选自由以下成员组成的集合:AZD0328、ABT-126、AQW-051、大麻二酚、西兰司琼、PH-399733、FACINICLINE/RG3487/MEM-3454、TC-6987、APN-1125和TC-5619/AT-101。在某些实施方案中,所述结合剂选自由以下成员组成的集合:ABT-126、AZD-0328、APN-1125、RG3487、TC-6987和TC-5619。

[0197] 在特定实施方案中,所述结合剂是西兰司琼的类似物,例如由以下化合物式2-7之一所描述,处于其R或S对映异构体:

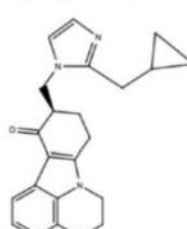
化合物 1 = 西兰司琼
(-CH₃)



化合物 2
(-tBu)

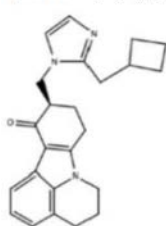


化合物 3
(-CH₂-环丙基)

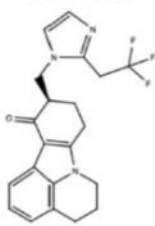


[0198]

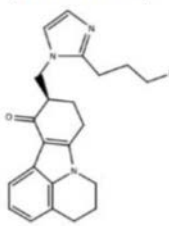
化合物 4
(-CH₂-环丁基)



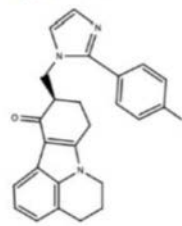
化合物 5
(-CH₂CF₃)



化合物 6
(-CH₂CH₂CH₂F)



化合物 7
(-p-F-苯基)



[0199] 在某些实施方案中,所述结合剂充当激动剂。本文中使用的术语“激动剂”表示诱导信号传递应答的配体或结合剂。在某些实施方案中,所述结合剂充当拮抗剂。术语拮抗剂在本文中用于表示抑制信号传递应答的药剂。

[0200] 在某些实施方案中,所述结合剂是抗焦虑剂、抗惊厥剂、抗抑郁剂、抗精神病剂、止吐剂、益智剂、抗生素、抗真菌剂、抗病毒剂或抗寄生虫剂。

[0201] 表2:甘氨酸受体 (GlyR) 的结合剂

激动剂		调节剂/结合剂	拮抗剂	
银杏内酯	L-丝氨酸	加维斯替奈	468816	林旦
大麻二酚	MDL-27531	氟烷	ACEA-2085	MDL-100748

[0202]

[0203]

D-丙氨酸	甲氧氟烷		荷包牡丹碱	MDL-102288
D-丝氨酸	米拉醋胺		布鲁生	MDL-105519
地氟烷	莫昔克丁		咖啡因	PD-165650
多拉克汀	NRX-1050		加维斯替奈	印防己毒素
依马菌素	NRX-1060		银杏树	士的宁
依立诺克丁	P-9939		GV-196771	硫秋水仙苷
乙醇	Quisqualamine		GW 468816	羟基马桑毒素 (Tutin)
甘氨酸	雷帕替奈		HMR-2371	UK-315716
亚牛磺酸	S-18841		L-695902	ZD-9379
异氟烷	肌氨酸		L-701324	
伊维菌素	七氟烷			
L-丙氨酸	牛磺酸			
L-脯氨酸	β -丙氨酸			

[0204] 表3: λ -氨基丁酸A受体 (GABA-A) 的结合剂

[0205]

激动剂	调节剂/结合剂			拮抗剂
3-酰基-4-喹 诺酮	(-)-表没食子-儿 茶素-3-没食子 酸盐	依替福辛	戊巴比妥	(±)-顺式-(3-氨基环戊 基) 丁基次膦酸
阿坎酸	10-甲氧基-麻 醉椒素	依替唑仑	培曲氯醛	(S)-(4-氨基环戊-1-烯 基)丁基次膦酸
阿法多龙	11-羟基-麻 醉椒素	依托咪酯	PF- 4480682	阿莫沙平
巴马鲁唑	11-甲氧基-12- 羟基-脱氢醉椒 素	Evt-201	芬纳西洋	荷包牡丹碱
巴米沙尼	11-甲氧基-麻 醉椒素	法西普隆	苯巴比妥	CGP-36742 (3-氨基 丙基-正丁基-次膦酸)
溴他西尼	123i-碘西尼	Fg-8205	匹那西洋	氟马西尼
CACA	2-氧代夸西洋	氟乙西洋	哌夸林	Gabazine
CAMP	3-羟基-芬纳西 泮	Flubromaz epam	匹伐西洋	银杏树
CP-409092	5-羟基醉椒素	Flubromaz olam	溴化钾	林旦

[0206]

激动剂	调节剂/结合剂			拮抗剂
多拉克汀	5,6-脱氢-麻醉 椒苦素	氟地西洋	普拉西洋	美索比妥
依马菌素	5,6-二氢-麻醉 椒素	氟马西尼	普瑞西洋	印防己毒素
依立诺克丁	5,6,7,8-四氢-麻 醉椒素	氟硝西洋	扑米酮	SKF-97541 (3-氨基丙 基 (甲基)次膦酸)
左旋佐匹克 隆	7,8-二氢醉椒素	氟西洋	丙氟西洋	TPMPA
乙醇	7,8-二氢-麻醉 椒苦素	氟他唑仑	丙泮尼地	ZAPA ((Z)-3-[(氨基 亚氨基甲基)硫基]丙- 2-烯酸)
依托咪酯	7,8-二氢-麻醉 椒素	氟替马西 泮	丙泊酚	
氟硝西洋	阿贝卡奈	氟托西洋	PWZ- 007A	
GABA	阿地唑仑	膦西洋	PWZ- 009A1	
Gabamide	阿洛巴比妥	磷丙泊酚	Pwz-029	
GABOB	别-孕烷醇酮	加奈索酮	Pyrazolam	
加波沙多	Alphaxolone	Gbld-345	PZ-II-028	
γ 羟基丁酸	烯丙苯巴比妥	吉多卡尔	PZ-II-029	
格鲁米特	阿吡坦	Gidazepa m	Qh-Ii-66	
鹅膏蕈氨酸	阿普唑仑	吉立索泮	夸西洋	
米达西尼	阿曼托黄素	格鲁米特	巴比妥酸 奎尼丁	
异氟烷	异戊巴比妥	Gyki- 52466	瑞氟西洋	
异去甲槟榔 次碱	芹菜素	Gyki- 52895	瑞马唑仑	
异吖啶甲酸	烯丙异丙巴比 妥	哈拉西洋	利马扎封	
伊维菌素	阿芬达占	卤沙唑仑	利帕西洋	

[0207]

激动剂	调节剂/结合剂			拮抗剂
L-830982	阿维扎封	庚巴比妥	Ro15-4513	
甲丙氨酯	AZD7325	海索比妥	Ro48-6791	
甲氧氟烷	黄芩黄素	伊氯西泮	Ro48-8684	
MK-0777/L83098	黄芩苷	米达西尼	Ro493858 1	
甲乙哌酮	巴比妥	茚地普隆	Rwj-51204	
莫昔克丁	巴比妥酸衍生物	Irazepine	沙立吡旦	
蝇蕈醇	苯他西泮	醉椒素	沙马西尼	
N4-氯乙酰基-胞嘧啶阿糖胞苷	溴烯比妥	Kenazepine	Sb-205,384	
帕戈隆	溴他西尼	凯他唑仑	野黄芩黄素	
菲尼布特	溴西泮	L-655708	司可巴比妥	
匹卡米隆	溴替唑仑	L-838,417	七氟烷	
哌嗪	布他比妥	铜	Sh-053-R-Ch3-2'F	
哌啶-4-磺酸	正丁巴比妥	LAU 156	黄芩黄酮 II	
普罗加胺	丁巴比妥	LAU 157	SI-651,498	
QH-ii-066	卡马西泮	LAU 159	异戊巴比妥钠	
Quisqualamine	卡布西泮	LAU 161	戊硫巴比妥钠	
七氟烷	卡立普多	LAU 162	司替戊醇	
SL 75102	CGS 20625	LAU 163	硫西泮	
SL-651,498	CGS 20625	LAU 176	双乙磺丙烷	
硫戊巴比妥	CGS 8216	LAU 177	舒普罗酮	
硫蝇蕈醇	CGS 9895	LAU 206	舒立克隆	
托加比特	CGS 9896	洛芬达占	Sx-3228	

[0208]

激动剂	调节剂/结合剂			拮抗剂
托吡酯	水合氯醛	氯吡西洋	他仑帕奈	
唑吡坦	氯醛糖	氯普唑仑	他布比妥	
$\alpha 51A$	氯氮卓	劳拉西洋	他尼普隆	
	氯美扎酮	劳氨酯	替马西洋	
	氯仿	氯瑞唑	四氢西洋	
	环氯唑仑	Lorediplon	四乙眠矾	
	Cinazepam	氯甲西洋	四氢去氧皮质酮	
	西诺西洋	甲氯西洋	茶氨酸	
	Cl-218,872	美达西洋	硫戊巴比妥	
	克拉唑仑	甲硝西洋	噻吩并-二氮杂环庚三烯	
	氯马唑仑	甲苯比妥	硫喷妥	
	氯巴占	甲丙氨酯	托非索泮	
	氯美噻唑	美他西洋	甲磺西洋	
	氯硝西洋	甲喹酮	Tp-003	
	氯 萘 唑 啉 (Clonazepam)	美沙比妥	Tp-13	
	氯拉卓酸	美索比妥	Tpa-023	
	氯噻西洋	甲基-苯巴比妥	三唑仑	
	氯噁唑仑	甲乙哌酮	三氟巴占	
	Cp-1414s	麻醉椒苦素	Triflunordazepam	
	CTP-354	甲噻噁唑啉 (Metizolam)	曲硇那	
	环己巴比妥	美沙唑仑	妥氯西洋	
	环丙西洋	咪达唑仑	乌达西洋	
	地洛西洋	莫曲西洋	缬草烯酸	

[0209]

激动剂	调节剂/结合剂			拮抗剂
	地莫西泮	N-去烷基-氟西泮	戊酸	
	去氯-依替唑仑	奈可吡旦	汉黄芩素	
	去甲氧基-麻醉椒素	奈立索泮	XHe-II-006	
	去甲基-氟硝西泮	烟碱酸	XHe-II-019	
	地西泮	烟酰胺	XHe-II-087c	
	氯地西泮	Nifoxipam	XHe-II-094	
	乙醚	尼美西泮	XHe-II-098b	
	二氢-麦角毒碱	硝西泮	XHe-II-17	
	巴比妥酸双氢奎尼丁	Nitrazepate	XHe-III-006c	
	地普喹酮	Nitrazolam	XHe-III-063	
	地伐普隆	去甲西泮	XHe-III-24	
	度氟西泮	诺替西泮	XHe/ON-I	
	Elb-139	Ns-2664	Y-23684	
	依法西泮	Ns-2710	麻醉椒素	
	艾司唑仑	奥西普隆	扎来普隆	
	左旋佐匹克隆	木蝴蝶素A	扎吡唑仑	
	依他喹酮	奥沙西泮	锌	
	依他西平	奥沙唑仑	Zk-93423	
	依他唑酯	帕戈隆	唑拉西泮	
	氨酰氟安定乙酯	帕那普隆	唑吡坦	
	地卓乙酯	帕秦克隆	唑美巴占	
	西泮酸乙酯	PB-XHe	佐匹克隆	

[0210] 表4:5-羟基色胺受体 (5-HT₃) 的结合剂

[0211]

激动剂	调节剂/ 结合剂	拮抗剂	
2-甲基-5-HT	5-氯吲哚	吲哚-3-甲酸 3-苄基 烷基酯	米安色林
α -甲基色胺	曲米帕明	Adr-851	马来酸米立司琼
蟾蜍特宁		Adr-882	米氮平
氯苯基-双胍		阿洛司琼	MI-1035
西沙必利		阿莫沙平	Mm-218
DDP733		安吡托林	N-3256
乙醇		阿立哌唑	奈安匹坦
乙醇		AS-8112	奥氮平
伊波加因碱		阿扎司琼	昂丹司琼
甲氧氯普胺		巴他必利	Org-4419
苯基双胍		Bimu-1	Org-4419-2
喹啉嗪		氯普鲁卡因	帕洛诺司琼
RS-56812		西兰司琼	泮考必利
SR-57227		氯氮平	普鲁卡因
他喷他多		Cp-81386	喹硫平
伐尼克兰		Cp-93318	R-093777
YM-31636		Cr-3124	R-扎考必利
		DA-9701	雷莫司琼
		Daizac	伦扎必利
		Dat-582	Rg-12915
		Dau-6285	利卡司琼
		Ddp-225	罗库溴铵
		多拉司琼	Rs-16566
		E-3620	Rs-33800
		法贝司琼	Rs-56532
		Facinicline/RG3487 盐酸盐	Rs-56812
		加丹司琼	S-21007
		胃动力药	Sc-50410
		Gk-128	Sc-52150
		Gr-65630	Sc-52246

[0212]

激动剂	调节剂/ 结合剂	拮抗剂	
		格拉司琼	Sc-52491
		Gyki-46903	Sc-54750
		伊他司琼	Sdz-Icm-567
		Kb-6806	Sep-226332
		Kf-18259	Srss-021
		Kf-20170	Tedatioxetine
		Kga-0941	侧柏酮
		L-683877	托吡酯
		拉莫三嗪	托烷司琼
		来立司琼	筒箭毒碱
		林托必利	Tzb-30878
		利托西汀	Va-21B7
		洛沙平	Vi-0134
		卢罗司琼	沃替西汀
		Ly-278584	氢溴酸沃替西汀
		M1, 莫沙必利的主要活性代谢物	Way-100289
		Mci-225	Ym-114
		Mci-225	Ym-26103-2
		美金刚	Ym-26308-2
		薄荷醇	扎考必利
		美沙酮	扎托司琼
		甲氧氯普胺	齐拉西酮

[0213] 表5: 烟碱乙酰胆碱受体 (nAChR) 的结合剂

[0214]

激动剂	调节剂/结合剂	拮抗剂
(+)-N-(1-氮杂双环[2.2.2]辛-3-基)苯并[b]呋喃-2-甲酰胺	A-867744	(-)-7-甲基-2-外-[3'-(6-[18F]氟代吡啶-2-基)-5'-吡啶基]-7-氮杂双环[2.2.1]庚烷
3-溴野靛碱	AQW-051	2-氟-3-(4-硝基-苯基)去氯地棘蛙素
A-366,833	AVL-3288	Acv-1

[0215]

激动剂	调节剂/结合剂	拮抗剂
A-582941	Desformylflustrabromine	ACVx
A-82695	乙醇	异戊巴比妥
A-84,543	加兰他敏	大麻素
ABT-089	伊维菌素	Anq-9040
ABT-126	奈非西坦	烯丙异丙巴比妥
Abt-202	NS-1738	ATG-001
ABT-418	NS-9283	ATG003
Abt-418	PNU-120,596	苯磺酸阿曲库铵
Abt-560	四乙基铵	巴比妥
ABT-894		巴比妥酸衍生物
乙酰胆碱		比哌立登
阿替克林		安非他酮
阿替克林		仲丁比妥
氨基乙氧基吡啶		布他比妥
八角枫碱		正丁巴比妥
AR-R17779		氯普鲁卡因
Asm-024		苯磺顺阿曲库铵
AZD-0328		苯磺酸顺阿曲库胺
盐酸安非他酮		乌药碱
卡巴胆碱		去氢去甲氯胺酮
胆碱		氟化安非他酮
Cm-2433		右美沙芬
CP-601927		多库氯铵
CP-601932		乙醇
Cp-810123		戈拉碘铵
野靛碱		庚巴比妥
DBO-83		海索比妥
癸烷双胺		羟基安非他酮
二氯克兰		羟基去甲氯胺酮
二氯克兰		依那立松
Encenicline		埃他卡林
地棘蛙素		异氟烷
EVP-6124		氯胺酮

[0216]

激动剂	调节剂/结合剂	拮抗剂
Evp-6124		犬尿烯酸
加兰他敏		左醋美沙多
GTS-21		洛贝林
Gts-21		美卡拉明
ICH-3		美卡拉明
Ispronidine		美金刚
左旋咪唑		美沙酮
洛贝林		美沙比妥
硫酸洛贝林		甲基牛扁亭碱
Mem-3454		甲基苯巴比妥
MEM-63908		甲筒箭毒
Mem-63908		碘甲筒箭毒
N-(3-吡啶基)-桥连的二 环二胺		米伐克龙
烟碱		奈拉美生
PH-399733		Nic-002
Ph-399733		氧化亚氮
PHA-543,613		去甲氯胺酮
Pha-543613		Org-9991
PHA-709829		双哌雄双酯
PNU-282,987		戊巴比妥
Pnu-282987		安血定
Pozanidine		苯巴比妥
Pozanidine		哌库铵
Rivanidine		哌库铵
Rivanidine		PNU-120,596
Rjr-1401		扑米酮
Sar-130479		普鲁卡因
Sazetidine A		喹诺里西啉(-)-1-表-207I
Sib-1663		RJR-2531
Sib-1765f		罗库溴铵
Sib-3182		RPI-78M
Sofinidine		司可巴比妥

[0217]

激动剂	调节剂/结合剂	拮抗剂
SSR-180,711		他布比妥
琥珀胆碱		硫喷妥
Suvn-F90101		曲美芬
Suvn-F91201		筒箭毒碱
他克林-石杉碱甲		U-2902
TC-1698		维库溴铵
TC-1827		α -银环蛇毒素
Tc-2216		α -芋螺毒素
Tc-2403		
Tc-2429		
Tc-2559		
Tc-2696		
TC-5619		
Tebanicline		
托烷司琼		
Ub-165		
伐尼克兰		
WAY-317,538		
APN-1125		

[0218] 表6:ATP-门控的P2X受体阳离子通道(P2X)的结合剂

[0219]

激动剂	调节剂/结合剂	拮抗剂	
ATP	伊维菌素	4-苯甲酰基-1-取代的-咪唑-2-酮类	MK-801
BzATP		5-甲基-6,7-二氢-5H环五吡嗪	MRS2159
α,β -meATP		5-氧代-3-吡咯烷甲酰胺类	NF023
		5,6,7,8-四氢吡啶并[4,3,d]-嘧啶类	NF279
		A-317491	NF449
		阿米替林	去甲替林
		氮杂吡啶-3-甲酰胺类	氧代异喹啉羧酰胺类

[0220]

激动剂	调节剂 /结合剂	拮抗剂	
		AZD-9056	帕罗西汀
		苯甲酰胺 6	哌嗪类
		苯并呋喃并-1,4-二氮 杂环庚三烯-2-酮类	多环鸟嘌呤类
		苯并咪唑类	PPADS
		联芳基苯甲酰胺类	PPNDS
		羧酰胺类	吡唑并-[1,5,a]-吡啶 羧酰胺类
		CE-224535	哒嗪酮类
		地昔帕明	吡哆醛-5-磷酸
		二氨基吡啶类	吡咯啉酮类
		多塞平	吡咯并-[2,3,b]-吡啶 羧酰胺类
		醋酸艾司利卡西平	吡咯并嘧啶-7-酮类
		EVT-401	喹啉羧酰胺类
		氟西汀	RO-3
		透明质酸衍生物	RO-4
		丙米嗪	RO-51
		吲哚羧酰胺类	Spinorphins
		吲哚-3-甲酰胺类	舒拉明
		Ip5I	四氢-2H-1,2-噻嗪 1,1-二氧化物
		异喹啉羧酰胺类	TNP-ATP
		异噻唑烷 1,1-二氧化 物	

[0221] 表7:内向整流钾通道 (Kir) 的结合剂

[0222]

激动剂	调节剂/结合剂	拮抗剂
二氮嗪		醋酸己脲
埃他卡林		氯磺丁脲
米诺地尔		氯磺丙脲
尼可地尔		格列本脲
4,5-二磷酸磷脂酰肌醇		格列本脲

[0223]

激动剂	调节剂/结合剂	拮抗剂
吡那地尔		格列波脉
		格列齐特
		格列美脉
		格列吡嗪
		格列喹酮
		格列派特
		格列本脉
		格列吡脉
		格列环脉
		美他己脉
		妥拉磺脉
		甲苯磺丁脉
		甲磺环己脉

[0224] 表8: 电位依赖性钾通道 (KCNQ/Kv7) 的结合剂

[0225]

激动剂	调节剂/结合剂	拮抗剂
二氮嗪		阿齐利特
氟吡汀		胺碘酮
米诺地尔		溴苄胺
尼可地尔		氯非铵
吡那地尔		达伐吡啶
瑞替加滨		多非利特
		E-4031
		伊布利特
		尼非卡兰
		司美利特
		索他洛尔
		磺酰脲类
		替地沙米

[0226] 表9: 囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR) 的结合剂

[0227]

激动剂	调节剂/结合剂	拮抗剂
	8-环戊基-1,3-二丙基黄嘌呤	布美他尼
	8-甲氧基补骨脂素	Crofelemer
	芹菜素	格列本脉

[0228]	激动剂	调节剂/结合剂	拮抗剂
		CTP-656	布洛芬
		染料木黄酮	
		IBMX	
		依伐卡托	
		卢马卡托	

[0229] E. 多核苷酸

[0230] 在不同的示例性实施方案中，本公开内容部分地涵盖了多核苷酸、编码经工程改造的受体多肽(包括LGIC、及其亚基和突变蛋白以及融合多肽)的多核苷酸、病毒载体多核苷酸和包含它们的组合物。

[0231] 本文中使用的术语“多核苷酸”、“核苷酸”、“核苷酸序列”或“核酸”互换使用。它们表示任何长度的核苷酸(脱氧核苷酸或核糖核苷酸或其类似物)的聚合形式。多核苷酸可以具有任何三维结构，并且可以执行任何已知或未知的功能。以下是多核苷酸的非限制性例子：基因或基因片段的编码或非编码区、由连锁分析定义的多个基因座(单个基因座)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微-RNA(miRNA)、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含一个或多个经修饰的核苷酸，诸如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在的话，可以在聚合物的组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。聚合后可以进一步修饰多核苷酸，诸如通过与标记组分缀合。多核苷酸可以是脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或DNA/RNA杂交体。多核苷酸可以是单链的或双链的。多核苷酸包括、但不限于：前信使RNA(前-mRNA)、信使RNA(mRNA)、RNA、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)、核酶、合成的RNA、基因组RNA(gRNA)、正链RNA(RNA(+))、负链RNA(RNA(-))、合成的RNA、基因组DNA(gDNA)、PCR扩增的DNA、互补DNA(cDNA)、合成的DNA或重组DNA。多核苷酸表示长度为至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少50个、至少100个、至少200个、至少300个、至少400个、至少500个、至少1000个、至少5000个、至少10000个或至少15000个或更多个核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核苷酸或者任一类型的核苷酸的经修饰形式)以及所有中间长度的核苷酸的聚合形式。将容易理解，在该背景下，“中间长度”是指在引用值之间的任何长度，诸如6、7、8、9等；101、102、103等；151、152、153等；201、202、203等。在特定实施方案中，多核苷酸或变体与本文描述的或本领域已知的参考序列具有至少或约50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性，通常其中所述变体维持参考序列的至少一种生物活性，除非另有说明。

[0232] 本文中使用的术语“基因”可以表示包含增强子、启动子、内含子、外显子等的多核苷酸序列。在特定实施方案中，术语“基因”表示编码多肽的多核苷酸序列，不论所述多核苷酸序列与编码多肽的基因组序列是否相同。

[0233] 本文中使用的“顺式作用序列”、“顺式作用调节序列”或“顺式作用核苷酸序列”或等同术语表示与基因的表达(例如转录和/或翻译)相关联的多核苷酸序列。在一个实施方案中,顺式作用序列调节转录,因为它是抑制或减少转录的多肽的结合位点或与有助于转录抑制的转录因子结合位点相关联的多核苷酸序列。调节多核苷酸序列的表达并且可以与本公开内容的多核苷酸可操作地连接以调节主题经工程改造的受体的表达的顺式作用序列的例子是本领域众所周知的,并且包括诸如启动子序列(例如CAG、CMV、SYN、CamKII、TRPV1)、Kozak序列、增强子、转录后调节元件、miRNA结合元件和多腺苷酸化序列等元件。

[0234] 作为一个非限制性例子,启动子序列是能够结合细胞中的RNA聚合酶并且引发下游(3'方向)编码序列的转录的DNA调节区。为了限定本发明的目的,启动子序列在其3'末端处由转录起始位点结合,且向上游(5'方向)延伸以包括在背景以上可检测的水平起始转录所需的最小数目的碱基或元件。在启动子序列内将发现转录起始位点以及负责结合RNA聚合酶的蛋白结合结构域。真核启动子通常但不一定含有“TATA”框和“CAT”框。各个启动子可以用于驱动本发明的各种载体。例如,启动子可以是组成活性的启动子,即在不存在外部施加的药剂的情况下有活性的启动子,例如,CMV IE1启动子、SV40启动子、GAPDH启动子、肌动蛋白启动子。启动子可以是诱导型启动子,即在将药剂应用于细胞后其活性被调节的启动子,例如多西环素,tet-on或tet-off启动子、雌激素受体启动子等。启动子可以是组织特异性启动子,即对某些类型的细胞有活性的启动子。

[0235] 在某些实施方案中,所述启动子在可兴奋细胞中有活性。“可兴奋细胞”意指通过膜电位的变化而被活化的细胞,例如神经元或肌细胞,例如背根神经节神经元、运动神经元、兴奋性神经元、抑制性神经元或感觉神经元。在将可用于本发明的多核苷酸组合物中的可兴奋细胞中有活性的启动子将包括神经元启动子,例如,突触蛋白(SYN)、TRPV1、Na_v1.7、Na_v1.8、Na_v1.9、CamKII、NSE和Advillin启动子;肌细胞启动子,例如结蛋白(Des)、 α -肌球蛋白重链(α -MHC)、肌球蛋白轻链2(MLC-2)和心肌肌钙蛋白C(cTnC)启动子;以及普遍存在的作用启动子,例如CAG、CBA、E1Fa、Ubc、CMV和SV40启动子。

[0236] 本文中使用的“用于诱导型表达的调节元件”表示这样的多核苷酸序列:其为可操作地连接至待表达的多核苷酸并且对结合所述元件的分子的存在或不存在做出应答以增加(开启)或减少(关闭)与其可操作地连接的多核苷酸的表达的启动子、增强子或其功能片段。用于诱导型表达的示例性调节元件包括、但不限于四环素应答性启动子、蜕皮激素应答性启动子、cumate应答性启动子、糖皮质激素应答性启动子、雌激素应答性启动子、RU-486应答性启动子、PPAR- γ 启动子和过氧化物诱导型启动子。

[0237] “用于瞬时表达的调节元件”表示可以用于简短或暂时表达多核苷酸核苷酸序列的多核苷酸序列。在特定实施方案中,用于瞬时表达的一种或多种调节元件可以用于限制多核苷酸的持续时间。在某些实施方案中,多核苷酸表达的优选持续时间是在数分钟、数小时或数天的量级。用于瞬时表达的示例性调节元件包括、但不限于核酸酶靶位点、重组酶识别位点和抑制性RNA靶位点。另外,在某种程度上,在特定实施方案中,用于诱导型表达的调节元件还可以有助于控制多核苷酸表达的持续时间。

[0238] 本文中使用的术语“多核苷酸变体”和“变体”等表示表现出与参考多核苷酸序列的实质序列同一性的多核苷酸或在下文定义的严格条件下与参考序列杂交的多核苷酸。这些术语也涵盖通过添加、缺失、置换或修饰至少一个核苷酸而区别于参考多核苷酸的多核

苷酸。因此,术语“多核苷酸变体”和“变体”包括这样的多核苷酸:其中一个或多个核苷酸已经添加或缺失或修饰,或已经用不同的核苷酸替换。在这点上,在本领域中充分理解,可以对参考多核苷酸进行某些改变,包括突变、添加、缺失和置换,由此改变的多核苷酸保留参考多核苷酸的生物学功能或活性。在特定实施方案中,多核苷酸或变体与本文描述的或本领域已知的参考序列具有至少或约50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性,通常其中所述变体维持参考序列的至少一种生物活性,除非另有说明。

[0239] 在一个实施方案中,多核苷酸包含在严谨条件下与靶核酸序列杂交的核苷酸序列。在“严谨条件”下杂交描述了这样的杂交方案,其中彼此具有至少60%同一性的核苷酸序列保持杂交。通常,将严谨条件选择为在限定的离子强度和pH下比特定序列的热熔点(T_m)低约5°C。 T_m 是使50%的与靶序列互补的探针在平衡时与靶序列杂交时的温度(在确定的离子强度、pH和核酸浓度下)。由于靶序列通常过量存在,所以在 T_m ,50%的探针在平衡时被占用。

[0240] 本文中使用的叙述“序列同一性”或例如包含“与……具有50%同一性的序列”表示,在对比窗口上在逐个核苷酸的基础上或在逐个氨基酸的基础上序列具有同一性的程度。因此,可以如下计算“序列同一性百分比”:在对比窗口上对比两个最佳比对的序列,确定相同的核酸碱基(例如,A、T、C、G、I)或相同的氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)在两个序列中出现的位置的数目以得到匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以对比窗口中的位置总数(即,窗口大小),并将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。用于描述两个或多个多核苷酸或多肽之间的序列关系的术语包括“参考序列”、“对比窗”、“序列同一性”、“序列同一性百分比”和“实质同一性”。“参考序列”的长度是至少12个、有时15至18个、且通常至少25个单体单元,包括核苷酸和氨基酸残基。因为两个多核苷酸可以各自包含:(1)在两个多核苷酸之间相似的序列(即,只是完整多核苷酸序列的一部分),和(2)两个多核苷酸之间不同的序列,通常通过在“对比窗口”内对比两个多核苷酸的序列来在两个(或多个)多核苷酸之间进行序列对比,以鉴定和对比序列相似性的局部区域。“对比窗口”表示这样的概念区段:其具有至少6个、通常约50至约100个、更通常约100至约150个邻接位置,其中在将两个序列最佳对齐后,将序列与相同数目的邻接位置的参考序列进行对比。对于两个序列的最佳比对,对比窗口可以包含与参考序列(其不包含添加或缺失)相比约20%或更少的添加或缺失(即,间隙)。用于对齐对比窗口的序列的最佳比对可以如下进行:通过算法的计算机化实现(GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,见Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA)或通过目检和由选择的多种方法中的任一种产生的最佳比对(即导致在对比窗口内的最高百分比同源性)。还可以参考例如Altschul等人,1997, Nucl. Acids Res. 25:3389公开的程序的BLAST家族。关于序列分析的详细讨论,可以参见:Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology 的第19.3单元, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, 第15章。

[0241] 本文中使用的“分离的多核苷酸”表示已经从它在天然存在状态侧接的序列纯化的多核苷酸,例如,已经从通常与该片段相邻的序列除去的DNA片段。在特定实施方案中,

“分离的多核苷酸”表示互补DNA (cDNA)、重组DNA、或在自然界中不存在但已经通过人手制成的其它多核苷酸。

[0242] 描述多核苷酸方向的术语包括:5' (通常是多核苷酸的具有自由磷酸酯基团的一端) 和3' (通常是多核苷酸的具有自由羟基(OH) 基团的一端)。多核苷酸序列可以以5' 至3' 取向或3' 至5' 取向注解。对于DNA和mRNA,5' 至3' 链被命名为“有义”、“正”或“编码”链,因为其序列与前信使(前mRNA) 的序列相同[除了RNA中的尿嘧啶(U) 以外,在DNA中替代为胸腺嘧啶(T)]。对于DNA和mRNA,作为被RNA聚合酶转录的链的互补3' 至5' 链被命名为“模板”、“反义”、“负”或“非编码”链。本文中使用的术语“相反取向”表示以3' 至5' 取向书写的5' 至3' 序列或以5' 至3' 取向书写的3' 至5' 序列。

[0243] 术语“侧接”表示相对于所述序列在上游多核苷酸序列和/或下游多聚核苷酸序列(即,5' 和/或3') 之间的多核苷酸序列。例如,“侧接”两个其它元件(例如,ITR) 的序列指示,一个元件位于所述序列的5' 侧,并且另一个元件位于所述序列的3' 侧;但是,之间可能存在插入序列。

[0244] 术语“互补的”和“互补性”表示通过碱基配对规则相关的多核苷酸(即,核苷酸序列)。例如,DNA序列5' A G T C A T G 3' 的互补链是3' T C A G T A C 5'。后一个序列经常被写作5' 端在左侧并且3' 端在右侧的反向补体5' C A T G A C T 3'。与其反向互补体相同的序列被称为回文序列。互补性可以是“部分的”,其中核酸的碱基中仅一些碱基根据碱基配对规则是匹配的。或者,在核酸之间可以存在“完全”或“全”互补性。

[0245] 本文中使用的术语“核酸盒”或“表达盒”表示在较大多核苷酸(诸如载体) 内的多核苷酸序列,所述序列足以表达来自多核苷酸的一个或多个RNA。表达的RNA可以被翻译成蛋白,可以作为指导RNA或抑制性RNA起作用以靶向其它多核苷酸序列进行裂解和/或降解。在一个实施方案中,所述核酸盒含有一个或多个感兴趣的多核苷酸。在另一个实施方案中,所述核酸盒含有可操作地连接至一个或多个感兴趣的多核苷酸的一个或多个表达控制序列。多核苷酸包括感兴趣的多核苷酸。本文中使用的术语“感兴趣的多核苷酸”表示编码多肽或融合多肽的多核苷酸或充当抑制性多核苷酸的转录模板的多核苷酸,例如,LGIC、及其亚基和突变蛋白,如本文所涵盖的。在一个特定实施方案中,感兴趣的多核苷酸编码具有一种或多种酶活性(诸如核酸酶活性) 和/或染色质重塑或后天修饰活性的多肽或融合多肽。

[0246] 载体可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个核酸盒。在本公开内容的一个优选的实施方案中,核酸盒包含一个或多个表达控制序列(例如,在神经元细胞中可操作的启动子或增强子),其可操作地连接至编码经工程改造的受体(例如,LGIC、或其亚基或突变蛋白) 的多核苷酸。所述盒可以作为单个单元从其它多核苷酸序列(例如,质粒或病毒载体) 移除或插入到其它多核苷酸序列(例如,质粒或病毒载体) 中。

[0247] 在一个实施方案中,本文涵盖的多核苷酸包含1、2、3、4、5、6、7、8、9个或更多个核酸盒,其任何数目或组合可以呈相同或相反的取向。

[0248] 此外,本领域普通技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,许多核苷酸序列可以编码如本文所涵盖的多肽或其变体的片段。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列具有最小的同源性。尽管如此,本公开内容具体地涵盖了由于密码子选择的差异而变化的多核苷酸,例如针对人和/或灵长类动物密码子选择而优化的多核苷酸。在一个实施方案中,提供了包含特定等位基因序列的多核苷酸。等位基因是由于一个或多个突变(诸如

核苷酸的缺失、添加和/或置换)而改变的内源性多核苷酸序列。

[0249] F. 载体

[0250] 在本公开内容的某些方面,将核酸分子(即,编码经工程改造的受体的多核苷酸)递送给受试者。在某些情况下,将编码经工程改造的受体的核酸分子通过载体递送给受试者。在不同的实施方案中,载体包含本文涵盖的一个或多个多核苷酸序列。术语“载体”在本文中用于表示能够转移或运输另一个核酸分子的核酸分子。被转移的多核苷酸通常连接至(例如,插入)载体核酸分子。载体可以包括指导在细胞中自主复制的序列,或可以包括足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。载体可以将靶多核苷酸递送给生物体、细胞或细胞组分。在某些情况下,载体是表达载体。本文中使用的“表达载体”表示能够促进表达以及并入其中的多核苷酸的复制的载体,例如质粒。通常,待表达的核酸序列可操作地连接至顺式作用调节序列,例如启动子和/或增强子序列,并且受到启动子和/或增强子的转录调节控制。在特定情况下,载体用于将编码本公开内容的经工程改造的受体的核酸分子递送给受试者。

[0251] 在特定实施方案中,可以采用适合于将表达盒或编码经工程改造的受体的多核苷酸引入到神经元细胞中的任何载体。合适载体的示例性例子包括质粒(例如,DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌人工染色体和病毒载体。在某些情况下,载体是环状核酸,例如,质粒、BAC、PAC、YAC、粘粒、F粘粒等。在某些情况下,可以利用环状核酸分子将编码经工程改造的受体的核酸分子递送给受试者。例如,可以将编码经工程改造的受体的质粒DNA分子引入到受试者的细胞中,由此将编码经工程改造的受体的DNA序列转录为mRNA并且将mRNA“消息”翻译为蛋白产物。环状核酸载体通常将包括调节靶蛋白的表达的调节元件。例如,环状核酸载体可以包括任何数目的启动子、增强子、终止子、剪接信号、复制起点、起始信号等。

[0252] 在某些情况下,所述载体可以包括复制子。复制子可以是能够自我复制的任何核酸分子。在某些情况下,复制子是衍生自病毒的RNA复制子。可获得多种合适的病毒(例如, RNA病毒),包括、但不限于甲病毒、小RNA病毒、黄病毒、冠状病毒、瘟病毒、风疹病毒、杯状病毒和肝炎病毒。

[0253] 在某些实施方案中,所述载体是非病毒载体。“非病毒载体”是指不包含病毒衣壳或包膜的任何递送媒介物,例如脂质纳米颗粒(阴离子的(带负电荷的)、中性的或阳离子的(带正电荷的))、重金属纳米颗粒、基于聚合物的颗粒、质粒DNA、微环DNA、微载体DNA、ccDNA、合成的RNA、外核体等。通过本领域中充分理解的任何合适的方法,包括、例如纳米颗粒递送、颗粒轰击、电穿孔、声处理或显微注射,可以递送非病毒载体。参见,例如Chen等人.Mol. Therapy, Methods and Clinical Development. 2016年1月;第3卷,第1期;和Hardy, CE等人.Genes (Basel). 2017年2月;8(2):65。

[0254] 在其它实施方案中,所述载体是病毒载体。“病毒载体”意指包含围绕编码感兴趣的RNA或多肽的多核苷酸的病毒衣壳或包膜的递送媒介物。在某些情况下,病毒载体衍生自复制缺陷型病毒。适合于将本公开内容的核酸分子递送给受试者的病毒载体的非限制性例子包括衍生自腺病毒、逆转录病毒(例如,慢病毒)、腺相关病毒(AAV)和单纯疱疹-1(HSV-1)的那些。合适的病毒载体的示例性例子包括、但不限于,逆转录病毒载体(例如,慢病毒载体)、基于疱疹病毒的载体和基于细小病毒的载体(例如,基于腺相关病毒(AAV)的载体、AAV-腺病毒嵌合载体和基于腺病毒的载体)。

[0255] 本文中使用的术语“细小病毒属”涵盖所有细小病毒,包括自主复制的细小病毒和依赖病毒。自主性细小病毒包括细小病毒属(Parvovirus)、红细胞病毒属(Erythrovirus)、浓核病毒属(Densovirus)、艾特拉病毒属(Iteravirus)和康特拉病毒属(Contravirus)的成员。示例性自主性细小病毒包括、但不限于小鼠微小病毒、牛细小病毒、犬细小病毒、鸡细小病毒、猫泛白细胞减少病毒、猫细小病毒、鹅细小病毒和B19病毒。其它自主性细小病毒是本领域技术人员已知的。参见,例如,Fields等人,1996Virology,第2卷,第69章(第3版,Lippincott-Raven Publishers)。

[0256] 依赖病毒属含有腺相关病毒(AAV),包括、但不限于AAV 1型、AAV 2型、AAV 3型、AAV 4型、AAV 5型、AAV 6型、AAV 7型、AAV 8型、AAV 9型、AAV rh10型、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV和绵羊AAV。

[0257] 在一个优选的实施方案中,所述载体是AAV载体。在特定情况下,所述病毒载体是AAV-6或AAV-9载体。

[0258] 所有已知AAV血清型的基因组组构是类似的。AAV的基因组是小于约5,000个核苷酸(nt)长度的线性单链DNA分子。反向末端重复(ITR)侧接非结构复制(Rep)蛋白和结构(VP)蛋白的独特编码核苷酸序列。VP蛋白(VP1、-2和-3)形成衣壳并且有助于病毒的向性。末端145nt ITR是自互补的,并且被组织成使得形成T形发夹的能量上稳定的分子内双链体可以形成。这些发夹结构作为病毒DNA复制的起点起作用,从而充当细胞DNA聚合酶复合物的引物。在哺乳动物细胞中的野生型(wt)AAV感染以后,Rep基因被表达并且在病毒基因组的复制中起作用。

[0259] 在某些情况下,病毒载体的外部蛋白“衣壳”存在于自然界中,例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10。在特定情况下,衣壳被合成地工程改造(例如,通过定向进化或合理设计)以具有在自然界中不存在的某些独特特性,诸如改变的向性、增加的转导效率或免疫逃避。合理设计的衣壳的一个例子是在VP3病毒衣壳蛋白上一个或多个表面暴露的酪氨酸(Y)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和赖氨酸(K)残基的突变。其VP3衣壳蛋白已经合成地工程改造并且适合与本文提供的组合物和方法一起使用的病毒载体的非限制性例子包括:AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3(Y705+731F)、AAV5(Y436+693+719F)、AAV6(Y705+731F+T492V)、AAV8(Y733F)、AAV9(Y731F)和AAV10(Y733F)。已经通过定向进化进行工程改造并且适合与本文提供的组合物和方法一起使用的病毒载体的非限制性例子包括AAV-7m8和AAV-ShH10。

[0260] “重组细小病毒或AAV载体”(或“rAAV载体”)在本文中表示包含由一个或多个AAV ITR侧接的本文涵盖的一个或多个多核苷酸的载体。这样的多核苷酸被称为与ITR“异源”,因为这样的组合通常在自然界中不存在。当存在于正在表达AAV rep和cap基因产物(即,AAV Rep和Cap蛋白)的昆虫宿主细胞中时,这样的rAAV载体可以复制并且包装成感染性病毒颗粒。当将rAAV载体并入较大核酸构建体中(例如,在染色体中或在另一种载体诸如用于克隆或转染的质粒或杆状病毒中)时,那么rAAV载体通常被称为前载体(pro-vector),其可以在AAV包装功能和必要的辅助功能存在下通过复制和衣壳化来拯救”。

[0261] 在特定实施方案中,任何AAV ITR都可以用于AAV载体中,包括来自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15和AAV16的ITR。在一个优选的实施方案中,本文涵盖的AAV载体包含一个或多个AAV2 ITR。

[0262] 包含两个ITR的rAAV载体具有约4.4kB的有效负载容量。自互补的rAAV载体含有第三ITR并且包装载体的重组部分的两条链,从而对于本文涵盖的多核苷酸仅留下约2.1kB。在一个实施方案中,所述AAV载体是scAAV载体。

[0263] 使用双rAAV载体策略已经实现了大约是rAAV的包装容量的两倍的扩展包装容量(约9kB)。可用于产生本文涵盖的rAAV的双载体策略包括、但不限于剪接(反式剪接)、同源重组(重叠)或两者的组合(杂交)。在双AAV反式剪接策略中,将剪接供体(SD)信号放置于5'-半部分载体的3'端处,并且将剪接受体(SA)信号放置于3'-半部分载体的5'端处。在双AAV载体对同一细胞的共感染和反向末端重复(ITR)介导的两个半部分的头接尾连环化后,反式剪接导致成熟的mRNA和全尺寸蛋白的产生(Yan等人,2000)。反式剪接已成功用于在肌肉和视网膜中表达大基因(Reich等人,2003;Lai等人,2005)。可替换地,在双AAV载体中所含的大转基因表达盒的两个半部分可以含有同源重叠序列(在5'-半部分载体的3'末端和在3'-半部分载体的5'末端,双AAV重叠),所述同源重叠序列将介导通过同源重组对单个大基因组的重构(Duan等人,2001)。此策略取决于转基因重叠序列的引起重组的性能(Ghosh等人,2006)。第三个双AAV策略(杂交)是基于将来自外源基因(即,碱性磷酸酶;Ghosh等人,2008,Ghosh等人,2011))的高度引起重组的区域添加到反式剪接载体中。为了增加双AAV之间的重组,将添加的区域放置在5'-半部分载体中的SD信号的下流且在3'-半部分载体中的SA信号的上游。

[0264] “杂交AAV”或“杂交rAAV”表示用不同AAV血清型(以及优选地,来自一个或多个AAV ITR的不同血清型)的衣壳包装的rAAV基因组,并且可以在其它方面被称为假型rAAV。例如,rAAV 1型、rAAV 2型、rAAV 3型、rAAV 4型、rAAV 5型、rAAV 6型、rAAV 7型、rAAV 8型、rAAV 9型、rAAV 10型、rAAV 11型、rAAV 12型、rAAV 13型、rAAV 14型、rAAV 15型或rAAV 16型基因组可以被衣壳化在AAV 1型、AAV 2型、AAV 3型、AAV 4型、AAV 5型、AAV 6型、AAV 7型、AAV 8型、AAV 9型、AAV 10型、AAV 11型、AAV 12型、AAV 13型、AAV 14型、AAV 15型或AAV 16型衣壳或其变体内,前提条件是,AAV衣壳和基因组(以及优选地,一个或多个AAV ITR)属于不同的血清型。在某些实施方案中,假型rAAV颗粒可以称为属于“x/y”型,其中“x”指示ITR的来源,并且“y”指示衣壳的血清型,例如2/5rAAV颗粒具有来自AAV2的ITR和来自AAV6的衣壳。

[0265] “宿主细胞”包括用本公开内容的重组载体或多核苷酸在体内、离体或在体外转染、感染或转导的细胞。宿主细胞可以包括产生病毒的细胞和用病毒载体感染的细胞。在特定实施方案中,用本文涵盖的病毒载体在体内感染宿主细胞。在某些实施方案中,术语“靶细胞”与宿主细胞互换使用并且表示期望的细胞类型的受感染细胞。

[0266] 使用本领域已知的技术可以生产高滴度AAV制品,例如,如以下文献中所描述的:美国专利号5,658,776;6,566,118;6,989,264;和6,995,006;美国2006/0188484;W098/22607;W02005/072364;和W0/1999/011764;以及Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols,Machida编,Humana Press,2003;Samulski等人,(1989) J.Virology 63,3822;Xiao等人,(1998) J.Virology 72,2224;Inoue等人,(1998) J.Virol.72,7024。还已经报道了生产假型AAV载体的方法(例如,W0 00/28004),以及AAV载体的各种修饰或制剂,以在体内施用后降低其免疫原性(参见例如,W0 01/23001;W0 00/73316;W0 04/1 12727;W0 05/005610;W0 99/06562)。

[0267] 药物组合物

[0268] 还提供了药物制品,包括载体的药物制品和结合剂的药物制品。药物制品包括编码经工程改造的受体的主题多核苷酸(RNA或DNA)、携带编码主题经工程改造的受体的多核苷酸(RNA或DNA)的载体、或存在于药学上可接受的媒介物中的结合剂。“药学上可接受的媒介物”可以是这样的媒介物:其被联邦或州政府的管理机构批准,或在美国药典或用于哺乳动物(诸如人类)的其它普遍公认的药典中列出。术语“媒介物”表示本公开内容的化合物与其一起配制以施用给哺乳动物的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。这样的药物媒介物可以是液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些油,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。药物媒介物可以是盐水、金合欢树胶、明胶、淀粉糊剂、滑石粉、角蛋白、胶态二氧化硅、尿素等。另外,可以使用助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。当施用给哺乳动物时,本公开内容的化合物和组合物以及药学上可接受的媒介物、赋形剂或稀释剂可以是无菌的。在某些情况下,当将本公开内容的化合物静脉内地施用时,采用水性介质作为媒介物,诸如水、盐水溶液以及右旋糖水溶液和甘油水溶液。

[0269] 药物组合物可以采取胶囊剂、片剂、丸剂、小丸、锭剂、粉剂、颗粒剂、糖浆剂、酏剂、溶液剂、混悬液、乳剂、栓剂或其持续释放制剂的形式,或适合施用给哺乳动物的任何其它形式。在某些情况下,将药物组合物配制成用于根据常规程序施用,作为适于口服或静脉内施用给人类的药物组合物。合适的药物媒介物及其配制方法的例子描述在:Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Alfonso R.Gennaro编,Mack Publishing Co.Easton,Pa.,第19版,1995,第86、87、88、91和92章,通过引用并入本文。

[0270] 赋形剂的选择将部分地取决于特定载体以及用于施用组合物的特定方法。因此,存在本公开内容的药物组合物的多种合适制剂。

[0271] 例如,可以如下将载体配制成用于注射的制品:将它们溶解、悬浮或乳化于水性或非水性溶剂中,所述溶剂是例如植物油或其它类似的油、合成的脂肪族酸甘油酯、高级脂肪族酸的酯或丙二醇;和如果需要的话,用常规添加剂诸如增溶剂、等渗剂、助悬剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。

[0272] 作为另一个例子,可以将载体配制成适合于口服施用的制品,包括(a)液体溶液,诸如有效量的溶解在稀释剂(诸如水或盐水)中的化合物;(b)胶囊剂、药囊或片剂,每个含有预定量的活性成分,作为固体或颗粒;(c)在适当的液体中的混悬液;和(d)合适的乳剂。片剂形式可以包括下述的一种或多种:乳糖、甘露醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、阿拉伯胶、明胶、胶体二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸和其它赋形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、矫味剂和药理学上相容的赋形剂。锭剂形式可以包括在调味剂(通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)中的活性成分,以及包括在惰性基质(诸如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)中的活性成分的软锭剂,乳剂,凝胶,等,其除了活性成分之外还含有如本文描述的这样的赋形剂。

[0273] 作为另一个例子,可以将本公开内容的主题制剂制成气雾剂制剂以通过吸入施用。这些气雾剂制剂可以置于增压的可接受的推进剂(诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等)中。还可以将它们配制为用于非压力制品的药物,诸如用于用在喷雾器或雾化器中。

[0274] 在某些实施方案中,适合用于胃肠外施用的制剂包括:水性的和非水性的、等渗的无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、和使得所述制剂与预期接受者的血液等渗的溶质,以及水性的和非水性的无菌混悬液,其可以包括助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳

定剂和防腐剂。所述制剂可以存在于单位剂量或多次剂量密闭容器(诸如安瓿和管形瓶)中,并且可以在冷冻干燥(低压冻干)条件下储存,仅需要在即将使用前添加无菌液体赋形剂(例如水)以进行注射。可以从前面所述种类的无菌粉剂、颗粒和片剂制备即时注射溶液和混悬液。

[0275] 适合于局部施用的制剂可以呈现为乳膏剂、凝胶、糊剂或泡沫,其除了活性成分外还含有适当的载体。在某些实施方案中,局部制剂含有一种或多种选自构造剂、增稠剂或胶凝剂以及软化剂或润滑剂的组分。经常采用的构造剂包括长链醇,诸如硬脂醇,以及甘油基醚或酯和寡(环氧乙烷)醚或其酯。增稠剂和胶凝剂包括,例如,丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物及其酯,聚丙烯酰胺,以及天然存在的增稠剂诸如琼脂、角叉菜胶、明胶和瓜尔胶。软化剂的例子包括甘油三酯、脂肪酸酯和酰胺,蜡类诸如蜂蜡、鲸蜡或巴西棕榈蜡,磷脂诸如卵磷脂,和固醇及其脂肪酸酯。局部制剂可以进一步包括其它组分,例如,收敛剂、芳香剂、颜料、皮肤穿透增强剂、防晒剂(即,遮光剂)等。

[0276] 可以将本公开内容的化合物配制成用于局部施用。用于局部应用的媒介物可以呈多种形式之一,例如洗剂、乳膏剂、凝胶、软膏剂、棒、喷雾剂或糊剂。它们可以含有不同类型的载体,包括、但不限于溶液、气雾剂、乳剂、凝胶和脂质体。载体可以配制为例如具有水包油或油包水基质的乳剂。在乳剂中采用的合适疏水性(油性)组分包括例如植物油、动物脂肪和油、合成烃及其酯和醇(包括聚酯)以及有机聚硅氧烷油。这样的乳剂还包括乳化剂和/或表面活性剂,例如非离子型表面活性剂,以将不连续相分散和悬浮在连续相内。

[0277] 还通过与多种基质(诸如乳化基质或水溶性基质)混合来提供栓剂制剂。适合用于阴道施用的制剂可以呈现为子宫托、卫生栓、乳膏剂、凝胶、糊剂、泡沫。

[0278] 可提供用于口服或直肠施用的单位剂型,如糖浆剂、酏剂和混悬液,其中每个剂量单位(例如,一茶匙、一汤匙、一个片剂或一个栓剂)含有预定量的组合物,所述组合物含有一种或多种抑制剂。类似地,用于注射或静脉内施用的单位剂型可以包括在组合物中的抑制剂,所述组合物作为在无菌水、生理盐水或另一种药学上可接受的载体中的溶液。

[0279] 本文中使用的术语“单位剂型”表示适合作为用于人类和动物受试者的单位剂量的物理离散单元,每个单元含有与药学上可接受的稀释剂、载体或媒介物联合的预定量的本公开内容的化合物,所述预定量计算为足可产生希望的作用的量。本公开内容的新颖单位剂型的规范取决于所采用的特定化合物和要达到的效果以及与宿主体内的每种化合物相关的药效动力学。

[0280] 剂量水平可以随具体的化合物、递送媒介物的性质等而变化。给定化合物的期望剂量可通过多种方式容易地确定。

[0281] 在本公开内容的上下文中施用给动物(特别是人类)的剂量应当足以在合理的时间范围内在动物中实现预防性或治疗性应答,例如,如在下面更详细地描述的。剂量将取决于多种因素,包括所采用的特定化合物的强度、动物的状况和动物的体重、以及疾病的严重程度和疾病的阶段。剂量的大小还将取决于可能伴随特定化合物的施用的任何不利副作用的存在、性质和程度。

[0282] 在药物剂型中,ASC诱导物化合物可以以游离碱、它们的药学上可接受的盐的形式施用,或者它们也可以单独使用,或与其它药学活性化合物适当结合地以及联合地使用。

[0283] G. 临床应用和治疗方法

[0284] 本文公开的组合物和方法可以用于治疗神经学疾病或障碍。在本公开内容的某些方面,提供了治疗受试者中的神经学疾病或障碍的方法,所述方法包括:将经工程改造的受体引入神经元细胞和提供有效量的活化经工程改造的受体的配体以控制细胞的活性,从而减轻受试者的疼痛。在某些方面,将本文公开的载体或组合物用于制造药物,所述药物用于治疗神经学疾病或障碍。

[0285] 在某些情况下,将本公开内容的方法和组合物用于治疗癫痫。本文描述的组合物可以用于预防或控制癫痫发作。癫痫发作可以分为强直性-阵挛性、强直性、阵挛性、肌阵挛性、失神性或无张力性癫痫发作。在某些情况下,本文的组合物和方法可以预防癫痫发作或使受试者经历的癫痫发作的数目减少约5%、约10%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%。

[0286] 在某些情况下,将本公开内容的方法和组合物用于治疗进食障碍。进食障碍可能是由对受试者的身体或心理健康产生负面影响的异常进食行为限定的精神障碍。在某些情况下,进食障碍是神经性厌食。在其它情况下,进食障碍是神经性贪食。在某些情况下,进食障碍是异食癖、反刍性障碍、回避性/限制性食物摄入障碍、暴食症(BED)、其它指定的摄食和进食障碍(OSFED)、强迫性暴食、糖尿病性食欲亢进、健康食品偏执症、选择性进食障碍、酗酒厌食症、孕期食欲亢进(pregorexia)或美食者综合征。在某些情况下,所述组合物包括增加或减少与进食障碍相关的一种或多种分子的产生的G-蛋白偶联受体。在某些情况下,所述组合物包括改变与进食障碍相关的一种或多种分子的产生的配体门控的离子通道。与进食障碍相关的一种或多种分子可以包括、但不限于下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的分子,包括加压素、促皮质素-释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇、肾上腺素或去甲肾上腺素;以及血清素、多巴胺、神经肽Y、瘦素或Ghrelin。

[0287] 在某些情况下,所述组合物和方法用于治疗创伤后应激障碍(PTSD)、胃食管返流疾病(GERD)、成瘾(例如,酒精、药物)、焦虑症、抑郁症、记忆丧失、痴呆、睡眠呼吸暂停、中风、尿失禁、发作性睡病、特发性震颤、运动障碍、心房颤动、癌症(例如,脑瘤)、帕金森病或阿尔茨海默氏病。可以通过本文的组合物和方法治疗的神经学疾病或障碍的其它非限制性例子包括:丧志症、失写症、酒精中毒、失读症、动脉瘤、一过性黑矇、遗忘症、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、Angelman综合征、失语症、失用症、蛛网膜炎、阿诺德-基亚里畸形(Arnold-Chiari malformation)、阿斯佩格综合征、共济失调、运动失调性毛细血管扩张症、注意力缺陷伴多动障碍、言语听觉处理障碍、孤独症谱群、双相型障碍、贝尔麻痹、臂丛神经损伤、脑损伤、脑外伤、脑瘤、卡纳万病、卡普格拉妄想症、腕管综合征、灼性神经痛、中枢性疼痛综合征、脑桥中央髓鞘溶解、中央核肌病、头静脉障碍(Cephalic disorder)、脑动脉瘤、脑动脉硬化、大脑萎缩、常染色体显性遗传性脑动脉病伴皮质下梗死和白质脑病(CADASIL)、脑性巨人症、大脑性麻痹、脑血管炎、颈椎管狭窄症、腓骨肌萎缩症、小脑扁桃体下疝畸形、舞蹈病、慢性疲劳综合征、慢性炎症性脱髓鞘多神经病(CIDP)、慢性疼痛、科菲-劳里综合征(Coffin-Lowry syndrome)、昏迷、复杂性局部疼痛综合征、压迫性神经病、先天性双侧面部瘫、皮质基底核退化症、颅动脉炎、颅缝早闭症、克雅二氏症(Creutzfeldt-Jakob disease)、积累性损伤错乱、库欣综合征、循环型情感障碍、巨细胞包涵体病(CIBD)、巨细胞病毒感染、第四脑室孔闭塞综合征(Dandy-Walker syndrome)、道森病(Dawson disease)、

莫西耶氏综合征 (De Morsier's syndrome)、德热里纳-克隆普克麻痹 (Dejerine-Klumpke palsy)、德雅兰-索塔斯病 (Dejerine-Sottas disease)、睡眠时相延迟综合征、痴呆、皮炎、发育性共济障碍、糖尿病性神经病、弥漫性硬化、复视、唐氏综合征、Dravet综合征、杜兴肌营养不良、构音困难、自主神经机能异常、计算困难、书写困难、运动障碍、诵读困难、张力失常、空蝶鞍综合征、脑炎、脑膨出、脑三叉神经血管瘤病、大便失禁、遗尿症、癫痫、女性癫痫智力障碍、欧勃氏麻痹、红斑性肢痛病、爆炸头综合征、法布里病、法尔氏综合征、昏厥、家族性痉挛性麻痹、高热惊厥、菲希尔综合征、弗里德赖希氏共济失调、纤维肌痛、福维哥氏综合征、胎儿酒精综合征、脆性X综合征、脆性X相关性震颤/共济失调综合征 (FXTAS)、高歇氏病、全身性癫痫伴热性惊厥附加症、格斯特曼氏综合征 (Gerstmann's syndrome)、巨细胞动脉炎、巨细胞性包涵体病、球形细胞样脑白质病、灰质异位症、格-巴二氏综合征、广泛性焦虑障碍、HTLV-1相关脊髓病、蛋白球色素退变综合征、头部伤害、头痛、半面痉挛、遗传性痉挛性截瘫、多神经炎型遗传性共济失调、耳带状疱疹、带状疱疹、平山氏综合征 (Hirayama syndrome)、希什斯普隆氏病 (Hirschsprung's disease)、霍-艾二氏综合征 (Holmes-Adie syndrome)、前脑无裂畸形、亨廷顿病、积水性无脑、脑积水、皮质醇增多症、低氧、免疫介导的脑脊髓炎、包涵体肌炎、色素失调症、婴儿雷夫叙姆病、婴儿痉挛症、炎性肌病、颅内囊肿、颅内压增高、具同形双着丝粒15、朱伯特综合征、Karak综合征、卡恩斯-塞尔综合征、金斯布林纳综合征、克-列二氏综合征、Klippel Feil综合征、克拉伯病、拉福拉病、Lambert-Eaton肌无力综合征、Landau-Kleffner综合征、延髓外侧 (瓦伦伯格 (Wallenberg)) 综合征、学习障碍、利氏病 (Leigh's disease)、Lennox-Gastaut综合征、Lesch-Nyhan综合征、脑白质营养不良、白质消融性白质脑病、路易体痴呆、无脑回畸形、闭锁综合征、椎间盘疾病、腰椎椎管狭窄、莱姆病-神经后遗症、Machado-Joseph病 (脊髓小脑性共济失调3型)、巨脑、视物显大症、Mal de débarquement、巨脑性白质脑病伴皮质下囊肿、巨脑症、迈-罗二氏综合征 (Melkersson-Rosenthal syndrome)、梅尼埃病、脑膜炎、门克斯病、异染性脑白质营养不良、小头畸形、视物显小症、偏头痛、Miller Fisher综合征、小中风 (短暂性脑缺血发作)、恐音症、线粒体肌病、Mobius综合征、单肢肌萎缩、运动技能障碍、烟雾病、粘多糖累积病、多发梗塞性痴呆、多病灶运动神经病、多发性硬化、多系统萎缩、肌营养不良、肌痛性脑脊髓炎、重症肌无力、髓鞘碎裂性弥漫性硬化 (Myelinoclastic diffuse sclerosis)、婴儿肌阵挛性脑病、肌阵挛、肌病、肌管性肌病、先天性肌强直、发作性睡病、神经-贝赫切特病 (Neuro-Behçet's disease)、神经纤维瘤病、神经传导阻滞剂恶性综合征、AIDS的神经表现、狼疮的神经后遗症、神经性肌强直、神经元蜡样脂褐质沉积症、神经元移位症、神经病、神经机能病、Niemann-Pick病、非-24-小时睡眠-觉醒障碍、非语言学习障碍、O'Sullivan-McLeod综合征、枕神经痛、隐匿性脊柱神经管闭合不全序列症 (Occult Spinal Dysraphism Sequence)、Ohtahara综合征、橄榄体脑桥小脑萎缩、眼球阵挛肌阵挛综合征、视神经炎、直立性低血压、耳硬化症、过度使用综合征、视像存留、感觉异常、帕金森病、先天性副肌强直、副肿瘤疾病、阵发性发作、Parry-Romberg综合征、PANDAS、佩-梅二氏病、周期性麻痹、周围神经病、全身性发育迟缓、旋光性喷嚏反射、植烷酸贮积病、皮克病、神经受压、垂体肿瘤、PMG、多神经病、脊髓灰质炎、多小脑回、多肌炎、脑穿通畸形、脊髓灰质炎后综合征、带状疱疹后遗神经痛 (PHN)、直立性低血压、帕-魏二氏综合征、原发性侧索硬化、朊病毒病、进行性面部偏侧萎缩、进行性多灶性白质脑病、进行性核上性麻痹、面部失认、假脑瘤、象限盲、四

肢瘫痪、狂犬病、神经根病、拉姆齐·亨特综合征I型、拉姆齐·亨特综合征II型、拉姆齐·亨特综合征III型、Rasmussen脑炎、反射性神经血管营养不良、雷夫叙姆病、REM睡眠行为障碍、重复性应力损伤、不宁腿综合征、逆转录病毒-相关的脊髓病、瑞特综合征、瑞氏综合征、节律性运动障碍、龙贝里综合征、Saint Vitus舞蹈病(Saint Vitus dance)、桑德霍夫病、谢耳德病、脑裂畸形、感觉处理障碍、视-隔发育不良、惊吓婴儿综合征、带状疱疹、夏伊-德雷格综合征、舍格伦综合征、睡眠呼吸暂停、非洲锥虫病、Snatiation、Sotos综合征、痉挛状态、脊柱裂、脊髓损伤、脊髓肿瘤、脊髓性肌萎缩、脊髓延髓肌肉萎缩症、脊髓小脑性共济失调、脑裂、斯-里-奥三氏综合征(Steele-Richardson-Olszewski syndrome)、僵人综合征、中风、斯德奇-韦伯综合征、口吃、亚急性硬化性全脑炎、皮层下动脉硬化性脑病、浅表铁尘肺、西登哈姆舞蹈病、晕厥、牵连感觉、脊髓空洞症、跗管综合征、迟发性运动障碍、迟发性精神障碍、Tarlov囊肿、泰-萨克斯病、颞动脉炎、颞叶癫痫、破伤风、脊髓栓系综合征、肌强直性白内障、胸廓出口综合征、三叉神经痛、托德麻痹、多动秽语综合征、中毒性脑病、短暂性脑缺血发作、传播性海绵状脑病、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、震颤、拔毛癖、三叉神经痛、热带痉挛性轻截瘫、锥虫病、结节性硬化症、Unverricht-Lundborg病、希-林二氏病(VHL)、Viliuisk脑脊髓炎(VE)、瓦伦伯格氏综合征、韦斯特综合征、颈椎加速伸展性损伤、威廉斯综合征、威尔森氏病或脑肝肾综合征。

[0288] 在某些情况下,本文公开的组合物和方法可以用于治疗脑癌或脑肿瘤。可以适于用本文描述的载体和组合物治疗的脑癌或肿瘤的非限制性例子包括:神经胶质瘤,包括间变性星形细胞瘤(III级神经胶质瘤)、星形细胞瘤(II级神经胶质瘤)、脑干神经胶质瘤、室管膜瘤、神经节神经胶质瘤、神经节瘤、胶质母细胞瘤(IV级神经胶质瘤)、神经胶质瘤、青少年毛细胞性星形细胞瘤(JPA)、低级星形细胞瘤(LGA)、髓质母细胞瘤、混合性神经胶质瘤、少突神经胶质瘤、视神经神经胶质瘤、毛细胞性星形细胞瘤(I级神经胶质瘤)和原始性神经外胚层(PNET);颅底肿瘤,包括听神经瘤(前庭神经鞘瘤)、肢端肥大症、腺瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、颅咽管瘤、表皮样肿瘤、颈静脉球瘤、幕下脑膜瘤、脑膜瘤、垂体腺瘤、垂体瘤、Rathke氏裂囊肿(Rathke's cleft cyst);转移性癌症,包括脑转移、转移性脑肿瘤;其它脑肿瘤,包括脑囊肿、脉络丛乳头状瘤、CNS淋巴瘤、胶质囊肿、囊性肿瘤、皮样瘤、生殖细胞瘤、淋巴瘤、鼻咽癌、鼻咽肿瘤、松果体肿瘤、松果体母细胞瘤、松果体细胞瘤、幕上脑膜瘤和血管肿瘤;脊髓肿瘤,包括星形细胞瘤、室管膜瘤、脑膜瘤和许旺细胞瘤。

[0289] 本公开内容部分地涵盖了用于控制、管理、预防或治疗受试者的疼痛的组合物和方法。“疼痛”表示受试者身体的不舒服感受和/或不愉快感觉。疼痛的感觉可以在从轻度和偶发到严重和持续的范围内。疼痛可以分为急性疼痛或慢性疼痛。疼痛可以是伤害性疼痛(即,由组织损伤造成的疼痛)、神经性疼痛或心理性疼痛。在某些情况下,疼痛是由疾病(例如,癌症、关节炎、糖尿病)造成或与其相关。在其它情况下,疼痛是由损伤(例如,运动损伤、创伤)造成。适于用本文的组合物和方法治疗的疼痛的非限制性例子包括:神经性疼痛,包括周围神经病、糖尿病性神经病、疱疹后神经痛、三叉神经痛、背痛、与癌症相关的神经病、与HIV/AIDS相关的神经病、幻肢痛、腕管综合征、中枢性中风后疼痛、与慢性酒精中毒相关的疼痛、甲状腺功能减退、尿毒症、与多发性硬化相关的疼痛、与脊髓损伤相关的疼痛、与帕金森病相关的疼痛、癫痫、骨关节炎疼痛、风湿样关节炎疼痛、内脏痛以及与维生素缺乏症相关的疼痛;以及伤害性疼痛,包括与中枢神经系统创伤、劳损/扭伤和烧伤相关的疼痛;

心肌梗塞、急性胰腺炎、手术后疼痛、创伤后疼痛、肾绞痛、与癌症相关的疼痛、与纤维肌痛相关的疼痛、与腕管综合征相关的疼痛以及背痛。

[0290] 本文的组合物和方法可以用于减轻受试者的疼痛水平。在某些情况下,受试者的疼痛水平减轻了至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或约100%。可以通过多种方法来评估受试者的疼痛水平。在某些情况下,通过自我报告(即,人受试者表达他/她正在经历的疼痛水平的言语报告)来评估疼痛水平。在某些情况下,通过疼痛的行为指标来评估疼痛水平,例如,面部表情、肢体活动、发声、躁动和防卫。例如,当受试者不能自我报告(例如,婴儿、无意识的受试者、非人受试者)时,这些类型的评估可以是有用的。与用所述组合物治疗之前受试者正在经历的疼痛水平相比,可以在用本公开内容的组合物治疗之后评估疼痛水平。

[0291] 在不同的实施方案中,用于控制、管理、预防或治疗受试者的疼痛的方法包括给所述受试者施用有效量的本文涵盖的经工程改造的受体。不希望受任何特定理论约束,本公开内容涵盖了使用本文公开的载体来调节神经元活性以减轻受试者的疼痛。

[0292] 在不同的实施方案中,将编码经工程改造的受体(其活化或除极化神经元细胞)的载体施用给(或引入)减少痛觉的一个或多个神经元细胞,例如,抑制性中间神经元。在有配体存在下,表达经工程改造的受体的神经元细胞被活化并且减少对疼痛的敏感性,从而增强刺激这些神经元细胞的镇痛作用。

[0293] 在不同的实施方案中,将编码经工程改造的受体(其灭活或超极化神经元细胞)的载体施用给(或引入)增加痛觉或对疼痛的敏感性的一个或多个神经元细胞,例如,伤害感受器、周围感觉神经元、C-纤维、A δ 纤维、A β 纤维、DRG神经元、TGG神经元等。在有配体存在下,表达经工程改造的受体的神经元细胞被灭活并且减少对疼痛的敏感性,并且增强镇痛作用。

[0294] 将经工程改造的受体的表达靶向伤害感受器的亚群可以通过以下中的一种或多种实现:选择载体(例如,AAV1、AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3(Y705+731F)、AAV5、AAV5(Y436+693+719F)、AAV6、AAV6(VP3变体Y705F/Y731F/T492V)、AAV-7m8、AAV8、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV9(VP3变体Y731F)、AAV10(Y733F)和AAV-ShH10);选择启动子;和递送装置。

[0295] 在特定实施方案中,本文涵盖的组合物和方法有效减轻疼痛。适于用本文涵盖的载体、组合物和方法治疗的疼痛的示例性例子包括、但不限于急性疼痛、慢性疼痛、神经性疼痛、伤害性疼痛、痛觉超敏、炎症性疼痛、炎症性痛觉过敏、神经病、神经痛、糖尿病性神经病、人免疫缺陷病毒相关的神经病、神经损伤、风湿样关节炎疼痛、骨关节炎疼痛、烧伤、背痛、眼痛、内脏痛、癌症痛(例如,骨癌症痛)、牙痛、头痛、偏头痛、腕管综合征、纤维肌痛、神经炎、坐骨神经痛、骨盆超敏反应、骨盆痛、疱疹后神经痛、手术后疼痛、中风后疼痛和月经痛。

[0296] 疼痛可以分为急性或慢性。“急性疼痛”表示突然开始并且通常在品质上尖锐的疼痛。急性疼痛可能是轻度的并且仅持续片刻,或者可能是严重的并且持续数周或数月。在大多数情况下,急性疼痛不会持续超过三个月,并且当疼痛的根本原因已经得到治疗或已

经治愈时,它会消失。但是,未缓解的急性疼痛可能导致慢性疼痛。“慢性疼痛”表示进行中的或复发的疼痛、持续超过急性疾病或损伤的常见病程或持续超过三至六个月,并且其不利地影响个体的健康状况。在特定实施方案中,术语“慢性疼痛”表示在它不应该继续时继续的疼痛。慢性疼痛可以是伤害性疼痛或神经性疼痛。

[0297] 在某些实施方案中,预料或预期疼痛与损伤、感染或医学干预关联地或作为损伤、感染或医学干预的结果而发生。在某些实施方案中,所述感染造成神经损伤。在某些实施方案中,所述医学干预是手术,诸如对身体的中央轴的手术。在某些实施方案中,所述医学干预是除去体内的一个或多个组织、肿瘤或器官的部分或全部的手术。在某些实施方案中,所述医学干预是截肢术。在特定实施方案中,本文涵盖的组合物和方法有效减轻急性疼痛。在特定实施方案中,本文涵盖的组合物和方法有效减轻慢性疼痛。

[0298] 当在患者的症状中出现不适和异常敏感性特征时,会存在临床疼痛。个体可以呈现各种疼痛症状。这样的症状包括:1)自发性疼痛,其可以是钝痛、灼痛或刺痛;2)对有害刺激的过度疼痛应答(痛觉过敏);以及3)由通常无害的刺激产生的疼痛(痛觉超敏-Meyer等人,1994,Textbook of Pain,13-44)。尽管遭受各种形式的急性和慢性疼痛的患者可能具有类似的症状,但是根本机制可能不同,并且因此可能需要不同的治疗策略。因此,还可以根据不同的病理生理学将疼痛分成许多不同的亚型,包括伤害性疼痛、炎症性疼痛和神经性疼痛。

[0299] 在特定实施方案中,本文涵盖的组合物和方法有效减轻伤害性疼痛。在特定实施方案中,本文涵盖的组合物和方法有效减轻炎症性疼痛。在特定实施方案中,本文涵盖的组合物和方法有效减轻神经性疼痛。

[0300] 伤害性疼痛是由组织损伤或由可能引起损伤的强烈刺激诱导的。中度至重度急性伤害性疼痛是来自中枢神经系统创伤、劳损/扭伤、烧伤、心肌梗塞和急性胰腺炎、手术后疼痛(任何类型的外科手术后的疼痛)、创伤后疼痛、肾绞痛、癌症痛和背痛的疼痛的突出特征。癌症痛可以是慢性疼痛诸如肿瘤相关的疼痛(例如,骨痛、头痛、面部疼痛或内脏痛)或与癌症疗法相关的疼痛(例如,化学疗法后综合征、慢性手术后疼痛综合征或辐射后综合征)。癌症痛还可以响应于化学疗法、免疫疗法、激素疗法或放射疗法而发生。背痛可能是由于椎间盘突出或破裂或腰椎小平面关节、骶髂关节、脊柱旁肌肉或后纵韧带的异常所致。背痛可以自然消退,但在某些患者中,在背痛持续超过12周的情况下,背痛变成可能使人特别虚弱的慢性病症。

[0301] 神经性疼痛可以定义为由神经系统中的原发性病变或功能障碍引发或造成的疼痛。神经性疼痛的病因包括,例如,周围神经病、糖尿病性神经病、疱疹后神经痛、三叉神经痛、背痛、癌症神经病、HIV神经病、幻肢痛、腕管综合征、中枢性中风后疼痛以及与慢性酒精中毒、甲状腺功能减退、尿毒症、多发性硬化、脊髓损伤、帕金森病、癫痫和维生素缺乏相关的疼痛。

[0302] 神经性疼痛可以与疼痛障碍有关,术语疼痛障碍表示与疼痛相关或由疼痛造成的疾病、障碍或病症。疼痛障碍的示例性例子包括关节炎、痛觉超敏、典型三叉神经痛、三叉神经痛、躯体病样障碍、感觉减退、痛觉过敏(hypealgesia)、神经痛、神经炎、神经源性疼痛、痛觉缺失、痛性感觉缺失、灼痛(causalgia)、坐骨神经疼痛障碍、退化性关节障碍、纤维肌痛、内脏性疾病、慢性疼痛障碍、偏头痛/头痛、慢性疲劳综合症、复杂性局部疼痛综合征、神

经营养不良、足底筋膜炎或与癌症相关的疼痛。

[0303] 炎症性过程是复杂的一系列生化和细胞事件,它们响应于组织损伤或外来物质的存在而被活化,这导致了肿胀和疼痛。关节炎疼痛是常见的炎症性疼痛。

[0304] 适于用本文涵盖的载体、组合物和方法治疗的其它疼痛类型包括、但不限于由肌肉骨骼障碍引起的疼痛,包括肌痛、纤维肌痛、脊柱炎、血清阴性的(非风湿样的)关节病、非关节风湿病、抗肌萎缩蛋白病、肝糖分解、多肌炎和脓性肌炎;心脏和血管疼痛,包括由心绞痛、心肌梗塞、二尖瓣狭窄、心包炎、雷诺氏现象、硬肿病和骨骼肌缺血引起的疼痛;头痛,如偏头痛(包括有先兆的偏头痛和没有先兆的偏头痛)、丛集性头痛、紧张型头痛、混合性头痛和与血管障碍相关的头痛;以及口面部痛,包括牙痛、耳痛、口腔烧灼综合征和颞下颌肌盘膜痛。

[0305] 使用多种疼痛量表,可以确定本文涵盖的组合物和方法减少人受试者经历的疼痛量的有效量。患者自我报告可以用于评估疼痛是否减少;参见,例如,Katz和Melzack(1999) Surg.Clin.North Am.79:231。可替换地,可以使用观察性疼痛量表。LANSS疼痛量表可以用于评估疼痛是否减少;参见,例如,Bennett(2001) Pain 92:147。可以使用视觉模拟疼痛量表;参见,例如,Schmader(2002) Clin.J.Pain 18:350。可以使用Likert疼痛量表;例如,其中0为无痛、5为中度疼痛,并且10为可能的最严重疼痛。用于儿童的自我报告疼痛量表包括,例如,面部表情疼痛量表;Wong-Baker面部表情疼痛评级量表;以及彩色模拟量表。用于成年人的自我报告疼痛量表包括,例如,视觉模拟量表;言语数值评级量表;言语描述符量表;以及简易疼痛清单。疼痛测量量表包括,例如,Alder Hey分筛疼痛评分(Stewart等人(2004) Arch.Dis.Child.89:625);行为疼痛量表(Payen等人(2001) Critical Care Medicine 29:2258);简易疼痛清单(Cleeland和Ryan(1994) Ann.Acad.Med.Singapore 23:129);非言语疼痛指示符清单(Feldt(2000) Pain Manag.Nurs.1:13);病危护理疼痛观察工具(Gelinas等人(2006) Am.J.Crit.Care 15:420);COMFORT量表(Ambuel等人(1992) J.Pediatric Psychol.17:95);Dallas疼痛调查表(Ozguler等人(2002) Spine 27:1783);测痛计疼痛指数(Hardy等人(1952) Pain Sensations and Reactions Baltimore:The Williams&Wilkins Co.);面部表情疼痛量表-修订版(Hicks等人(2001) Pain 93:173);脸腿活动哭泣安抚量表;McGill疼痛调查表(Melzack(1975) Pain 1:277);描述符差异量表(Gracely和Kwilosz(1988) Pain 35:279);数值11点盒(Jensen等人(1989) Clin.J.Pain 5:153);数值评级量表(Hartrick等人(2003) Pain Pract.3:310);Wong-Baker面部表情疼痛评级量表;以及视觉模拟量表(Huskisson(1982) J.Rheumatol.9:768)。

[0306] 在特定实施方案中,提供了缓解受试者中的疼痛的方法,所述方法包括:将经工程改造的受体引入神经元细胞和通过提供有效量的活化所述经工程改造的受体的配体来控制所述细胞的活性,从而减轻受试者的疼痛。所述方法针对疼痛提供了显著的镇痛,而无脱靶效应,诸如一般的中枢神经系统抑制。在某些实施方案中,与未经治疗的受试者相比,所述方法使受试者中的神经性疼痛减少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。在某些实施方案中,所述方法包括在施用结合剂之前和之后测量受试者中的疼痛的步骤,其中受试者中的疼痛减少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。在这样的情况下,所述测量可以发生在施用结合剂以后4小时或更长时间,例如施用结合剂以后8小时、12小时、16小时、24小时、36小时、48小时、3天或4天或更长时间。

[0307] 在特定实施方案中,将本文涵盖的载体施用或引入到一个或多个神经元细胞。所述神经元细胞可以是相同类型的神经元细胞,或者不同类型的神经元细胞的混合群体。在一个实施方案中,所述神经元细胞是伤害感受器或周围感觉神经元。感觉神经元的示例性例子包括、但不限于,背根神经节(DRG)神经元和三叉神经节(TGG)神经元。在一个实施方案中,所述神经元细胞是参与神经元疼痛回路的抑制性中间神经元。

[0308] 在某些情况下,将编码经工程改造的受体的载体施用给有此需要的受试者。施用方法的非限制性例子包括皮下施用、静脉内施用、肌肉内施用、真皮内施用、腹膜内施用、口服施用、输注、颅内施用、鞘内施用、鼻内施用、神经节内施用、椎管内施用、小脑延髓池施用和神经内施用。在某些情况下,施用可以涉及载体的液体制剂的注射。在其它情况下,施用可以涉及载体的固体制剂的口服递送。在某些情况下,口服制剂可以与食物一起施用。在特定实施方案中,胃肠外地、静脉内地、肌肉内地、腹膜内地、鞘内地、神经内地、神经节内地、椎管内地或心室内地将载体施用给受试者,以便将载体引入到一个或多个神经元细胞中。在不同的实施方案中,所述载体是rAAV。

[0309] 在一个实施方案中,通过鞘内(IT)或神经节内(IG)施用将AAV施用给感觉神经元或伤害感受器,例如,DRG神经元、TGG神经元等。所述IT途径将AAV递送至脑脊液(CSF)。该施用途径可以适合用于治疗例如慢性疼痛或其它周围神经系统(PNS)或中枢神经系统(CNS)适应症。在动物中,通过将IT导管穿过小脑延髓池插入并将其尾端推进到腰椎水平,已经实现IT施用。在人类中,通过腰椎穿刺术(LP),即一种具有优秀安全性谱的常规床边操作,可以容易地进行IT递送。

[0310] 在特定情况下,通过神经节内施用可以将载体施用给受试者。神经节内施用可以涉及直接注射到一个或多个神经节中。IG途径可以将AAV直接递送进DRG或TGG实质中。在动物中,通过开放式神经外科手术进行向DRG的IG施用,开放式神经外科手术在人类中是不希望的,因为它将需要复杂的且侵入性的操作。在人类中,可以使用微创CT成像引导的技术来安全地靶向DRG。用于对流增强递送(CED)的定制针组合件可以用于将AAV递送进DRG实质中。在一个非限制性实施例,可以将本公开内容的载体递送至一个或多个背根神经节和/或三叉神经节以用于治疗慢性疼痛。在另一个非限制性实施例,可以将本公开内容的载体递送至结状神经节(迷走神经)以治疗癫痫。

[0311] 在又另一种特定情况下,可以通过颅内施用(即,直接施用到脑中)将载体施用给受试者。在颅内施用的非限制性例子中,可以将本公开内容的载体递送进脑皮质中以治疗例如癫痫发作病灶,递送进室旁下丘脑中以治疗例如饱感障碍,或递送进扁桃体中央核中以治疗例如饱感障碍。在另一种特定情况下,可以通过神经内注射(即,直接注射到神经中)将载体施用给受试者。可以基于待治疗的适应症来选择神经,例如,注射到坐骨神经中以治疗慢性疼痛,或注射到迷走神经中以治疗癫痫或饱感障碍。在又另一种特定情况下,可以通过皮下注射将载体施用给受试者,例如注射到感觉神经末梢中以治疗慢性疼痛。

[0312] 载体剂量可以表示为递送至受试者的载体基因组单位的数目。本文中使用的“载体基因组单位”表示在剂量中施用的单个载体基因组的数目。单个载体基因组的大小通常

取决于所用病毒载体的类型。本公开内容的载体基因组可以从约1.0千碱基、1.5千碱基、2.0千碱基、2.5千碱基、3.0千碱基、3.5千碱基、4.0千碱基、4.5千碱基、5.0千碱基、5.5千碱基、6.0千碱基、6.5千碱基、7.0千碱基、7.5千碱基、8.0千碱基、8.5千碱基、9.0千碱基、9.5千碱基、10.0千碱基至超过10.0千碱基。因此,单个载体基因组可以包括多达或大于10,000个核苷酸碱基对。在某些情况下,载体剂量可以是约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 、 1×10^{16} 、 2×10^{16} 、 3×10^{16} 、 4×10^{16} 、 5×10^{16} 、 6×10^{16} 、 7×10^{16} 、 8×10^{16} 、 9×10^{16} 、 1×10^{17} 、 2×10^{17} 、 3×10^{17} 、 4×10^{17} 、 5×10^{17} 、 6×10^{17} 、 7×10^{17} 、 8×10^{17} 、 9×10^{17} 、 1×10^{18} 、 2×10^{18} 、 3×10^{18} 、 4×10^{18} 、 5×10^{18} 、 6×10^{18} 、 7×10^{18} 、 8×10^{18} 、 9×10^{18} 、 1×10^{19} 、 2×10^{19} 、 3×10^{19} 、 4×10^{19} 、 5×10^{19} 、 6×10^{19} 、 7×10^{19} 、 8×10^{19} 、 9×10^{19} 、 1×10^{20} 、 2×10^{20} 、 3×10^{20} 、 4×10^{20} 、 5×10^{20} 、 6×10^{20} 、 7×10^{20} 、 8×10^{20} 、 9×10^{20} 或更多个载体基因组单位。

[0313] 在特定实施方案中,将本文涵盖的载体以以下滴度施用给受试者:至少约 1×10^9 各基因组颗粒/mL,至少约 1×10^{10} 各基因组颗粒/mL,至少约 5×10^{10} 各基因组颗粒/mL,至少约 1×10^{11} 各基因组颗粒/mL,至少约 5×10^{11} 各基因组颗粒/mL,至少约 1×10^{12} 各基因组颗粒/mL,至少约 5×10^{12} 各基因组颗粒/mL,至少约 6×10^{12} 各基因组颗粒/mL,至少约 7×10^{12} 各基因组颗粒/mL,至少约 8×10^{12} 各基因组颗粒/mL,至少约 9×10^{12} 各基因组颗粒/mL,至少约 10×10^{12} 各基因组颗粒/mL,至少约 15×10^{12} 各基因组颗粒/mL,至少约 20×10^{12} 各基因组颗粒/mL,至少约 25×10^{12} 各基因组颗粒/mL,至少约 50×10^{12} 各基因组颗粒/mL,或至少约 100×10^{12} 各基因组颗粒/mL。参考病毒滴度使用的术语“基因组颗粒(gp)”或“基因组当量”或“基因组拷贝”(gc)表示含有重组AAV DNA基因组的病毒粒子的数目,不管感染性或功能性如何。通过本领域充分理解的方法,例如,基因组DNA的定量PCR,或例如在以下文献中的方法,可以测量在特定载体制品中的基因组颗粒的数目:Clark等人(1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk等人(2002) Mol. Ther., 6:272-278。

[0314] 可以在一定体积的流体中施用本公开内容的载体。在某些情况下,可以在约0.1mL、0.2mL、0.3mL、0.4mL、0.5mL、0.6mL、0.7mL、0.8mL、0.9mL、1.0mL、2.0mL、3.0mL、4.0mL、5.0mL、6.0mL、7.0mL、8.0mL、9.0mL、10.0mL、11.0mL、12.0mL、13.0mL、14.0mL、15.0mL、16.0mL、17.0mL、18.0mL、19.0mL、20.0mL或大于20.0mL的体积中施用载体。在某些情况下,载体剂量可以表示为施用给受试者的载体的浓度或滴度。在此情况下,载体剂量可以表示为单位体积中载体基因组单位的数目(即,基因组单位/体积)。

[0315] 在特定实施方案中,以至少约 5×10^9 个感染单位/mL、至少约 6×10^9 个感染单位/mL、至少约 7×10^9 个感染单位/mL、至少约 8×10^9 个感染单位/mL、至少约 9×10^9 个感染单位/mL、至少约 1×10^{10} 个感染单位/mL、至少约 1.5×10^{10} 个感染单位/mL、至少约 2×10^{10} 个感染单位/mL、至少约 2.5×10^{10} 个感染单位/mL、至少约 5×10^{10} 个感染单位/mL、至少约 1×10^{11} 个感染单位/mL、至少约 2.5×10^{11} 个感染单位/mL、至少约 5×10^{11} 个感染单位/mL、至少约 1×10^{12} 个感染单

位/mL、至少约 2.5×10^{12} 个感染单位/mL、至少约 5×10^{12} 个感染单位/mL、至少约 1×10^{13} 个感染单位/mL、至少约 5×10^{13} 个感染单位/mL、至少约 1×10^{14} 个感染单位/mL的滴度将本文涵盖的载体施用给受试者。参考病毒滴度使用的术语“感染单位(iu)”、“感染颗粒”或“复制单位”表示具有感染和复制能力的重组AAV载体颗粒的数目,如通过例如在McLaughlin等人(1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973中描述的感染中心测定(也称为复制中心测定)所测量的。

[0316] 在特定实施方案中,以至少约 5×10^{10} 个转导单位/mL、至少约 1×10^{11} 个转导单位/mL、至少约 2.5×10^{11} 个转导单位/mL、至少约 5×10^{11} 个转导单位/mL、至少约 1×10^{12} 个转导单位/mL、至少约 2.5×10^{12} 个转导单位/mL、至少约 5×10^{12} 个转导单位/mL、至少约 1×10^{13} 个转导单位/mL、至少约 5×10^{13} 个转导单位/mL、至少约 1×10^{14} 个转导单位/mL的滴度将本文涵盖的载体施用给受试者。参考病毒滴度使用的术语“转导单位”(tu)表示导致功能性转基因产物产生的感染性重组AAV载体颗粒的数目,如在例如以下文献中描述的功能测定中所测量的:Xiao等人(1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124;或Fisher等人(1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (LFU测定)。

[0317] 载体剂量通常将由施用途决定。在一个特定实施例中,神经节内注射可以包括在从约0.1mL至约1.0mL的体积中的从约 1×10^9 至约 1×10^{13} 个载体基因组。在另一种特定情况下,鞘内注射可以包括在从约1.0mL至约12.0mL的体积中的从约 1×10^{10} 至约 1×10^{15} 个载体基因组。在另一种特定情况下,颅内注射可以包括在从约0.1mL至约1.0mL的体积中的从约 1×10^9 至约 1×10^{13} 个载体基因组。在另一种特定情况下,神经内注射可以包括在从约0.1mL至约1.0mL的体积中的从约 1×10^9 至约 1×10^{13} 个载体基因组。在另一个特定实施例中,椎管内注射可以包括在从约0.1mL至约1.0mL的体积中的从约 1×10^9 至约 1×10^{13} 个载体基因组。在另一种特定情况下,小脑延髓池输注可以包括在从约0.5mL至约5.0mL的体积中的从约 5×10^9 至约 5×10^{13} 个载体基因组。在另一种特定情况下,皮下注射可以包括在从约0.1mL至约1.0mL的体积中的从约 1×10^9 至约 1×10^{13} 个载体基因组。

[0318] 在某些情况下,通过输注将载体递送至受试者。通过输注递送至受试者的载体剂量可以测量为载体输注速率。载体输注速率的非限制性例子包括:对于神经节内、椎管内、颅内或神经内施用,1-10 μ L/min;和对于鞘内或小脑延髓池施用,10-1000 μ L/min。在某些情况下,通过MRI引导的对流增强递送(CED)将载体递送至受试者。此技术使得能够增加分布在脑部的整个大体积中的病毒扩散和转导以及减少载体沿针途径的回流。

[0319] 在不同的实施方案中,提供了一种方法,其包括将编码经工程改造的受体(其灭活或超极化神经元细胞)的载体施用给增加痛觉或对疼痛的敏感性的一个或多个神经元细胞,和将特异性地结合表达所述经工程改造的受体的神经元细胞的配体施用给受试者,从而灭活所述细胞、减少对疼痛的敏感性和增强镇痛作用。

[0320] 在不同的实施方案中,提供了一种方法,其包括将编码经工程改造的受体(其活化或极化神经元细胞)的载体施用给减少痛觉或对疼痛的敏感性的一个或多个神经元细胞,和将特异性地结合表达所述经工程改造的受体的神经元细胞的配体施用给受试者,从而活化所述细胞、减少对疼痛的敏感性和增强镇痛作用。

[0321] 可以通过各种途径将配体的制剂施用给受试者。施用方法的非限制性例子包括皮下施用、静脉内施用、肌肉内施用、透皮施用、真皮内施用、腹膜内施用、口服施用、输注、颅内施用、鞘内施用、鼻内施用、神经节内施用和神经内施用。在某些情况下,施用可以涉及配

体的液体制剂的注射。在其它情况下,施用可以涉及配体的固体制剂的口服递送。在特定情况下,通过口服施用(例如,丸剂、片剂、胶囊剂等)来施用配体。在某些情况下,口服组合物可以与食物一起施用。在另一种特定情况下,通过鞘内注射(即,注射到脊髓的蛛网膜下空间中)来施用配体以用于递送至受试者的脑脊液(CSF)。在另一种特定情况下,局部地(例如,真皮贴剂、乳膏剂、洗剂、软膏剂等)施用配体。

[0322] 施用给受试者的配体的剂量不受绝对限制,但将取决于组合物及其活性成分的性质和它的不希望的副作用(例如,针对抗体的免疫应答)、所治疗的受试者和所治疗的病症的类型以及施用方式。通常,剂量将是治疗有效量,诸如足以实现期望的生物学效应的量,例如有效减少或减弱受试者所感受的疼痛水平的量。在特定实施方案中,剂量也可以是预防量或有效量。配体的治疗有效量可以取决于施用途径、所治疗的适应症和/或选择使用的配体。

[0323] 在一个实施方案中,在施用载体之前先将配体施用给受试者。可以在递送载体后的某个时间将治疗有效量的配体施用给受试者。通常,在递送载体后,受试者的一个或多个细胞需要一段时间来产生由所述载体编码的蛋白(即,经工程改造的受体)。在这段时间内,配体向受试者的施用可能对受试者无益。在此情况下,可能合适的是,在受试者的一个或多个细胞已经产生一定量的经工程改造的受体后施用配体。

[0324] 在一个实施方案中,在将载体施用给受试者的大约相同时间先将配体施用给受试者。

[0325] 在一个实施方案中,在将载体施用给受试者后1、2、3、4、5、6、7、8、9、11或12小时、数天、数周、数月或数年先施用配体。在某些情况下,可以在递送载体后至少一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天或超过30天将治疗有效量的配体施用给受试者。在一个特定实施例中,在递送载体后至少一周将治疗有效量的配体施用给受试者。在另一个实施例中,每天将治疗有效量的配体施用给受试者,持续至少连续三天。

[0326] 本公开内容的配体的治疗有效量或剂量可以表示为mg或 μg 配体/千克受试者体重。在某些情况下,配体的治疗有效量可以是约0.001 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约0.005 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约260 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约280 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约320 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约340 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约360 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约380 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约420 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约440 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约460 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约480 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约520 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约540 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约560 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约580 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约620 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约640 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约660 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约680 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约720 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约740 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约760 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约780 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约820 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约840 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约860 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约880 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约920 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约940 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约960 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约980 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg或大于10mg/kg。

[0327] 在特定实施方案中,施用给受试者的配体的剂量是至少约0.001微克/千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)

kg)、至少约0.005 μ g/kg、至少约0.01 μ g/kg、至少约0.05 μ g/kg、至少约0.1 μ g/kg、至少约0.5 μ g/kg、0.001毫克/千克(mg/kg)、至少约0.005mg/kg、至少约0.01mg/kg、至少约0.05mg/kg、至少约0.1mg/kg、至少约0.5mg/kg、至少约1mg/kg、至少约2mg/kg、至少约3mg/kg、至少约4mg/kg、至少约5mg/kg、至少约5mg/kg、至少约6mg/kg、至少约7mg/kg、至少约8mg/kg、至少约8mg/kg、至少约9mg/kg或至少约10或more mg/kg。

[0328] 在特定实施方案中,施用给受试者的配体的剂量是至少约0.001 μ g/kg至至少约10mg/kg、至少约0.01 μ g/kg至至少约10mg/kg、至少约0.1 μ g/kg至至少约10mg/kg、至少约1 μ g/kg至至少约10mg/kg、至少约0.01mg/kg至至少约10mg/kg、至少约0.1mg/kg至至少约10mg/kg、或至少约1mg/kg至至少约10mg/kg或其任何插入范围。

[0329] 在某些方面,配体的治疗有效量可以表示为摩尔浓度(即,M或mol/L)。在某些情况下,配体的治疗有效量可以是约1nM、2nM、3nM、4nM、5nM、6nM、7nM、8nM、9nM、10nM、20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nM、100nM、200nM、300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nM、900nM、1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、200mM、300mM、400mM、500mM、600mM、700mM、800mM、900mM、1000mM或更大。

[0330] 可以每天施用治疗有效量的配体一次或超过一次。在某些情况下,根据需要(例如,当需要疼痛缓解时)施用治疗有效量的配体。可以连续地施用配体(例如,在治疗方案的持续时间内每天不间断地)。在某些情况下,治疗方案可以是小于一周、一周、两周、三周、一个月或大于一个月。在某些情况下,施用治疗有效量的配体一天、至少两个连续天、至少三个连续天、至少四个连续天、至少五个连续天、至少六个连续天、至少七个连续天、至少八个连续天、至少九个连续天、至少十个连续天或至少大于十个连续天。在特定情况下,施用治疗有效量的配体连续三天。在某些情况下,可以每周一次、每周两次、每周三次、每周四次、每周五次、每周六次、每周七次、每周八次、每周九次、每周10次、每周11次、每周12次、每周13次、每周14次、每周15次、每周16次、每周17次、每周18次、每周19次、每周20次、每周25次、每周30次、每周35次、每周40次、或每周大于40次施用治疗有效量的配体。在某些情况下,可以每天一次、每天两次、每天三次、每天四次、每天五次、每天六次、每天七次、每天八次、每天九次、每天10次或每天大于10次施用治疗有效量的配体。在某些情况下,至少每小时、至少每两小时、至少每三小时、至少每四小时、至少每五小时、至少每六小时、至少每七小时、至少每八小时、至少每九小时、至少每10小时、至少每11小时、至少每12小时、至少每13小时、至少每14小时、至少每15小时、至少每16小时、至少每17小时、至少每18小时、至少每19小时、至少每20小时、至少每21小时、至少每22小时、至少每23小时或至少每天施用治疗有效量的配体。可以如下将所述剂量的配体施用给受试者:连续地,或每天1次、2次、3次、4次或5次;每周1次、2次、3次、4次、5次、6次或7次,每月1次、2次、3次或4次,每2个月一次、每3个月一次、每4个月一次、每5个月一次或每6个月一次,或一年一次,或以甚至更长的间隔。治疗的持续时间可以持续一天、1、2或3周、1、2、3、4、5、7、8、9、10或11个月、1、2、3、4、5年或更多年或更长时间。

[0331] 通过本文公开的方法和组合物治疗的受试者可以是人类,或者可以是非人动物。本文所用的术语“治疗”及其语法等效词通常表示使用组合物或方法来减少、消除或预防疾病的症状,并且包括实现治疗益处和/或预防益处。治疗益处是指减慢所治疗的障碍或病症

的症状的进展、使其进展停止、逆转其进展或根除或减轻所述症状。治疗的预防益处包括降低病症的风险、延缓病症的进展、或减小病症发生的可能性。

[0332] 非人动物的非限制性例子包括非人灵长类动物、家畜动物、家养宠物和实验动物。例如,非人动物可以是猿(例如,黑猩猩、狒狒、大猩猩或猩猩)、旧大陆猴(例如,恒河猴)、新大陆猴、狗、猫、野牛、骆驼、牛、鹿、猪、驴、马、骡、美洲驼、绵羊、山羊、水牛、驯鹿、牦牛、小鼠、大鼠、兔或任何其它非人动物。如本文中所述的组合物和方法适于治疗兽医动物。兽医动物可以包括、但不限于狗、猫、马、牛、绵羊、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、蛇、乌龟和蜥蜴。在某些方面,使组织或细胞群体与组合物接触包括将组合物施用给细胞群体或受试者。在某些实施方案中,施用在体外发生,例如通过将组合物添加到细胞培养系统中。在某些方面,施用在体内发生,例如通过经由特定途径施用。如果其中要施用超过一种组合物,所述组合物可以在相同时间(例如,在同一天)通过相同途径施用,或在不同的时间通过相同途径施用。可替换地,所述组合物可以在相同时间(例如,在同一天)通过不同的途径施用,或在不同的时间通过不同的途径施用。

[0333] 将组合物施用给有此需要的受试者的次数取决于医学专业人员的判断、障碍、障碍的严重程度以及受试者对制剂的应答。在某些方面,组合物的施用发生至少一次。在其它方面,施用在给定阶段内发生超过一次,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10次或更多次。每次施用的剂量和/或施用的频率可以基于患者的病症和生理学应答根据需要进行调整。

[0334] 在某些实施方案中,可以施用组合物足够的次数以达到期望的生理学效果或受试者的病症的改善。在其中受试者的病症没有改善的情况下,根据医生的判断,可以长期地施用组合物,即在延长的时间段内,包括在受试者的生命的整个持续时间内,以改善或以其它方式控制或限制受试者的疾病或病症的症状。在其中受试者的状况确实有所改善的情况下,根据医生的判断,可以连续地施用组合物;可替换地,可以将所施用的药物的剂量暂时减少或暂时中止一定时间长度(即,“休药期”)。休药期的长度在2天至1年之间变化,仅作为示例包括2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天和365天。在休药期中的剂量减少可以为10%-100%,仅作为示例包括10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%和100%。

[0335] 当施用组合物超过一次时,每次施用可以由相同的操作人和/或在相同的地理位置进行。可替换地,每次施用可以由不同的操作人和/或在不同的地理位置进行。

[0336] 关于人和兽医治疗,所施用的特定药剂的量可以取决于多种因素,包括:正在治疗的病症和病症的严重程度;采用的具体药剂的活性;患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;采用的具体药剂的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗的持续时间;与采用的具体药剂组合或并用的药物;处方医师或兽医的判断;和医学和兽医学领域中已知的类似因素。类似地,给定组合物的有效浓度可以取决于多种因素,包括患者或受试者的年龄、性别、体重、遗传状况和总体健康。

[0337] 下面表2-8列出了各种剂量的乙酰胆碱或非天然配体对指示的经工程改造的受体刺激后YFP荧光的猝灭百分比。

[0338] 表2

[0339]

经工程改造的受体的 序列	50 nM abt	100 nM abt	300 nM abt	1 uM abt
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-11.96	-10.72	11.65	-3.06
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-11.09	-10.37	-4	4.05
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-3.19	7.58	-1.65	31.29
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	-11.83	-11.5	-8.01	-9.34
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	-1.81	-2.61	-3.78	-2.6
Y115D_L131E 在 SEQ	-1.68	-2.25	-2.37	3.68

[0340]

ID NO: 33 中				
-------------	--	--	--	--

[0341] 表3

[0342]

经工程改造的受体的 序列	10 uM ach	100 uM ach	1 mM ach	3 mM ach
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-11.3	-27.53	2.84	14.65
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-12.24	-26.23	-1.16	2.97
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-12.91	-20.88	79.85	79.98
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	-0.46	-4.93	-11.18	-3.53
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	9.47	6.12	-1.56	17.57
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	15.45	13.77	27.42	53.62

[0343] 表4

[0344]

经工程改造的受体的 序列	100 nM apn	1 uM apn	30 uM apn
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	14.26	45.55	64.93
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	1.23	35.77	68.29
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	71.72	77.26	77.5
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	-18.17	-15.2	-14
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	-10.03	-3.33	6.96
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	-5.71	13.03	25.2

[0345] 表5

[0346]

经工程改造的受体的 序列	100 nM azd	300 nM azd	30 uM azd
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-9.32	4.94	60.61
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-7.02	-0.48	70.16
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	51.44	77.12	79.26
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	-0.71	-1.73	47.39
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	12.15	30.92	68.65
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	24.49	45.34	71.21

[0347] 表6

[0348]

经工程改造的受体的序列	1 nM brd	3 nM brd	10 nM brd	30 nM brd	100 nM brd	300 nM brd	1 uM brd
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-1.13	-3.83	-3.78		-2.03		1.68
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-1.24	0.25	-2.57	0.78	4.51	30.97	44.41
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	-9.78	-12.06	-9.02	- 16.3	-7.44	-10.93	-4.55
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	0.92	-4.65	0.38	- 8.96	12.18	-0.3	45.47
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	-1.52	-5.35	-3.49	- 2.16	4.18	70.2	43.11

[0349] 表7

[0350]

经工程改造的受体的序列	30 nM fac	100 nM fac	300 nM fac	10 uM fac	30 uM fac
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-23.44		2.75	69.71	61.44
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-21.36		4.17		65.94
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	24.15		80.17	81.34	79.9
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	38.08	-14.37	19.41	67.33	79.67
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	41.32	59.51	74.86	78.53	84.45
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	45.76	63.92	79.43	80.1	84.91

[0352] 表8

[0353]

经工程改造的受体的 序列	1 uM tc6	10 uM tc6	500 uM tc6
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-20.99	-27.62	-24.22
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-21.8	-27.08	-21.56
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-18.24	-23.06	-19.3
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	31.9	25.54	21.13
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	38.83	31.59	29.83
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	36.07	31.35	28.18

[0354] 下面表9-11列出了通过指出的不同技术计算的指示的经工程改造的受体的EC50。

[0355] 表9:从YFP淬灭板读取器实验测量的EC50值

[0356]

SEQ ID NO:	经工程改造的受体的序列	对 ACh 的 EC50	对 TC- 5619 的 EC50
------------------	-------------	-----------------	-------------------------

[0357]

58	L131D、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	359 uM	757 nM
59	L131S、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	>3mM	>1uM
60	L131T、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	>3mM	NA
61	Y115D、L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	1.74 mM	149 nM
62	Y115D、L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	4.61 mM	968 nM
63	Y115D、S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	>3mM	>1uM

[0358] 表10:从高通量电生理学实验测量的EC50值

[0359]

序列的描述	EC50 (μM)			
	乙酰胆碱	AZD-0328	RG-3487	TC-6987
野生型 nAChRa7	47.9	1.2	2.20	3.50
L131S 在 SEQ ID NO: 33 中	1759	0.45	0.73	26.5
L131T 在 SEQ ID NO: 33 中	6015	2.92	1.76	无活性
L131D 在 SEQ ID NO: 33 中	532	0.33	0.41	5.42
S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	1037	0.30	0.39	无活性
L131S、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	14260	3.89	0.95	无活性
L131T、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	22014	5.50	2.65	无活性
L131D、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	306	0.15	0.07	无活性
Y115D 在 SEQ ID NO: 33 中	26887	无活性	0.70	无活性
Y115E 在 SEQ ID NO: 33 中	2295	无活性	0.10	无活性
Y115D、S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	30000	无活性	2.47	无活性
Y115D、L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	28386	无活性	0.17	无活性
Y115D、L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	4636	无活性	0.13	无活性

[0360] 表11:

[0361]

经工程改造的受体的序列	手工膜片箝 EC50		手工膜片箝 EC50		基本电流强度转换; 大鼠 DRG 神经元	
	HEK 细胞系		大鼠 DRG 神经元		TC5619 @ EC90	
	Facinicine/RG3487	乙酰胆碱	Facinicine/RG3487	乙酰胆碱	基线	+TC-5619

[0362]

Y115D, L131Q	0.29 μM	>30,000 μM	0.36 μM	>100,000 μM	163 ± 28 pA	625 ± 35 pA
Y115D, L131E	0.23 μM	2200 μM				

[0363] 下面表A列出了本文公开的双突变体。

[0364] 表A:

[0365]

SEQ ID NO:	序列
SEQ ID NO:58	L131D、S172D在SEQ ID NO:33中
SEQ ID NO:59	L131S、S172D在SEQ ID NO:33中
SEQ ID NO:60	L131T、S172D在SEQ ID NO:33中
SEQ ID NO:61	Y115D、L131E在SEQ ID NO:33中
SEQ ID NO:62	Y115D、L131Q在SEQ ID NO:33中

SEQ ID NO:63

Y115D、S170T在SEQ ID NO:33中

[0366] 在本说明书中引用的所有论文、出版物和专利通过引用并入本文，如同明确地且单独地指出每篇单独的论文、出版物或专利通过引用并入，并且通过引用并入本文以公开和描述引用的出版物与其相关的方法和/或材料。但是，本文所引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利公开和专利申请的提及不是且不应视为承认或任何形式的暗示：它们在世界上的任何国家构成有效的现有技术或形成普通一般知识的一部分。

[0367] 除非上下文另外指示，否则特别预期本文描述的各种特征可以以任意组合使用。

[0368] 除非另有定义，否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。

[0369] 应当理解，上面的描述以及下面的实施例意图举例说明且不限制本发明的范围。在本发明范围内的其它方面、优点和修改是本发明所属领域的技术人员会明白的。

[0370] 实施例

[0371] 实施例1. 包含在配体结合结构域中的突变的经工程改造的受体的发现

[0372] 为了产生在暴露于人 $\alpha 7$ -nAChR的非天然小分子激动剂后传导阴离子电流的LGIC，遗传工程改造嵌合的配体门控离子通道 (LGIC) 受体，其包含从人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体 ($\alpha 7$ -nAChR) 衍生出的配体结合结构域和从人GlyR1 α 衍生出的传导氯离子的离子孔结构域。鉴定了具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的经工程改造的受体，其对乙酰胆碱、ABT-126和TC-6987与野生型 $\alpha 7$ -nAChR大约一样敏感，其中TC-6987显示与野生型类似的对SEQ ID NO:33的部分激动剂活性。与野生型相比，SEQ ID NO:33对烟碱的敏感性低约2倍，且对AZD-0328和Facinicine/RG3487的敏感性分别高大约3倍和10倍。

[0373] 将氨基酸置换引入具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的经工程改造的受体的配体结合结构域。将 $\alpha 7$ -nAChR中的每个配体的结合槽建模，并将形成结合槽的氨基酸残基绘图。然后产生单、双和三突变体嵌合LGIC的文库，每个突变体嵌合LGIC包含在SEQ ID NO:33的配体结合槽的一个或多个氨基酸中的置换。通过标准分子生物学技术，使用BamHI和EcoRI位点将亲本嵌合体受体 (SEQ ID NO:33) 克隆进pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) 中。通过定位诱变引入氨基酸置换。

[0374] 关于它们对其天然配体乙酰胆碱 (Ach) 和非天然配体诸如AZD-0328 (adisinsight.springer.com/drugs/800018503)、TC-6987 (drugbank.ca/drugs/DB14854)、ABT-126 (medchemexpress.com/Nelonicline.html)、APN-1125 (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02724917)、TC-5619 (en.wikipedia.org/wiki/Bradanicline) 和Facinicine/RG3487 (researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-RG3487_fig1_47499934) 的效能，分析所有得到的经工程改造的受体。

[0375] 实施例2: 使用高通量基于荧光的平板筛选表征经工程改造的受体

[0376] 为了筛选这些突变体LGIC中对配体具有新颖应答特性的那些，开发了阴离子报告测定以高通量形式评估通道的功能。在该测定中，用编码目标通道的DNA转染表达YFP报告物的细胞，所述YFP报告物的荧光在有阴离子存在下被猝灭。在暴露于配体后，被活化的通道将流出阴离子，从而导致在平板读数器上可以检测到的YFP的剂量依赖性猝灭。

[0377] 将Lenti-X 293T细胞 (LX293T, Clontech) 维持在含有10% FBS和1% 青霉素/链霉素的DMEM (Invitrogen) 中。关于平板读数器测定，将LX293T细胞用慢病毒感染以建立稳定

地表达突变体YFP (H148Q/I152L) 报告物的细胞,其显示出增强的对阴离子的敏感性。在测定前两天,将细胞以20,000个细胞/孔的密度分入用聚-d赖氨酸包被的96-孔组织培养板(Thermo Scientific)中。次日,使用标准的Fugene方案(Promega)将细胞用0.1 μ g的DNA/孔瞬时转染。在测定当日,将细胞在1X细胞外溶液(1X ECS:140mM NaCl,5mM KCl,1mM MgCl₂,2mM CaCl₂,10mM HEPES,10mM葡萄糖,pH 7.2,mOsm 300)中洗涤2次。在最后一次洗涤以后,将100 μ L的1X ECS加入孔,并将平板在37 $^{\circ}$ C温育30min。在温育平板的同时,将药物在1X ECS-NaI(与1X ECS相同的组分,但是用140mM NaI替换140mM NaCl)中稀释至2X浓度。然后在Flexstation3(Molecular Devices)上读出平板。如下使用Flexstation3(Molecular Devices)读出平板的每个孔2min,每次8个孔:1)读基线YFP荧光17秒,2)加入100 μ L的配体,和3)然后在剩余时间中每1.3秒测量YFP荧光的变化。

[0378] 图1提供了用图中所示的各种剂量的乙酰胆碱或非天然配体刺激后YFP荧光的猝灭百分比的热图。如蓝色阴影格所示,阳性荧光信号指示,经工程改造的受体被该浓度的非天然配体活化。结果指示,经工程改造的受体对试验的非天然配体具有不同的效能。表12列出了指示的双突变体对乙酰胆碱(Ach)和TC-5619的EC₅₀值,如从YFP荧光平板读数器实验所确定的。

[0379] 表12:

[0380]	经工程改造的受体的序列	对 ACh 的 EC ₅₀	对 TC-5619 的 EC ₅₀
	L131D、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	359 μ M	757 nM
	L131S、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	>3mM	>1 μ M
	L131T、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	>3mM	NA
	Y115D、L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	1.74 mM	149 nM
	Y115D、L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	4.61 mM	968 nM
	Y115D、S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	>3mM	>1 μ M

[0381] 实施例3:使用高通量电生理学表征经工程改造的受体

[0382] 为了证实通过平板读数器确定的EC₅₀以及形成最大电流的更好理解,如下所述对经工程改造的受体进行高通量电生理学系统。对于HEK293T研究,使用标准重组技术将编码离子通道的cDNA克隆进pcDNA3.1中。使用标准细胞培养方案,将来自Clontech的HEK293T细胞(Lenti-XTM293T细胞系)在补充了10%FBS和1%青霉素/链霉素的DMEM中培养至40-50%汇合,并且使用Fugene 6用每个15cm培养皿18 μ g浓度的离子通道质粒转染,并且生长另外24小时。然后将细胞在电生理学系统(IonFluxHT和/或Mercury,Fluxion Biosciences)上测定,其中通过用于建立全细胞构型的基于微流体的平台可以评估剂量-响应关系。用细胞外缓冲液(140mM NaCl,5mM KCl,2mM CaCl₂,1mM MgCl₂,10mM HEPES,和10mM葡萄糖,用NaOH调至pH 7.2,mOsm 310)、细胞内缓冲液(145mM CsCl,2mM CaCl₂,2mM MgCl₂,10mM HEPES,和10mM EGTA,用CsOH调至pH 7.2,mOsm 305)(从Lynagh和Lynch改进)和在细胞外缓冲液中稀释的试验化合物(新鲜制备的储备液)对Ensemble平板进行预处理(primed)。然后将细胞用Accutase从平板释放,离心,重新悬浮于细胞外缓冲液中,并且装载进Ensemble平板中。然后使细胞经受用于预处理、捕获、破碎和建立全细胞构型的标准方案,其中在整个记录中

将细胞保持在-60mV。记录基线后,使用IonFlux软件应用渐进剂量的试验化合物以评估剂量响应关系。然后使用自定义Python脚本离线分析数据,以将数据转换为.csv格式,重新绘制迹线,并且应用QC测量以排除不稳定的记录(即,基于访问阻力的阈值化和/或基线中的标准偏差,以及伪像排除)。然后计算峰值电流,并且使用如Hill方程式所描述的4-参数逻辑方程拟合群体数据。在1秒添加药物后在自动化膜片箝系统(Fluxion Biosciences)上测量电流,并将计算的EC50值列在下面表13中。

[0383] 表13:

序列的描述	EC50 (μM)			
	乙酰胆碱	AZD-0328	RG-3487	TC-6987
野生型 nAChRa7	47.9	1.2	2.20	3.50
L131S 在 SEQ ID NO: 33 中	1759	0.45	0.73	26.5
L131T 在 SEQ ID NO: 33 中	6015	2.92	1.76	无活性
L131D 在 SEQ ID NO: 33 中	532	0.33	0.41	5.42
S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	1037	0.30	0.39	无活性
[0384] L131S、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	14260	3.89	0.95	无活性
L131T、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	22014	5.50	2.65	无活性
L131D、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	306	0.15	0.07	无活性
Y115D 在 SEQ ID NO: 33 中	26887	无活性	0.70	无活性
Y115E 在 SEQ ID NO: 33 中	2295	无活性	0.10	无活性
Y115D、S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	30000	无活性	2.47	无活性
Y115D、L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	28386	无活性	0.17	无活性
Y115D、L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	4636	无活性	0.13	无活性

[0385] 这些结果表明,与野生型nAChRa7相比,所有经工程改造的受体对乙酰胆碱具有降低的效能。例如,一些经工程改造的受体的EC50值比野生型nAChRa7的EC50高几个数量级。此外,结果表明,与野生型受体相比,一些经工程改造的受体对某些非天然配体具有增加的效能。例如,与野生型对照受体相比,包含在SEQ ID NO:33中的L131D、S172D的氨基酸序列的经工程改造的受体显示出对AZD-0328和RG-3487增加至少10倍的效能。这些结果证实,经工程改造的受体可以用于降低对乙酰胆碱的效能,同时保持或增加对合成的小分子nACha7受体激动剂(其已经被公认为在人类中安全的和良好耐受的)的效能。

[0386] 来自电生理学方法的这些结果证实了来自平板读数器的EC50值,并进一步证实了本文公开的经工程改造的受体的乙酰胆碱和非天然配体应答的去偶联。

[0387] 实施例4:使用手工膜片箝电生理学表征经工程改造的受体

[0388] 在HEK293细胞和大鼠DRG神经元中使用全细胞手工膜片箝电生理学,测量了本文公开的各种经工程改造的受体对Ach和非天然配体的EC50。还在大鼠DRG神经元中测量了基本电流强度转换,其反映了受体的效力。为了计算基本电流强度,首先,确定了可以产生动作电位的电流的量。然后加入配体,随后使注射的电流逐步增加直到700pA。将添加配体后注射的电流除以为了得到动作电位注射的原始电流,以计算基本电流强度。用来自递增剂

量的配体的峰值电流测量结果,使用Hill方程式计算EC50。

[0389] 将结果列在下面表14中。这些结果证实,本文公开的经工程改造的受体具有非常低的对Ach的效能,但是对非天然配体诸如RG3487和TC5619更高的效能和效力。也参见,实施例6。

[0390] 表14:

[0391]

经工程改造的受体的序列	手工膜片箝 EC50		手工膜片箝 EC50		基本电流强度转换; 大鼠 DRG 神经元	
	HEK 细胞系		大鼠 DRG 神经元		TC5619 @ EC90	
	Facinicine /RG3487	乙酰胆碱	Facinicine /RG3487	乙酰胆碱	基线	+TC-5619
Y115D, L131Q	0.29 μM	>30,000 μM	0.36 μM	>100,000 μM	163 ± 28 pA	625 ± 35 pA
Y115D, L131E	0.23 μM	2200 μM				

[0392] 实施例5:经工程改造的受体的定位

[0393] 使用两种方法评价了将本文公开的经工程改造的受体定位至细胞表面的效率。首先,在HEK293T细胞中表达HA-标记的经工程改造的受体,并使用荧光地标记的HA抗体监测它们的表面表达。其次,使用荧光地标记的α-银环蛇毒素(其特异性地结合经工程改造的受体(CHNRA7)上的氨基酸)结合经工程改造的受体。这两种方法和随后流式细胞计量术的应用允许确证经工程改造的受体的表面定位。

[0394] 单克隆抗体抗-HA-PeCy7 (16B12) 购自Biolegend (San Diego, CA)。在括弧中列出了单克隆抗体克隆名称。缀合至生物素Alexa Fluor 647的α-银环蛇毒素都购自Thermo/Fisher (Waltham MA)。简而言之,将HEK-293T以200,00个细胞/孔铺板,并在次日以1:3比例的DNA:Fugene用Fugene 6转染。在转染后一天使用流式细胞计量术分析细胞。对于流式细胞计量术分析,使用0.05%胰蛋白酶和0.02%EDTA (Thermo/Fisher) 使转染的HEK293T细胞升起,洗涤,并在FACS缓冲液(2%BSA, 不含Ca⁺和Mg⁺的1X PBS, 和1X青霉素链霉素)中与抗体(30min, 1:100)或α-银环蛇毒素(1小时, 1:1000)一起温育。然后将细胞在FACS缓冲液中洗涤,并且然后在Sony SH800 FACS分选仪 (San Jose, CA) 上分析。使用FlowJo (San Jose, CA) 进行随后分析。将呈现的数据标准化至HA-标签荧光或α-银环蛇毒素染色为阳性的细胞的百分比;和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的亲本嵌合受体的中值荧光强度。参见表1。

[0395] 图5和表1显示了表达经工程改造的受体的HA-标签阳性细胞的百分比,标准化为表达SEQ ID NO:33的氨基酸序列的对照细胞(“平均HA标签%”);和表达经工程改造的受体的α-银环蛇毒素阳性细胞的百分比,标准化为表达SEQ ID NO:33的氨基酸序列的对照细胞(“标准化的AB%”)。

[0396] 图5和表15也显示了表达经工程改造的受体的细胞的中值荧光强度(MFI),标准化为表达SEQ ID NO:33的氨基酸序列的对照细胞,如使用抗-HA抗体(“平均HA MFI”)或荧光地标记的缀合至Alexa Fluor 647的α-银环蛇毒素(“标准化的AB MFI”)所评价的。不同的

点突变可以影响通过流式细胞计量术对HA和α-银环蛇毒素的检测。

[0397] 表15:

[0398]	经工程改造的受体的序列	平均HA 标签%	平均HA MFI	N	标准化的 AB%	标准化的 AB MFI	N
	L131S、S172D在SEQ ID NO: 33中	33	0.77	2	48	0.83	4
	L131T、S172D在SEQ ID NO: 33中	92	0.93	1	32	0.75	4
	L131D、S172D在SEQ ID NO: 33中	58	0.82	1	45	0.88	4
[0399]	Y115D、S170T在	0	0.80	1	17	0.64	1
	SEQ ID NO: 33中						
	Y115D、L131Q在SEQ ID NO: 33中	62	0.76	2	35	0.72	3
	Y115D、L131E在SEQ ID NO: 33中	87	0.92	1	73	0.90	1

[0400] *缩写:MFI-平均荧光强度;AB-α-银环蛇毒素

[0401] 结果表明,在本文公开的经工程改造的受体中的突变影响向细胞表面的定位。尽管一些双突变体的定位与亲本嵌合体 (SEQ ID NO:33) 的定位相当,其它突变体具有比亲本嵌合体 (SEQ ID NO:33) 减少的细胞表面定位。例如,具有L131T、S172D突变的经工程改造的受体显示出与亲本嵌合体相当的定位,如通过HA标签所评价的。此外,具有Y115D、L131E突变的经工程改造的受体通过两种技术 (也就是说,如通过HA标签以及α-银环蛇毒素所评价的) 显示出与亲本嵌合体相当的定位。

[0402] 实施例6:CR-11经工程改造的受体的表征

[0403] 高通量电生理学平台指示,包含具有在SEQ ID NO:33中的Y115D和L131Q氨基酸置换的氨基酸序列的经工程改造的受体对乙酰胆碱的效能与野生型受体相比降低了超过500倍,而其对RG-3487的效能增加了超过10倍。

[0404] 使用全细胞手工膜片箝电生理学,在HEK293细胞和培养的大鼠背根神经节 (DRG) 感觉神经元中,证实了包含具有在SEQ ID NO:33中的Y115D和L131Q氨基酸置换的氨基酸序列的经工程改造的受体对乙酰胆碱基本上不敏感,但是与野生型nAChRα7受体相比对RG-3487更敏感。参见图2。

[0405] 在HEK293细胞中,不可确定包含具有在SEQ ID NO:33中的Y115D和L131Q氨基酸置换的氨基酸序列的经工程改造的受体对ACh的EC₅₀,因为几乎没有电流可以产生,即使在最高达100mM的ACh浓度。相反,野生型nAChRα7受体对ACh的EC₅₀为42.4μM (图2A)。进一步证实了高通量数据,手工膜片箝电生理学结果也表明,与野生型nAChRα7受体 (EC₅₀=2.9μM) 相比,包含具有在SEQ ID NO:33中的Y115D和L131Q氨基酸置换的氨基酸序列的经工程改造的受体对RG-3487 (SA-2) 更敏感 (具有EC₅₀=0.3μM) (图2B)。

[0406] 在培养的细胞表达包含具有在SEQ ID NO:33中的Y115D和L131Q氨基酸置换的氨基酸序列的经工程改造的受体的成年大鼠DRG神经元中, RG-3487 (SA-2) 的应用以剂量依赖性的方式产生了氯离子电流 (图3), 尽管这样的电流在非转导细胞中未观察到。

[0407] 另外, 在转导的大鼠DRG神经元中用3 μ M浓度的RG-3487 (SA-2) 对包含具有在SEQ ID NO:33中的Y115D和L131Q氨基酸置换的氨基酸序列的经工程改造的受体的活化可逆地抑制电流注射诱发的动作电位 (图4A), 引起动作电位所需的电流增加了约3倍 ($n=7$)。3.0mM的乙酰胆碱对在转导的神经元中的诱发动作电位没有影响 ($n=4$) (图4B)。这些结果表明, 包含具有在SEQ ID NO:33中的Y115D和L131Q氨基酸置换的氨基酸序列的经工程改造的受体在DRG神经元中的表达可以抑制诱发动作电位。

[0408] 实施例7. 在IPSC-衍生的神经元中的经工程改造的受体的表征 (预示性的)

[0409] 开发了产生IPSC-衍生的A β 神经元的分化方案。使用下述标志物将细胞定义为A β 神经元; 表达神经丝200 (NF200), 其描绘有髓鞘的初级传入神经元 (Basbaum等人, 2009); Piezo 2, 即低阈值机械感受器感觉神经元 (LTMR) 的标志物 (Ranade等人, 2014); 和TLR5, 即据报道也标记A β 纤维的tol1-样受体 (Xu等人, 2015)。所述表征还将包括评价伤害感受器特异性标志物TrpV1的缺失, 该标志物在许多C和A β 纤维中表达 (Caterina等人, 1997); 前列腺酸性磷酸酶, 其描绘非肽能的无髓鞘的传入物 (Zylka等人, 2009); 和NaV1.1, 即A β 感受伤害的神经元的标志物。将满足以上标准的IPSC-衍生的神经元进一步表征为在没有c-Ret表达存在下快速地适应LTMR (基于c-Ret和MafA/C-Maf的表达) 或缓慢地适应LTMR (基于TrkB和Shox2的表达) (Koch等人, 2018)。

[0410] (1) 证实满足A β 神经元的以上表达标志物标准的细胞具有非伤害感受性感觉神经元特有的电生理学性能。这些性能包括响应于配体的电流产生和直流电注射诱发动作电位。

[0411] (2) 证实用选择的化学源性受体 (经工程改造的受体) 转导的神经元中氯离子电流的存在。用慢病毒载体 (其编码具有IRES GFP的HA-标记的化学源性受体) 转导细胞以通过GFP荧光鉴定转导的细胞。以电位箱模式检测响应于合成激动剂的氯离子电流, 用NMDG⁺作为内部/外部流体阳离子。由于NMDG⁺是阳离子通道不可渗透的, 它的包含消除了响应于研究的合成激动剂的任何内源性nAChR α 7阳离子电流。然后确定化学源性受体-合成激动剂对的EC₅₀。读出后, 使用针对HA标签的抗体在渗透化处理的和未渗透化处理的细胞中通过荧光显微术评价受体的表达和细胞表面定位。

[0412] (3) 评估抑制电流注射诱发的动作电位的能力。用慢病毒载体 (其编码具有IRES GFP的HA-标记的化学源性受体) 转导细胞以通过GFP荧光鉴定转导的细胞。在电流箱模式中, 通过电流的递增施加直到细胞膜除极化, 确定在有和没有合成激动剂存在下的基本电流强度。将结果与仅用GFP转导的细胞进行对比。

[0413] (4) 评估对输入阻抗的影响。用慢病毒载体 (其编码具有IRES GFP的HA-标记的化学源性受体) 转导细胞以通过GFP荧光鉴定细胞。在电流箱模式中, 为了计算输入阻抗, 注射低于阈值的电流并确定引起的膜电位的变化。将结果与仅用GFP转导的细胞进行对比。

[0414] (5) 在有和没有合成激动剂存在下评估对静止膜电位的影响。用慢病毒载体 (其编码具有IRES GFP的HA-标记的化学源性受体) 转导细胞以通过GFP荧光鉴定转导的细胞。在电位箱模式, 在有和没有合成激动剂存在下确定静止膜电位。将结果与仅用GFP转导的细胞

进行对比。

[0415] 将在IPSC-衍生的AB神经元中的以上电生理学性能与在IPSC-衍生的C-纤维神经元以及成年大鼠DRG神经元中的那些进行对比。另外,由于受损伤的AB纤维传入物中的生化变化可以促进神经病状态中的自发性疼痛,在体外损伤后研究了IPSC衍生的AB神经元的电生理学性能。为了产生体外损伤,将细胞收获并在培养物中已经伸出突起后重新铺板。重新铺板过程会切断突起,从而模仿轴突损伤。在损伤后的不同时间点,评价细胞的各种电生理学性能,包括:自发动作电位的产生,静止膜电位的变化,和基本电流强度的变化。还在受损伤的状态评价了化学源性受体的影响。

[0416] 实施例8. 评估经工程改造的受体在动物模型中治疗疾病的效力

[0417] 关于它们在施用小分子配体后在神经性疼痛的大鼠模型中提供镇痛的能力,评估了本文公开的经工程改造的受体。使用标准的分子生物学技术,构建了含有人突触蛋白-1(hSYN)启动子的AAV表达盒,所述启动子连接至编码野生型 $\alpha 7$ -nAChR或本文公开的经工程改造的嵌合受体中的任一种的多核苷酸。

[0418] 将这些AAV表达盒亚克隆进AAV杆粒中,纯化,转染进Sf9昆虫细胞中以产生重组杆状病毒,并且然后扩增。将Sf9细胞用扩增的重组杆状病毒和另一种重组杆状病毒双重感染以产生重组AAV载体,所述扩增的重组杆状病毒含有野生型 $\alpha 7$ -nAChR或上述的经工程改造的嵌合受体盒中的任一种,所述另一种重组杆状病毒含有Rep和AAV6(Y705+731F+T492V)Cap基因。将病毒载体纯化,使用qPCR确定病毒滴度,并且使用SDS-PAGE来验证AAV载体的纯度。

[0419] 行为实验和疼痛模型:为了在模仿神经性疼痛病症的模型中产生机械超敏反应,使用了多余神经损伤(SNI)模型(一种经过验证的机械痛觉超敏模型)(Shields等人,2003, The Journal of Pain,4,465-470)。通过将腓总神经和腓肠神经切开并分离出胫骨分支而产生此模型。通过将大鼠放置在升高的金属丝网网格上并用von Frey细丝刺激后爪的脚底表面来评估机械缩回阈值。

[0420] AAV注射到大鼠的脊髓中:在腰椎膨大水平处进行背侧半椎板切除术,以暴露腰椎脊髓的两个区段(约1.5-2mm),之后将硬膜切开并反射。将病毒溶液装入玻璃微量移液器(预装有矿物油)中。将微量移液器连接到安装在立体定位设备上的手动微型注射器。将病毒溶液靶向背侧角(左侧)。沿暴露的区域内的头尾轴,以等距线性方式进行6次注射,每次240nl。在每次注射后,观察1分钟的静止时间,并且然后缝合肌肉层,用缝钉闭合皮肤,并且在将动物放回其居住笼之前用加热的垫使动物恢复。在最后的试验后,对动物进行灌注以进行组织学分析。

[0421] AAV神经节内注射到大鼠的背根神经节(DRG)中:用硼硅玻璃毛细管(0.78/1mm内部/外部直径)进行注射,所述硼硅玻璃毛细管被拉至细点,所述细点通过聚乙烯管道(0.4/0.8mm内部/外部直径)连接到安装在显微注射泵中的注射器上。将针头安装在向外摆动的立体定位框架的延长臂(仅用于固定和操纵针头)上。将管道、注射器和针头都充满水。将一微升空气吸入到针头中,然后吸入3 μ L的病毒载体溶液。对于每次注射,给针头分别装载此体积。在手术前将动物麻醉。沿背侧中线切开后,通过除去椎骨的外侧突而露出L4和L5 DRG。打开位于DRG之上的神经外膜,并且将玻璃针插入到神经节中到距离暴露的神经节的表面400 μ m的深度。延迟3分钟以允许密封在玻璃毛细管尖端周围的组织后,以0.2微升/分

钟的速率注射1.1 μ L病毒溶液。另外延迟2分钟后,取走针头。首先注射L4神经节,然后注射L5神经节。用5-0缝线将覆盖脊髓的肌肉松散地缝合到一起,并闭合伤口。使动物在37℃恢复并接受术后镇痛。

[0422] AAV鞘内注射进大鼠中:首先将大鼠麻醉,并且然后垂直放置,它们的头固定在立体定位框架中。在颈部的底部作出切口以露出颈脊的沟槽。在池膜中作出切口(1-2mm)至一定深度,使得脑脊液漏出。然后将4cm 32G鞘内导管沿腰椎脊髓的方向缓慢插入,并通过围绕导管的缝线来闭合皮肤。然后使大鼠恢复。然后将大鼠麻醉并施用载体(6 μ L)。用6 μ L的PBS冲洗导管并且然后将其取出,并且使大鼠恢复。

[0423] 施用的影响:通过将腓总神经和腓肠神经切开并分离出大鼠的胫骨分支而产生此SNI模型。在将AAV.hSYN- α 7-nAChR/GlyR α 1注射到脊髓、DRG或鞘内空间中之前,使用Chaplan和Yaksh的上下法来确定机械阈值。在单侧载体注射后三周,再次对动物进行试验以验证其机械缩回阈值没有改变。还在注射之前和之后,使用最大速度为33rpm的加速旋转杆(Stoelting,USA)试验运动协调性。记录大鼠花费在旋转杆上的持续时间,截止时间为300秒。每只大鼠经过三个训练试验并在两小时后进行试验。

[0424] 随后,对每个嵌合体组群中的一半大鼠施用AZD-0328或Facinicine的单次腹膜内注射,并在腹膜内注射后1、2、5、7和13天使用上下法试验机械阈值。在第三天,当阈值已经恢复到损伤后基线时,再次腹膜内注射AZD-0328,并再次观察向非损伤基线阈值的恢复。跟踪这些动物48小时。然后对动物进行灌注以用于组织学分析。

[0425] 实施例9:遭受慢性疼痛的患者的治疗

[0426] 在一个非限制性实施例中,使用本文公开的组合物和方法治疗遭受慢性神经根痛的患者。在第一天,用在直接递送进一个或多个背根神经节(即,向腰、颈或胸DRG中的神经节内对流增强的递送)中的1.0mL体积中的 10^{13} 个AAV.hSYN载体基因组(其可操作地连接至编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的多核苷酸)治疗患者。在该实施例中,所述AAV载体在人突触蛋白-1(SYN1)启动子的控制下编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种以实现选择性神经元表达。注射后两周,患者返回诊所接受AZD-0328或另一种非天然配体的处方。患者根据需要(即,在疼痛发作期间)通过口服自我施用0.1mg/kg AZD-0328或另一种非天然配体。

[0427] 实施例10.遭受慢性疼痛的患者的治疗

[0428] 在一个非限制性实施例中,使用本文公开的组合物和方法治疗遭受慢性颅面痛(例如,三叉神经痛或颞下颌关节功能障碍)的患者。在第一天,用在直接递送进三叉神经节(即,神经节内对流增强的递送)中的0.150mL体积中的 10^{13} 个AAV.hSYN载体基因组(其可操作地连接至编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的多核苷酸)治疗患者。在该实施例中,所述AAV载体在人突触蛋白-1(SYN1)启动子的控制下编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种以实现选择性神经元表达。注射后两周,患者返回诊所接受AZD-0328或另一种非天然配体的处方。患者根据需要(即,在疼痛发作期间)通过口服自我施用0.1mg/kg AZD-0328或另一种非天然配体。

[0429] 实施例11.遭受肥胖的患者的治疗

[0430] 在一个非限制性实施例中,使用本文公开的组合物和方法治疗遭受肥胖的患者。在第一天用在直接递送进迷走神经(即,神经内)的胃分支中的1.0mL体积中的 10^{13} 个

AAV.Ghrelin载体基因组(其可操作地连接至编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的多核苷酸)治疗患者。在该实施例中,所述AAV载体在人Ghrelin启动子的控制下编码经工程改造的受体以实现选择性神经元表达。注射后两周,患者返回诊所接受AZD-0328或另一种非天然配体的处方。患者每天通过口服自我施用0.1mg/kg AZD-0328或另一种非天然配体以实现过剩重量减轻(即为了食欲抑制)。

[0431] 实施例12.遭受肥胖的患者的治疗

[0432] 在一个非限制性实施例中,使用本文公开的组合物和方法治疗遭受肥胖的患者。在第一天用在直接递送进支配胰腺的背根神经节(即,神经节内)中的1.0mL体积中的 10^{13} 个AAV-TRPV1载体基因组(其可操作地连接至编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的多核苷酸)治疗患者。在该实施例中,所述AAV载体在人TRPV1启动子的控制下编码经工程改造的受体以实现在伤害感受器中的选择性神经元表达。注射后两周,患者返回诊所接受AZD-0328或另一种非天然配体的处方。患者每天通过口服自我施用0.1mg/kg AZD-0328或另一种非天然配体以实现过剩重量减轻。

[0433] 实施例13.遭受肥胖的患者的治疗

[0434] 在一个非限制性实施例中,使用本文公开的组合物和方法治疗遭受肥胖的患者。在第一天用在直接递送进下丘脑中的室旁核(PVH)(即,颅内的、对流增强的递送)中的1.0mL体积中的 10^{13} 个AAV-SIM1载体基因组(其可操作地连接至编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的多核苷酸)治疗患者。在该实施例中,所述AAV载体在人专心(Single-Minded)家族BHLH转录因子1(SIM1)启动子的控制下编码经工程改造的通道以实现在阿黑皮素原(POMC)神经元中的选择性神经元表达并最终刺激减食欲途径。注射后两周,患者返回诊所接受AZD-0328或另一种非天然配体的处方。患者每天通过口服自我施用0.15mg/kg AZD-0328或另一种非天然配体以实现过剩重量减轻(即为了食欲抑制)。

[0435] 实施例14.遭受PTSD的患者的治疗

[0436] 在一个非限制性实施例中,使用本文公开的组合物和方法治疗遭受创伤后应激障碍(PTSD)的患者。在第一天用在直接递送进C6星状神经节(即,神经节内)中的1.0mL体积中的 10^{13} 个AAV-hSYN1载体基因组(其可操作地连接至编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的多核苷酸)治疗患者。在该实施例中,所述AAV载体在人突触蛋白-1(hSYN1)启动子的控制下编码经工程改造的受体以实现选择性神经元表达。注射后两周,患者返回诊所接受AZD-0328或另一种非天然配体的处方。患者因为PTSD症状(即因为焦虑)每天通过口服自我施用0.15mg/kg AZD-0328或另一种非天然配体。

[0437] 实施例15.遭受抑郁症的患者的治疗

[0438] 在一个非限制性实施例中,使用本文公开的组合物和方法治疗遭受治疗抗性的抑郁症(TRD)的患者。在第一天用在直接递送进迷走神经(即,神经内)中的1.0mL体积中的 10^{13} 个AAV-hSYN1载体基因组(其可操作地连接至编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的多核苷酸)治疗患者。在该实施例中,所述AAV载体在人突触蛋白-1(hSYN1)启动子的控制下编码经工程改造的受体以实现选择性神经元表达。注射后两周,患者返回诊所接受AZD-0328或另一种非天然配体的处方。患者因为抑郁症症状每天通过口服自我施用0.1mg/kg AZD-0328或另一种非天然配体。

[0439] 实施例16.遭受GERD的患者的治疗

[0440] 在一个非限制性实施例中,使用本文公开的组合物和方法治疗遭受胃食管反流疾病(GERD)的患者。在第一天用在分别直接递送进食管下端括约肌(LES)迷走神经和肠肌丛(即,神经内)或平滑肌(肌肉内)中的1.0mL体积中的 10^{13} 个AAV-hSYN1(其可操作地连接至编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的多核苷酸)或AAV-CAG(其可操作地连接至编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的多核苷酸)载体基因组治疗患者。在该实施例中,所述AAV载体在人突触蛋白-1(hSYN1)启动子(对于选择性神经元表达)或CAG启动子(对于在LES肌细胞中的表达)的控制下编码经工程改造的受体。注射后两周,患者返回诊所所以接受AZD-0328或另一种非天然配体的处方。患者因为GERD的症状(即酸回流)每天通过口服自我施用0.15mg/kg AZD-0328或另一种非天然配体。

[0441] 实施例17.遭受癫痫的患者的治疗

[0442] 在一个非限制性实施例中,使用本文公开的组合物和方法治疗遭受与癫痫有关的癫痫发作的患者。在第一天用在直接递送进预定癫痫发作病灶诸如运动皮质(即,颅内)中的1.0mL体积中的 10^{13} 个AAV-CamKII α 载体基因组(其可操作地连接至编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的多核苷酸)治疗患者。在该实施例中,所述AAV载体在人钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II α (CamKII α)启动子的控制下编码经工程改造的受体以实现在兴奋性神经元中的选择性神经元表达。注射后两周,患者返回诊所所以接受AZD-0328的处方。患者因为癫痫症状(即癫痫发作)每天通过口服自我施用0.1mg/kg AZD-0328。

[0443] 实施例18.遭受运动障碍的患者的治疗

[0444] 在一个非限制性实施例中,使用本文公开的组合物和方法治疗遭受运动障碍(例如帕金森病震颤)的患者。在第一天用在直接递送进底丘脑核(即,颅内的STN)中的1.0mL体积中的 10^{13} 个AAV-CamKII α 载体基因组(其可操作地连接至编码本文公开的经工程改造的受体中的任一种的多核苷酸)治疗患者。在该实施例中,所述AAV载体在人钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II α (CamKII α)启动子的控制下编码经工程改造的受体以实现在兴奋性神经元中的选择性神经元表达。注射后两周,患者返回诊所所以接受AZD-0328的处方。患者因为运动障碍症状(即震颤)每天通过口服自我施用0.1mg/kg AZD-0328。

[0445] 其它编号的实施方案

[0446] 在下面的编号的实施方案中提供了本发明的其它实施方案:

[0447] 实施方案1.一种经工程改造的受体,其包含:

[0448] 从人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)衍生出的并且包含来自人甘氨酸受体 $\alpha 1$ 亚基的Cys-环结构域的配体结合结构域;和

[0449] 从人甘氨酸受体 $\alpha 1$ 亚基衍生出的离子孔结构域,

[0450] 其中所述配体结合结构域包含:(i)在选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸残基处的两个氨基酸置换:L131和S172,Y115和S170,以及Y115和L131;或(ii)L131E的氨基酸置换,其中所述氨基酸残基对应于 $\alpha 7$ -nAChR的氨基酸残基,

[0451] 其中所述经工程改造的受体是嵌合的配体门控离子通道(LGIC)受体。

[0452] 实施方案1.1实施方案1的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列进一步包含在选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸残基处的两个氨基酸置换:L131和S172,Y115和S170,以及Y115和L131;或L131E的氨基酸置换,其中所述氨基酸残基对应于 $\alpha 7$ -nAChR的氨基酸残基。

[0453] 实施方案2.实施方案1或1.1的经工程改造的受体,其中所述配体结合结构域包含在选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸残基处的两个氨基酸置换:L131和S172,Y115和S170,以及Y115和L131。

[0454] 实施方案3.实施方案1、1.1或2中的任一个的经工程改造的受体,其中所述配体结合结构域包含选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸置换:L131S和S172D,L131T和S172D,L131D和S172D,Y115D和S170T,Y115D和L131Q,以及Y115D和L131E。

[0455] 实施方案3.1实施方案1-3中的任一个的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列进一步包含选自由以下成员组成的集合的一对氨基酸置换:L131S和S172D,L131T和S172D,L131D和S172D,Y115D和S170T,Y115D和L131Q,以及Y115D和L131E。

[0456] 实施方案4.实施方案1或1.1的经工程改造的受体,其中所述配体结合结构域包含L131E的氨基酸置换。

[0457] 实施方案4.1权利要求1-4中的任一项所述的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列进一步包含L131E的氨基酸置换。

[0458] 实施方案5.实施方案1-4.1中的任一个的经工程改造的受体,其中所述Cys-环结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸166-172。

[0459] 实施方案6.实施方案1-4.1中的任一个的经工程改造的受体,其中所述Cys-环结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸166-180。

[0460] 实施方案7.实施方案1-6中的任一个的经工程改造的受体,其中所述受体包含来自人甘氨酸受体 $\alpha 1$ 亚基的 $\beta 1$ -2环结构域。

[0461] 实施方案8.实施方案7的经工程改造的受体,其中所述 $\beta 1$ -2环结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸81-84。

[0462] 实施方案8.1:实施方案1-8中的任一个的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体包含选自由以下成员组成的集合的氨基酸序列:SEQ ID No.58-63。

[0463] 实施方案9.实施方案1-8中的任一个的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体对乙酰胆碱的效能低于人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对乙酰胆碱的效能。

[0464] 实施方案10.实施方案9的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体对乙酰胆碱的效能比人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对乙酰胆碱的效能低至少2倍。

[0465] 实施方案11.实施方案1-10中的任一个的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体对非天然配体的效能与人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对非天然配体的效能大约相同。

[0466] 实施方案12.实施方案1-11中的任一个的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体对非天然配体的效能高于人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对非天然配体的效能。

[0467] 实施方案13.实施方案12的经工程改造的受体,其中所述经工程改造的受体对非天然配体的效能比人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)对非天然配体的效能高至少2倍。

[0468] 实施方案14.实施方案9-13中的任一个的经工程改造的受体,其中确定所述效能包括确定EC50。

[0469] 实施方案15.实施方案1-14中的任一个的经工程改造的受体,其中在有非天然配体存在下所述经工程改造的受体的效力高于在有非天然配体存在下人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)的效力。

[0470] 实施方案16.实施方案1-15中的任一个的经工程改造的受体,其中在有非天然配体存在下所述经工程改造的受体的效力比在有非天然配体存在下人 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ -nAChR)的效力高至少2倍。

[0471] 实施方案17.实施方案15-16中的任一个的经工程改造的受体,其中确定所述效力包括确定在有非天然配体存在下在体外穿过经工程改造的受体的电流的量。

[0472] 实施方案18.实施方案11-17中的任一个的经工程改造的受体,其中所述非天然配体选自由以下成员组成的集合:AZD-0328、TC-6987、ABT-126、APN-1125、TC-5619和Facinicine/RG3487。

[0473] 实施方案19.实施方案18的经工程改造的受体,其中所述非天然配体选自由以下成员组成的集合:ABT-126、RG3487和APN-1125。

[0474] 实施方案20.实施方案18的经工程改造的受体,其中所述非天然配体是TC-5619。

[0475] 实施方案21.一种多核苷酸,其包含编码实施方案1-20中的任一个的经工程改造的受体的核酸。

[0476] 实施方案22.实施方案21的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含可操作地连接至编码经工程改造的受体的核酸的启动子。

[0477] 实施方案23.实施方案22的多核苷酸,其中所述启动子是可调节的启动子。

[0478] 实施方案24.实施方案23的多核苷酸,其中所述可调节的启动子在可兴奋细胞中是有活性的。

[0479] 实施方案25.实施方案24的多核苷酸,其中所述可兴奋细胞是神经元或肌细胞。

[0480] 实施方案26.实施方案25的多核苷酸,其中所述可兴奋细胞是神经元。

[0481] 实施方案27.一种载体,其包含实施方案21-26中的任一个的多核苷酸。

[0482] 实施方案28.实施方案27的载体,其中所述载体是质粒或病毒载体。

[0483] 实施方案29.实施方案28的载体,其中所述载体是选自由以下成员组成的集合的病毒载体:腺病毒载体、逆转录病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体和单纯疱疹-1病毒载体(HSV-1)。

[0484] 实施方案30.实施方案29的载体,其中所述病毒载体是AAV载体,且其中所述AAV载体是AAV5或其变体、AAV6或其变体或AAV9或其变体。

[0485] 实施方案31.一种组合物,其包含实施方案1-20中的任一个的经工程改造的受体、实施方案21-26中的任一个的多核苷酸或实施方案27-30中的任一个的载体。

[0486] 实施方案32.一种药物组合物,其包含实施方案1-20中的任一个的经工程改造的受体、实施方案21-26中的任一个的多核苷酸或实施方案27-30中的任一个的载体;和药学上可接受的载体。

[0487] 实施方案33.一种在神经元中产生经工程改造的受体的方法,所述方法包括使所述神经元与实施方案21-26中的任一个的多核苷酸、实施方案27-30中的任一个的载体、实施方案31的组合物或实施方案32的药物组合物接触。

[0488] 实施方案34.实施方案33的方法或实施方案26的多核苷酸,其中所述神经元是周

围神经系统的神经元。

[0489] 实施方案35.实施方案33或34的方法或实施方案26的多核苷酸,其中所述神经元是中枢神经系统的神经元。

[0490] 实施方案36.实施方案33-35中的任一个的方法或实施方案26的多核苷酸,其中所述神经元是感受伤害的神经元。

[0491] 实施方案37.实施方案33-36中的任一个的方法或实施方案26的多核苷酸,其中所述神经元是非感受伤害的神经元。

[0492] 实施方案38.实施方案33-37中的任一个的方法或实施方案26的多核苷酸,其中所述神经元是背根神经节(DRG)神经元、三叉神经节(TG)神经元、运动神经元、兴奋性神经元、抑制性神经元或感觉神经元。

[0493] 实施方案39.实施方案33-38中的任一个的方法或实施方案26的多核苷酸,其中所述神经元是A δ 传入纤维、C纤维或A β 传入纤维。

[0494] 实施方案40.实施方案39的方法或实施方案26的多核苷酸,其中所述神经元是A β 传入纤维。

[0495] 实施方案41.实施方案40的方法或实施方案26的多核苷酸,其中A β 传入纤维是受损伤的A β 传入纤维。

[0496] 实施方案42.实施方案40的方法或实施方案26的多核苷酸,其中A β 传入纤维是未受损伤的A β 传入纤维。

[0497] 实施方案43.实施方案33-42中的任一个的方法或实施方案26的多核苷酸,其中所述神经元表达神经丝200(NF200)、piezo 2和TLR-5。

[0498] 实施方案44.实施方案33-43中的任一个的方法或实施方案26的多核苷酸,其中所述神经元不表达TrpV1、前列腺酸性磷酸酶、NaV1.1。

[0499] 实施方案45.实施方案33-44中的任一个的方法,其中在体外、离体或在体内进行所述接触步骤。

[0500] 实施方案46.实施方案45的方法,其中在受试者中在体内进行所述接触步骤。

[0501] 实施方案47.实施方案46的方法,其中所述接触步骤包括将所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用给所述受试者。

[0502] 实施方案48.实施方案45的方法,其中在体外或离体进行所述接触步骤。

[0503] 实施方案49.实施方案48的方法,其中所述接触步骤包括脂质体转染、纳米颗粒递送、颗粒轰击、电穿孔、声处理或显微注射。

[0504] 实施方案50.实施方案33-49中的任一个的方法,其中所述经工程改造的受体能够定位至所述神经元的细胞表面。

[0505] 实施方案51.一种抑制神经元活性的方法,所述方法包括(a)使所述神经元与实施方案1-20中的任一个的经工程改造的受体、实施方案21-26中的任一个的多核苷酸、实施方案27-30中的任一个的载体、实施方案31的组合物或实施方案32的药物组合物接触,和(b)使所述神经元与所述经工程改造的受体的非天然配体接触。

[0506] 实施方案51.1实施方案51的方法,其中所述神经元是周围神经系统的神经元。

[0507] 实施方案51.2实施方案51的方法,其中所述神经元是中枢神经系统的神经元。

[0508] 实施方案52.实施方案51-51.2中的任一个的方法,其中所述神经元是感受伤害的

神经元。

[0509] 实施方案53.实施方案51-51.2中的任一个的方法,其中所述神经元是非感受伤害的神经元。

[0510] 实施方案54.实施方案51-53中的任一个的方法,其中所述神经元是背根神经节(DRG)神经元、三叉神经节(TG)神经元、运动神经元、兴奋性神经元、抑制性神经元或感觉神经元。

[0511] 实施方案55.实施方案51-54中的任一个的方法,其中所述神经元是A δ 传入纤维、C纤维或A β 传入纤维。

[0512] 实施方案56.实施方案55的方法,其中所述神经元是A β 传入纤维。

[0513] 实施方案57.实施方案56的方法,其中A β 传入纤维是受损伤的A β 传入纤维。

[0514] 实施方案58.实施方案56的方法,其中A β 传入纤维是未受损伤的A β 传入纤维。

[0515] 实施方案59.实施方案51-58中的任一个的方法,其中所述神经元表达神经丝200(NF200)、piezo 2和TLR-5。

[0516] 实施方案60.实施方案51-59中的任一个的方法,其中所述神经元不表达TrpV1、前列腺酸性磷酸酶、NaV1.1。

[0517] 实施方案61.实施方案51-60中的任一个的方法,其中在体外、离体或在体内进行所述接触步骤(a)。

[0518] 实施方案62.实施方案51-61中的任一个的方法,其中在体外、离体或在体内进行所述接触步骤(b)。

[0519] 实施方案63.实施方案51-62中的任一个的方法,其中在受试者中在体内进行所述接触步骤(a)和/或(b)。

[0520] 实施方案64.实施方案63的方法,其中所述接触步骤(a)包括将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体或所述药物组合物施用给所述受试者;和/或所述接触步骤(b)包括将所述非天然配体施用给所述受试者。

[0521] 实施方案65.实施方案51-64中的任一个的方法,其中所述接触步骤(a)和/或(b)包括脂质体转染、纳米颗粒递送、颗粒轰击、电穿孔、声处理或显微注射。

[0522] 实施方案66.实施方案51-65中的任一个的方法,其中所述经工程改造的受体能够定位至所述神经元的细胞表面。

[0523] 实施方案67.一种在有此需要的受试者中治疗神经学障碍和/或延迟神经学障碍的发作的方法,所述方法包括:

[0524] 给所述受试者施用治疗有效量的实施方案1-20中的任一个的经工程改造的受体、实施方案21-26中的任一个的多核苷酸、实施方案27-30中的任一个的载体、实施方案31的组合物或实施方案32的药物组合物,和

[0525] 给所述受试者施用所述经工程改造的受体的非天然配体。

[0526] 实施方案68.实施方案67的方法,其中在步骤(a)之后给所述受试者施用所述非天然配体。

[0527] 实施方案69.实施方案67的方法,其中与步骤(a)并行地给所述受试者施用所述非天然配体。

[0528] 实施方案70.实施方案67-69中的任一个的方法,其中所述神经学障碍是癫痫发作

障碍、运动障碍、进食障碍、脊髓损伤、神经源性膀胱障碍、痛觉超敏、痉挛状态障碍、瘙痒、阿尔茨海默氏病、帕金森病、创伤后应激障碍 (PTSD)、胃食管反流疾病 (GERD)、成瘾、焦虑、抑郁症、记忆丧失、痴呆、睡眠呼吸暂停、中风、发作性睡病、尿失禁、特发性震颤、三叉神经痛、口腔烧灼综合征或心房颤动。

[0529] 实施方案71. 实施方案70的方法, 其中所述神经学障碍是痛觉超敏。

[0530] 实施方案72. 实施方案67-71中的任一个的方法, 其中所述非天然配体选自由以下成员组成的集合: AZD-0328、ABT-126、TC6987、APN-1125、TC-5619和Facinicline/RG3487。

[0531] 实施方案73. 实施方案67-72中的任一个的方法, 其中口服地、皮下地、局部地或静脉内地施用所述非天然配体。

[0532] 实施方案74. 实施方案73的方法, 其中口服地施用所述非天然配体。

[0533] 实施方案75. 实施方案67-74中的任一个的方法, 其中皮下地、口服地、鞘内地、局部地、静脉内地、神经节内地、神经内地、颅内地、椎管内地或向小脑延髓池施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。

[0534] 实施方案76. 实施方案67-75中的任一个的方法, 其中通过经椎间孔注射或鞘内地施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。

[0535] 实施方案77. 实施方案67-76中的任一个的方法, 其中所述受试者遭受三叉神经痛, 且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的三叉神经节 (TG)。

[0536] 实施方案78. 实施方案67-76中的任一个的方法, 其中所述受试者遭受神经性疼痛, 且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的背根神经节 (DRG)。

[0537] 实施方案79. 实施方案67-78中的任一个的方法, 其中所述受试者是人。

[0538] 实施方案80. 实施方案67-79中的任一个的方法, 其中所述治疗有效量减轻所述神经学障碍的征象和/或症状的严重程度。

[0539] 实施方案81. 实施方案67-80中的任一个的方法, 其中所述治疗有效量延迟所述神经学障碍的征象和/或症状的发作。

[0540] 实施方案82. 实施方案67-81中的任一个的方法, 其中所述治疗有效量消除所述神经学障碍的征象和/或症状。

[0541] 实施方案83. 实施方案80-82中的任一个的方法, 其中所述神经学障碍的征象是神经损伤、神经萎缩和/或癫痫发作。

[0542] 实施方案84. 实施方案83的方法, 其中所述神经损伤是周围神经损伤。

[0543] 实施方案85. 实施方案80-84中的任一个的方法, 其中所述神经学障碍的症状是疼痛。

[0544] 实施方案86. 一种在有此需要的受试者中治疗疼痛和/或延迟疼痛发作的方法, 所述方法包括:

[0545] 给所述受试者施用治疗有效量的实施方案1-20中的任一个的经工程改造的受体、实施方案21-26中的任一个的多核苷酸、实施方案27-30中的任一个的载体、实施方案31的组合物或实施方案32的药物组合物, 和

[0546] 给所述受试者施用所述经工程改造的受体的非天然配体。

[0547] 实施方案87.实施方案86的方法,其中在步骤(a)之后给所述受试者施用所述非天然配体。

[0548] 实施方案88.实施方案86的方法,其中与步骤(a)并行地给所述受试者施用所述非天然配体。

[0549] 实施方案89.实施方案86-88中的任一个的方法,其中所述非天然配体选自以下成员组成的集合:AZD-0328、ABT-126、TC6987、APN-1125、TC-5619和Facinicine/RG3487。

[0550] 实施方案90.实施方案86-89中的任一个的方法,其中口服地、皮下地、局部地或静脉内地施用所述非天然配体。

[0551] 实施方案91.实施方案90的方法,其中口服地施用所述非天然配体。

[0552] 实施方案92.实施方案86-91中的任一个的方法,其中皮下地、口服地、鞘内地、局部地、静脉内地、神经节内地、神经内地、颅内地、椎管内地或向小脑延髓池施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。

[0553] 实施方案93.实施方案86-92中的任一个的方法,其中通过经椎间孔注射或鞘内地施用所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物。

[0554] 实施方案94.实施方案86-93中的任一个的方法,其中所述受试者遭受三叉神经痛,且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的三叉神经节(TG)。

[0555] 实施方案95.实施方案86-94中的任一个的方法,其中所述受试者遭受神经性疼痛,且其中将所述经工程改造的受体、所述多核苷酸、所述载体、所述组合物或所述药物组合物施用至所述受试者的背根神经节(DRG)。

[0556] 实施方案96.实施方案86-95中的任一个的方法,其中所述受试者是人。

[0557] 实施方案97.实施方案85-96中的任一个的方法,其中所述疼痛是神经性疼痛。

[0558] 实施方案98.实施方案85-97中的任一个的方法,其中所述疼痛与化学疗法有关,由化学疗法造成,或起因于化学疗法。

[0559] 实施方案99.实施方案85-98中的任一个的方法,其中所述疼痛与创伤有关,由创伤造成,或起因于创伤。

[0560] 实施方案100.实施方案85-99中的任一个的方法,其中所述受试者遭受痛觉超敏。

[0561] 实施方案101.实施方案85-100中的任一个的方法,其中所述疼痛在医学操作后出现。

[0562] 实施方案102.实施方案85-101中的任一个的方法,其中所述疼痛与分娩或剖腹产术有关,由分娩或剖腹产术造成,或起因于分娩或剖腹产术。

[0563] 实施方案103.实施方案85-102中的任一个的方法,其中所述疼痛与偏头痛有关,由偏头痛造成,或起因于偏头痛。

[0564] 实施方案104.实施方案85-103中的任一个的方法,其中所述治疗有效量暂时减轻所述受试者中的疼痛,永久地减轻所述受试者中的疼痛,预防所述受试者中的疼痛发作,和/或消除所述受试者中的疼痛。

[0565] 实施方案105.实施方案85-104中的任一个的方法,其中在所述受试者中出现疼痛之前进行步骤(a)和(b)。

[0566] 前述内容仅仅解释了本公开内容的原理。应当理解,本领域技术人员将能够设计

各种布置,所述布置尽管没有在本文中明确地描述或示出,但体现本公开内容的原理并且被包括在其精神和范围内。此外,本文所叙述的所有实施例和条件性语言主要旨在帮助读者理解本公开内容的原理和发明人为改进现有技术所贡献的概念,并且不应被解释为没有限制地成为这样的特别叙述的实施例和条件。此外,本文中叙述本公开内容的原理、方面和实施方案及其具体实施例的所有陈述意图涵盖其结构等效物和功能等效物。另外,这样的等效物意图包括当前已知的等效物和在未来开发的等效物,即,不考虑结构而执行相同功能的所开发的任何元件。因此,本公开内容的范围无意限于本文中所示出和描述的示例性实施方案。相反,本公开内容的范围和精神由所附权利要求书体现。

序列表

<110> 科达生物治疗医药有限公司

<120> 用于神经学疾病的组合物和方法

<130> SWCH-029/01W0 322917-2436

<150> US 62/889,963

<151> 2019-08-21

<160> 63

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 1835

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

caacagacac gctggagttt aacaaacagc aatactcttc gcgctcctga aaagcaggtc 60
tggaacgtct cctgttggtgct gaaacgcctc gcagccgccg ctgtccgtgg tatctacgac 120
ccccctgctc caatttcccc tggggctctc cctccgcgcc cctgttcccc gcctcccttt 180
aacatctgga ttattttttg caatagcgct ttctggtttt gtaagtcca atttgaaaca 240
tttttgcccc cataactcgt ggactacaaa gcacaaggac ctgaaaaatg tacagcttca 300
atactcttcg actctacctt tgggagacca ttgtattctt cagccttgct gcttctaagg 360
aggctgaagc tgctcgctcc gcaccaagc ctatgtcacc ctcgatttc ctggataagc 420
taatggggag aacctccgga tatgatgcca ggatcaggcc caattttaaa ggtccccag 480
tgaacgtgag ctgcaacatt ttcacaaaca gctttggttc cattgctgag acaaccatgg 540
actatagggg caacatcttc ctgcggcagc aatggaacga ccccgccctg gcctataatg 600
aataccctga cgactctctg gacctggacc catccatgct ggactccatc tggaaacctg 660
acctgttctt tgccaacgag aagggggccc acttccatga gatcaccaca gacaacaaat 720
tgctaaggat ctcccggaat gggaatgtcc tctacagcat cagaatcacc ctgacactgg 780
cctgccccat ggacttgaag aatttcccc tggatgtcca gacatgtatc atgcaactgg 840
aaagcttttg atatacgatg aatgacctca tctttgagtgc gcaggaacag ggagccgtgc 900
aggtagcaga tggactaact ctgccccagt ttatcttgaa ggaagagaag gacttgagat 960
actgcaccaa gcactacaac acaggtaaat tcacctgcat tgaggcccgg ttccacctgg 1020
agcggcagat gggttactac ctgattcaga tgtatatctc cagcctgctc attgtcatcc 1080
tctcatggat ctcttctggt atcaacatgg atgtctgcacc tgctcgtgtg ggcctaggca 1140
tcaccactgt gctcaccatg accaccaga gctccggtc tcgagcatct ctgcccagg 1200
tgtcctatgt gaaagccatt gacatttgga tggcagtttg cctgctcttt gtgttctcag 1260
ccctattaga atatgctgcc gttaactttg tgtctcggca acataaggag ctgctccgat 1320
tcaggaggaa gcggagacat cacaagagcc ccatgttgaa tctattccag gaggatgaag 1380
ctggagaagg ccgttttaac ttctctgcct atgggatggg cccagcctgt ctacaggcca 1440
aggatggcat ctcatgcaag ggccgcaaca acagtaacac caccaacccc cctcctgcac 1500

```

catctaagtc cccagaggag atgcgaaaac tcttcatcca gagggccaag aagatcgaca 1560
 aaatatcccg cattggcttc cccatggcct tcctcatttt caacatgttc tactggatca 1620
 tctacaagat tgtccgtaga gaggacgtcc acaaccagtg aagggtctga aaggttgggg 1680
 gaggctggga gaggggaacg tggaatagc acaggaatct gagagactaa ggaagagaag 1740
 gggaacggag ggagggggca cacttacaca actctctctg caatatgtgc aatagcaaaa 1800
 tgcagtgatg catgaatttt aaaaaaaaaa aaaaa 1835

<210> 2

<211> 457

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

Tyr Cys Thr Lys His Tyr Asn Thr Gly Lys Phe Thr Cys Ile Glu Ala			
225	230	235	240
Arg Phe His Leu Glu Arg Gln Met Gly Tyr Tyr Leu Ile Gln Met Tyr			
	245	250	255
Ile Pro Ser Leu Leu Ile Val Ile Leu Ser Trp Ile Ser Phe Trp Ile			
	260	265	270
Asn Met Asp Ala Ala Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val			
	275	280	285
Leu Thr Met Thr Thr Gln Ser Ser Gly Ser Arg Ala Ser Leu Pro Lys			
	290	295	300
Val Ser Tyr Val Lys Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys Leu Leu			
305	310	315	320
Phe Val Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe Val Ser			
	325	330	335
Arg Gln His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg His His			
	340	345	350
Lys Ser Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly			
	355	360	365
Arg Phe Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala			
	370	375	380
Lys Asp Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn			
385	390	395	400
Pro Pro Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe			
	405	410	415
Ile Gln Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro			
	420	425	430
Met Ala Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile			
	435	440	445
Val Arg Arg Glu Asp Val His Asn Gln			
	450	455	

<210> 3

<211> 3356

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3

```

tccttaaagg cgcgcgagcc gagcggcgag gtgcctctgt ggccgcaggc gcaggcccgg 60
gcgacagccg agacgtggag cgcgccggct cgctgcagct ccgggactca acatgcgctg 120
ctcgccggga ggctctggc tggcgctggc cgctcgctc ctgcacgtgt ccctgcaagg 180
cgagttccag aggaagcttt acaaggagct ggtcaagaac tacaatccct tggagaggcc 240

```

cgtggccaat gactcgcaac cactcaccgt ctacttctcc ctgagcctcc tgcagatcat 300
 ggacgtggat gagaagaacc aagttttaac caccaacatt tggctgcaaa tgtcttggac 360
 agatcactat ttacagtgga atgtgtcaga atatccagggt gtgaagactg ttcgtttccc 420
 agatggccag atttggaac cagacattct tctctataac agtgctgatg agcgctttga 480
 cgccacattc cacactaacg tgttggtgaa ttcttctggg cattgccagt acctgcctcc 540
 aggcatattc aagagttcct gctacatcga tgtacgtggg tttccctttg atgtgcagca 600
 ctgcaaactg aagtttgggt cctggcttta cggaggtggg tccttggatc tgcagatgca 660
 ggaggcagat atcagtggct atatcccaa tggagaatgg gacctagtgg gaatccccgg 720
 caagaggagt gaaaggttct atgagtgtg caaagagccc taccctgatg tcaccttcac 780
 agtgaccatg cgccgcagga cgcttacta tggcctcaac ctgctgatcc cctgtgtgct 840
 catctccgcc ctgcacctgc tgggtttcct gcttctgca gattccgggg agaagatttc 900
 cctggggata acagtcttac tctctcttac cgtcttcatg ctgctcgtgg ctgagatcat 960
 gcccgcaaca tccgattcgg taccattgat agcccagta ttcgccagca ccatgatcat 1020
 cgtgggcctc tcggtgggtg tgacagtgat cgtgctgcag taccaccacc acgacccga 1080
 cgggggcaag atgcccgaag ggaccagagt catccttctg aactggtgcg cgtggttctc 1140
 gcgaatgaag aggcccgagg aggacaaggt gcgcccggcc tgccagcaca agcagcggcg 1200
 ctgcagcctg gccagtgtgg agatgagcgc cgtggcgccg ccgcccgcga gcaacgggaa 1260
 cctgctgtac atcggtctcc gcggcctgga cggcgtgcac tgtgtcccga ccccgactc 1320
 tggggtagtg tgtggccgca tggcctgctc cccacgcac gatgagcacc tcctgcacgg 1380
 cgggcaaccc cccgaggggg acccgactt ggccaagatc ctggaggagg tccgctacat 1440
 tgccaaccgc ttccgtgcc aggacgaaag cgaggcggtc tgcagcgagt ggaagtctgc 1500
 cgctgtgtg gtggaccgcc tgtgcctcat ggcttctcg gtcttcacca tcatctgcac 1560
 catcgcatc ctgatgtcgg ctcccaactt cgtggaggcc gtgtccaaag actttgcgta 1620
 accacgcctg gttctgtaca tgtggaaaac tcacagatgg gcaaggcctt tggcttggcg 1680
 agatttgggg gtgctaattc aggacagcat tacacgccac aactccagtg ttccttctg 1740
 gctgtcagtc gtgttgctta cggtttctt gttactttag gtagtagaat ctgagcactt 1800
 tgtttcatat tctcagatgg gctgatagat atccttggca catccgtacc atcggtcagc 1860
 aggccactg agtagtcatt ttgcccatta gccactgcc tggaaagccc ttcggagagc 1920
 tccccatggc tcctcaccac cgagacagtt ggttttgcgt gtctgcatga aggtctacct 1980
 gaaaattcaa catttgcttt ttgcttgtgt acaaacccag attgaagcta aaataaacca 2040
 gactactaa atcctttcca ataattgact ggtggaagga aaacaaaaa caaaaactaa 2100
 aaacctctta gcttttctgc aattcaactt tttattttta tttttatttc tatcaaagac 2160
 ggtagagaga aacagcttga tgctgtttct acattaaaaa aaaaaaaaaa agacagactg 2220
 ttggtcttac taaggatgtt tttaccagcc tgctgactt ctgcaaacct acctgtcaa 2280
 ggagatcaaa gggacgcagg tttctgttta ttctgaacaa gggccaggcc ccgcggagtg 2340
 tctttgggtg atcccagata actcctaggt gctgctctca gacactgagg agttgagcaa 2400
 atctgttcta ttctgcagaa cccacaggac aaataagagt tctactagaa ttaacagccc 2460
 aaaagaatag ctacagctaa gtgaagccac ttacgtgggc tttaaaaaaa taatgtgtta 2520
 gctgattcac atgcactgga gttaattagt cttagaaatg tgtgcatcca tacaatgca 2580

caacataaag tgaacatatt cctaggccct ttctgcctgt gtcagggcca ggaagtagag 2640
 gctgggaact cttctgggtcc ccagtatggc aggcgccagg gaggggatgg tgtggcccat 2700
 cccttctctg gatacctggc cagtggcagg cagcaggag gagctggccg accctcagt 2760
 actgacaagc cagcaattct gagttctggc ctttgggagt ctgcctgctc caagccagtc 2820
 caccagct gcagcccaa aagctggctc aaagtccttg ggtggattca ctggagatgg 2880
 gcaacttaaa acaagagaaa ctttaatttt taaacctaag tgatgataca gctcttcct 2940
 tagattatcg cccaggctgg agtgcagtgg catgatctca gctcactgca agctccacct 3000
 cctgggttca tgccattctc ctgcctcagc ctcccccg gtaactggga atacaggcgc 3060
 ccgccaccat gcctggctaa tttttgtat ttttagtaga gatagggtt catcatgtta 3120
 gccaggatgg tctcattctt attctttaat gagatcagag ggtaattcac caagaaagac 3180
 ctctcctgtt ccattgtgtc atccaacaac tgctcagagc tcaaaattat agaaggcttc 3240
 tgagccccta gagattttta atttgettct aatccctgag gtgggaacat catgagggaa 3300
 gatttgattt tcagagttaa ataaattgta tgtgcttttc cagccaaaaa aaaaaa 3356

<210> 4

<211> 502

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

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

			165				170				175				
Ser	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Gln	Glu	Ala	Asp	Ile	Ser	Gly	Tyr	Ile	Pro
			180				185				190				
Asn	Gly	Glu	Trp	Asp	Leu	Val	Gly	Ile	Pro	Gly	Lys	Arg	Ser	Glu	Arg
			195				200				205				
Phe	Tyr	Glu	Cys	Cys	Lys	Glu	Pro	Tyr	Pro	Asp	Val	Thr	Phe	Thr	Val
			210				215				220				
Thr	Met	Arg	Arg	Arg	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Asn	Leu	Leu	Ile	Pro
225				230				235				240			
Cys	Val	Leu	Ile	Ser	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Leu	Pro	Ala
			245				250				255				
Asp	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	Ser	Leu	Gly	Ile	Thr	Val	Leu	Leu	Ser	Leu
			260				265				270				
Thr	Val	Phe	Met	Leu	Leu	Val	Ala	Glu	Ile	Met	Pro	Ala	Thr	Ser	Asp
			275				280				285				
Ser	Val	Pro	Leu	Ile	Ala	Gln	Tyr	Phe	Ala	Ser	Thr	Met	Ile	Ile	Val
			290				295				300				
Gly	Leu	Ser	Val	Val	Val	Thr	Val	Ile	Val	Leu	Gln	Tyr	His	His	His
305				310				315				320			
Asp	Pro	Asp	Gly	Gly	Lys	Met	Pro	Lys	Trp	Thr	Arg	Val	Ile	Leu	Leu
			325				330				335				
Asn	Trp	Cys	Ala	Trp	Phe	Leu	Arg	Met	Lys	Arg	Pro	Gly	Glu	Asp	Lys
			340				345				350				
Val	Arg	Pro	Ala	Cys	Gln	His	Lys	Gln	Arg	Arg	Cys	Ser	Leu	Ala	Ser
			355				360				365				
Val	Glu	Met	Ser	Ala	Val	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu
			370				375				380				
Leu	Tyr	Ile	Gly	Phe	Arg	Gly	Leu	Asp	Gly	Val	His	Cys	Val	Pro	Thr
385				390				395				400			
Pro	Asp	Ser	Gly	Val	Val	Cys	Gly	Arg	Met	Ala	Cys	Ser	Pro	Thr	His
			405				410				415				
Asp	Glu	His	Leu	Leu	His	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Glu	Gly	Asp	Pro	Asp
			420				425				430				
Leu	Ala	Lys	Ile	Leu	Glu	Glu	Val	Arg	Tyr	Ile	Ala	Asn	Arg	Phe	Arg
			435				440				445				
Cys	Gln	Asp	Glu	Ser	Glu	Ala	Val	Cys	Ser	Glu	Trp	Lys	Phe	Ala	Ala
			450				455				460				
Cys	Val	Val	Asp	Arg	Leu	Cys	Leu	Met	Ala	Phe	Ser	Val	Phe	Thr	Ile
465				470				475				480			

Ile Cys Thr Ile Gly Ile Leu Met Ser Ala Pro Asn Phe Val Glu Ala
 485 490 495
 Val Ser Lys Asp Phe Ala
 500

<210> 5

<211> 2343

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

```

ctctcagctg tccccctccc tttcctcccg cctgaaacat gatccagctg aaggactgat 60
tgcaggaaaa cttggcagct ccccaacctt ggtggcccag ggagtgtgag gctgcagcct 120
cagaaggtgt gagcagtggc cacgagaggc aggctggctg ggacatgagg ttggcagagg 180
gcaggcaagc tggcccttgg tgggcctcgt cctgagcact cggaggcact cctatgcttg 240
gaaagctcgc tatgctgctg tgggtccagc aggcgctgct cgccttgctc ctccccacac 300
tcctggcaca gggagaagcc aggaggagcc gaaacaccac caggcccgtc ctgctgaggc 360
tgtcggatta ccttttgacc aactacagga aggggtgtgcg ccccgtgagg gactggagga 420
agccaaccac cgtatccatt gacgtcattg tctatgccat cctcaacgtg gatgagaaga 480
atcagggtgct gaccacctac atctggtacc ggcagtactg gactgatgag tttctccagt 540
ggaaccttga ggactttgac aacatcacca agttgtccat ccccacggac agcatctggg 600
tcccggacat tctcatcaat gagttcgtgg atgtggggaa gtctccaaat atcccgtacg 660
tgtatatctg gcatcaaggc gaagttcaga actacaagcc ctttcaggtg gtgactgcct 720
gtagcctcga catctacaac ttccccttcg atgtccagaa ctgctcgtg accttcacca 780
gttggctgca caccatccag gacatcaaca tctctttgtg gcgcttgcca gaaaaggtga 840
aatccgacag gagtgtcttc atgaaccagg gagagtggga gttgctgggg gtgctgcctt 900
actttcggga gttcagcatg gaaagcagta actactatgc agaaatgaag ttctatgtgg 960
tcatccgccg gcggcccctc ttctatgtgg tcagcctgct actgcccagc atcttcctca 1020
tggtcatgga catcgtgggc ttctacctgc ccccaacag tggcgagagg gtctctttca 1080
agattacact cctcctgggc tactcgggtc tcctgatcat cgtttctgac acgctgccgg 1140
ccactgccat cggcactcct ctcatgtgta aggccctcc tggcagcaga gctcagtctg 1200
gtgagaaaacc cgtcccctcc cacctcctgc atgtgtctct tgcccttgcc ctgggctgca 1260
cagggtgtcta ctttgtgggt tgcattggctc tgctgggtgat aagtttggcc gagaccatct 1320
tcattgtgct gctgggtgcac aagcaagacc tgcagcagcc cgtgcctgct tggctgcgtc 1380
acctggttct ggagagaatc gcctggttac tttgcctgag ggagcagtca acttcccaga 1440
ggccccccagc cacctcccaa gccaccaaga ctgatgactg ctgagccatg ggaaaccact 1500
gcagccacat gggaggagccc caggacttcg agaagagccc gagggacaga tgtagccctc 1560
ccccaccacc tcgggaggcc tcgctggcgg tgtgtgggct gctgcaggag ctgtcctcca 1620
tccggcaatt cctggaaaag cgggatgaga tccgagaggt ggcccagac tggctgcgcg 1680
tgggctccgt gctggacaag ctgctattcc acatttacct gctagcgggt ctggcctaca 1740
gcatcaccct ggttatgctc tgggtccatct ggcagtacgc ttgagtgggt acagcccagt 1800

```

ggaggagggg gtacagtcct ggtaggtgg ggacagagga tttctgctta ggcccctcag 1860
 gacccaggga atgccaggga cattttcaag acacagacaa agtcccgtgc cctgtttcca 1920
 atgccaattc atctcagcaa tcacaagcca aggtctgaac cttccacca aaaactgggt 1980
 gttcaaggcc cttacaccct tgtcccaccc ccagcagctc accatggctt taaaacatgc 2040
 tgtcttagat caggagaaac tcgggcactc cctaagtcca ctctagttgt ggacttttcc 2100
 ccattgaccc tcacctgaat aagggaactt ggaattctgc ttctctttca caactttgct 2160
 tttaggttga aggcaaaaacc aactctctac tacacaggcc tgataactct gtacgaggct 2220
 tctctaacc ctagtgtctt tttttcttc acctacttg tggcagcttc cctgaacact 2280
 catcccccat cagatgatgg gagggggaag aataaaatgc agtgaaaccc taaaaaaaaa 2340
 aaa 2343

<210> 6

<211> 516

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

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

Ile Ser Leu Trp Arg Leu Pro Glu Lys Val Lys Ser Asp Arg Ser Val		
195	200	205
Phe Met Asn Gln Gly Glu Trp Glu Leu Leu Gly Val Leu Pro Tyr Phe		
210	215	220
Arg Glu Phe Ser Met Glu Ser Ser Asn Tyr Tyr Ala Glu Met Lys Phe		
225	230	235 240
Tyr Val Val Ile Arg Arg Arg Pro Leu Phe Tyr Val Val Ser Leu Leu		
	245	250 255
Leu Pro Ser Ile Phe Leu Met Val Met Asp Ile Val Gly Phe Tyr Leu		
	260	265 270
Pro Pro Asn Ser Gly Glu Arg Val Ser Phe Lys Ile Thr Leu Leu Leu		
	275	280 285
Gly Tyr Ser Val Phe Leu Ile Ile Val Ser Asp Thr Leu Pro Ala Thr		
	290	295 300
Ala Ile Gly Thr Pro Leu Ile Gly Lys Ala Pro Pro Gly Ser Arg Ala		
305	310	315 320
Gln Ser Gly Glu Lys Pro Ala Pro Ser His Leu Leu His Val Ser Leu		
	325	330 335
Ala Ser Ala Leu Gly Cys Thr Gly Val Tyr Phe Val Val Cys Met Ala		
	340	345 350
Leu Leu Val Ile Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val Arg Leu Val		
	355	360 365
His Lys Gln Asp Leu Gln Gln Pro Val Pro Ala Trp Leu Arg His Leu		
	370	375 380
Val Leu Glu Arg Ile Ala Trp Leu Leu Cys Leu Arg Glu Gln Ser Thr		
385	390	395 400
Ser Gln Arg Pro Pro Ala Thr Ser Gln Ala Thr Lys Thr Asp Asp Cys		
	405	410 415
Ser Ala Met Gly Asn His Cys Ser His Met Gly Gly Pro Gln Asp Phe		
	420	425 430
Glu Lys Ser Pro Arg Asp Arg Cys Ser Pro Pro Pro Pro Pro Arg Glu		
	435	440 445
Ala Ser Leu Ala Val Cys Gly Leu Leu Gln Glu Leu Ser Ser Ile Arg		
	450	455 460
Gln Phe Leu Glu Lys Arg Asp Glu Ile Arg Glu Val Ala Arg Asp Trp		
465	470	475 480
Leu Arg Val Gly Ser Val Leu Asp Lys Leu Leu Phe His Ile Tyr Leu		
	485	490 495
Leu Ala Val Leu Ala Tyr Ser Ile Thr Leu Val Met Leu Trp Ser Ile		

500	505	510
Trp Gln Tyr Ala		
515		
<210> 7		
<211> 5723		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 7		
gctccggggcc agcgcggcgg cggcggcggc ggcggcagca gcaggagcag ccccggtgc 60		
gggtcgcgac ggcggcgggg cgccccctcc cccgtgccgg ggcgcgggcg agggatgtgg 120		
ggccttgccg gaggaagget tttcggcatc ttctcgcccc cggtgctggt ggctgtggtg 180		
tgctgcgccc agagtgtgaa cgatccccgg aacatgtcct ttgtgaagga gacggtggac 240		
aagctgttga aaggctacga cattcgcta agaccgact tcgggggtcc cccggtctgc 300		
gtggggatga acatcgacat cgccagcatc gacatggttt ccgaagtcaa catggattat 360		
accttaacca tgtattttca acaatattgg agagataaaa ggctcgcta ttctgggac 420		
cctctcaacc tcacgcttga caatcgagt gctgaccagc tatgggtgcc cgacacatat 480		
ttcttaaagt acaaaaagtc atttgtgcat ggagtgcag tgaaaaaccg catgatccgt 540		
cttcaccctg atgggacagt gctgtatggg ctcagaatca ccacgacagc agcatgcatg 600		
atggacctca ggagataccc cctggacgag cagaactgca ctctggaaat tgaaagctat 660		
ggctacacca cggatgacat tgagttttac tggcgaggcg gggacaaggc tgttaccgga 720		
gtggaaagga ttgagctccc gcagttctcc atcgtggagc accgtctggt ctcgaggaat 780		
gttgtcttcg ccacagggtgc ctatcctcga ctgtcactga gctttcggtt gaagaggaa 840		
attggatact tcattcttca gacttatatg ccctctatac tgataacgat tctgtcgtgg 900		
gtgtccttct ggatcaatta tgatgcatct gctgctagag ttgccctcgg gatcacaact 960		
gtgctgacaa tgacaacccat caacaccac cttcgggaga ccttgcccaa aatcccctat 1020		
gtcaaagcca ttgacatgta cttatgggc tgcttcgtct ttgtgttcct ggcccttctg 1080		
gagtatgcct ttgtcaacta cttttcttt ggaagaggcc ctcaaaggca gaagaagctt 1140		
gcagaaaaga cagccaaggc aaagaatgac cgttcaaaga gcgaaagcaa ccgggtggat 1200		
gctcatggaa atattctgtt gacatcgctg gaagttcaca atgaaatgaa tgaggtctca 1260		
ggcggcattg gcgataccag gaattcagca atatccttg acaactcagg aatccagtac 1320		
aggaaacaga gcatgcctcg agaaggcat gggcgattcc tgggggacag aagcctcccg 1380		
cacaagaaga cccatctacg gaggaggtct tcacagctca aaattaaaat acctgatcta 1440		
accgatgtga atgcataga cagatgggtc aggatcgtgt ttccattcac tttttctctt 1500		
ttcaacttag ttactggct gtactatgtt aactgagtga ctgtacttga tttttcaaag 1560		
acttcattta aactgagtg aaatattact ctgcctgtca agtttttata cctgtacaca 1620		
cacagacaca caagcagaca cacacatata tacatacgca attgtatata tatgtgaact 1680		
ttctcagcat atatataaaa tacacgtgta tatgaggatg tatgtgtata tgtttataca 1740		
cacaggagtc agtgcccatg tgtatggaag acaatacac atacatatat acattttgca 1800		
gctatggaca atttaccaca ggatgcata taaagaaagt catagttttt ttctttttta 1860		

```

attgaaaggg acaagtatca tctaaatatt atgccttgag aatgagggcg tgaacacaa 1920
tatcatcccc aaatgtgtct tgtattatca taagttagat gttttagttt aaaaatcaga 1980
aagacattct tagttaatct ttgaaaactc atacagtggg attgctagtt taaaatgagt 2040
cacttacttc atatcctctc gttcagttta gtaagcaaag gcttcttggc ttctctgggtg 2100
atgggggttg ttttcatcgg gcatacgttt tctgcaatgg tttagtggct ggggtgagcc 2160
actggcagtg tgcttacctg ttgtctgaaa catagataga tcccacgttg atgtctgaac 2220
gaccgtcttt tgaaaaactca tcgggagtga atggcatctc gttgtaagta ctctaataa 2280
cagtgtgtag tttgtttctg ttgttcactt ggagtggatc cagcttcact gtcagtgtcg 2340
aacacagtga cacgtttggc cagtgcatt tcaatcactg aaaatgtgct ctacatctcg 2400
tatggatttc taggcctgat atccaacaga aagcatagac gtctcagggtt attcgttact 2460
ctaaggtaaa accatctagg atgattttcc cccttgacgt tatgttatca ttcttataac 2520
attgtatgtt aatagaaaaat atatttgcatt aatatgcata tatatgtata tttaccaaga 2580
ttttgtttct tacgcttgct atcatggcag catgcgatgt catattttcc tttatgtgat 2640
gtaactactt tctgttatct agaaattaag attgaagcta aaacacttct actgttcaat 2700
ttcagaaact aagaatcatc ctcatgcctt tatttctgta tctgacatat ttcataagca 2760
catccaacta ctcttagact gactaggatt ctgcaggaac atgaccgta cacaccacgc 2820
gtcacccaac gacctatgac cgttctctga ggcaaaggag ggcaacctga cagcaaacac 2880
agtcactgtt ggttccttct gatccacagc ctcatcagta tttggacttt ttaaagctcg 2940
tagaaacaag acaaggtgca ccggtttcat agacgcaacc ttaacttact atttagatga 3000
gatctttcta aagaaaaaaaa aaagagatga tatatttttt gtaaacaata tttctatcac 3060
aggcatccat aaactgaaat gactacagtt gtgcaaacag gtgtcacagt gaagttgagc 3120
atttggagaa aaaaataaaa agcaaaattt gcaggaagaa ctgctaaatt aatactttat 3180
cccaaaatgc cacgtatgcc tcaccctctc tgttctatcc aaaaccaagg accagagtgc 3240
tccaatggta ggccccagtt gtctcgatgt aggtagaggc accaccctcc ccgaggatgc 3300
gtgtgggtgtg gactatcccc atgagctgac cactacttga tttttctttg gtggccgtaa 3360
caacctttaa tttgtgggca tctgcaacag ttcaaaacct accatcagat aaaacataat 3420
ccacaaaatc tcacgctaga ggcaattacc tactttttaga cccttttccc tctttcattc 3480
ctatcttttt cctcctaata gctgctctct ggttttattt tcatctggag actagccagg 3540
gatttctttg gctttggctt ttctctgacc attttttcca tgggtaacaa tgggggatcc 3600
taaaagttaa acagattggg aaaaaccttg ttaagtggcc ttatcattat tatcatgtta 3660
aagaaaaaaaa atacatttgc aaagacctta tccctttcaa tacttcaggt atctttttct 3720
gtatccagta attaaagggt tgaggtccac atgcagaaga gggaccccaa aatgtaaagt 3780
gatgtggaca aaaacagtca atggtctatt taagtgtata atttatacta ttcagaactg 3840
tgacattaat tctttctggg agaaaagtga tttaaaactt ttttgatgca tagttgaggt 3900
acccaaatat caaaggcaga gaccccatgg ggctccaaag agctgcagtc tcttcccaa 3960
ggttttctgg atataaattt gcatgggtata gtcataatag cttttgagct ttttatatgc 4020
atttggcacc aagactggga tccacaactt tgtagacact gcgatgaagt taacatatta 4080
gctatactat aaatagtgtt tgtaactaca cacacacaca cacacacaca cacaaatata 4140
tacatatatt ctgtaaaaaa aaaaaaaaaa tttttaagat ccttgggtat gtgtttgctt 4200

```

tactccattt cagaagaaaa ttacttttct tctaacaaaa ttattttata gcttctccat 4260
 ttttaaaact tgtgagagca ttgagaagag aactctgact gtgttaacag aagagagttg 4320
 aattggagtc tctgttgtgt taaaatgacc tctcgttact ccacagtagt tatttgagcc 4380
 agtgactgag tcgcgttgag gaattctgaa cccggacctc tgacgttggt gggaggtggc 4440
 tgttaccac acccagacct cttgagtaag gacagaaacg ttatcattgg ggatataatg 4500
 agattttcttt cttacaatt gaaagtaata aagagttaat tttctcagta gtcctgtctt 4560
 tccaaaatgc gccacagggg ctcaagatct acagaagaat cttgttatga cagtttgta 4620
 ttacccatat tcagatatcc ttgagataat ggaagagccc tgctacataa ctccctacag 4680
 agaaaactg atagacttga gtagtcctta aaacaagtgt tattcctgtt caccaacccc 4740
 gggactgtgg aggggtttca ctgtctatac catgcgacat ccatttcccc tgaatctcaa 4800
 acgaactaga aagtatgtca tgataatatt tccattagat ttggaagcta cctgtacatc 4860
 tgcaatattg tgtttttaac gccagcacc cagaacttga catgttcagt cactccctga 4920
 aaggcacttc tctctgtcc aaacacagcg ttgacatttt tactgaggag atcatctcaa 4980
 aggtgatgcc aaacgagtct ggggctggtt ttaaggggac aggcacattg cagttgtagg 5040
 tgttcatttt cagcatctag tagataatcc attggtgttt gtcccacat tgggtgtattc 5100
 taacaagaat gtgtccaact ttgaatctcc tggcttgaaa gtataaacca tcacttaatt 5160
 cttattttta ctctccacct gaaaaccagt tcatatttct ggccatttta tgtaagcaaa 5220
 actgaacaat tggtgaaaca ttttgttact cttggaattg actctggctg tcagtgtgag 5280
 ccattagagt aacatcgaat cttggggcaa agaactgccc aggtgaatta aatttttcca 5340
 ggacactagc tagtgtgcct tggattgatt acctcttcta ctgcattgaa aggcgccatg 5400
 ttttctgaa atactaaatt cccaacacct gggtaaacia tgacctcca gagagtggct 5460
 cccgtatgcc tctccctagg accaaccca tgaacatgtt ttgtcacgtt tgtctcatgt 5520
 ttctacttca caagtcagt agtgtgttta aggtaagtac aggattattc tagtaggaat 5580
 aggcgattgc tgcataatc aattctcatg ttgatttcat tttattgtaa agataaattt 5640
 aaaccagtt ttgcttaagc acattgatgt aattttttgg tattatttga catgaaaaaa 5700
 cagcaaaatt gagtgataga tac 5723

<210> 8

<211> 473

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Met Trp Gly Leu Ala Gly Gly Arg Leu Phe Gly Ile Phe Ser Ala Pro

1 5 10 15

Val Leu Val Ala Val Val Cys Cys Ala Gln Ser Val Asn Asp Pro Gly

20 25 30

Asn Met Ser Phe Val Lys Glu Thr Val Asp Lys Leu Leu Lys Gly Tyr

35 40 45

Asp Ile Arg Leu Arg Pro Asp Phe Gly Gly Pro Pro Val Cys Val Gly

50 55 60

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

370	375	380
Ile Gly Asp Thr Arg Asn Ser Ala Ile Ser Phe Asp Asn Ser Gly Ile		
385	390	395
Gln Tyr Arg Lys Gln Ser Met Pro Arg Glu Gly His Gly Arg Phe Leu		
405	410	415
Gly Asp Arg Ser Leu Pro His Lys Lys Thr His Leu Arg Arg Arg Ser		
420	425	430
Ser Gln Leu Lys Ile Lys Ile Pro Asp Leu Thr Asp Val Asn Ala Ile		
435	440	445
Asp Arg Trp Ser Arg Ile Val Phe Pro Phe Thr Phe Ser Leu Phe Asn		
450	455	460
Leu Val Tyr Trp Leu Tyr Tyr Val Asn		

465

470

<210> 9

<211> 3174

<212> DNA

<213> 智人

<400> 9

```

taataatggc cgtaagctta aaatagatcc agggaggagc tcattaacgt gaacatagaa 60
agcagttccg cacctctggc cttactcctc ttggaaattg ctttggtcca tttttacttc 120
cttttattcg acgcaccaga aaataagact tttaccaaca tttttactgc atttgacgat 180
gaactaatTT agaccggcta aaataattgt tccactggga cacaggaatt caacctcagt 240
tcagaaaatc cctgacatct gacgtaggag gatttatagg tttagtggaa attgctttct 300
cctgctctcc agattgcatc ctgtggggtg attttttttt tgcatgagta aacatccttc 360
taataatgaa cagaccaata atgtcttaag agagaaaaag aacaatcttt tcctttttgc 420
tgtttctgga gagagctgtt tgaatttgga aacctatgtt ggctgtccca aatatgagat 480
ttggcatctt tcttttgtgg tggggatggg ttttggccac tgaaagcaga atgcactggc 540
ccggaagaga agtccacgag atgtctaaga aaggcaggcc ccaaagacaa agacgagaag 600
tacatgaaga tgcccacaag caagtcagcc caattctgag acgaagtcct gacatcacca 660
aatcgctctt gacaaaagta gaacagcttc tgaggataga tgaccatgat ttcagcatga 720
ggcctggctt tggaggccct gccattcctg ttgggtgtgga tgtgcaggtg gagagtttgg 780
atagcatctc agaggttgac atggacttta cgatgacctt ctacctgagg cactactgga 840
aggacgagag gctgtctttt ccaagcacca acaacctcag catgacgttt gacggccggc 900
tggtcaagaa gatctgggtc cctgacatgt ttttcgtgca ctccaaacgc tccttcatcc 960
acgacaccac cacagacaac gtcatgttgc ggggtccagcc tgatgggaaa gtgctctata 1020
gtctcagggt tacagtaact gcaatgtgca acatggactt cagccgattt cccttgga 1080
caciaaacgtg ctctcttgaa attgaaagct atgcctatac agaagatgac ctcatgctgt 1140
actggaaaaa gggcaatgac tccttaaaga cagatgaacg gatctcactc tcccagttcc 1200
tcattcagga attccacacc accaccaaac tggctttcta cagcagcaca ggctggtaca 1260

```

accgtctcta cattaatttc acgttgcgtc gccacatctt cttcttcttg ctccaaactt 1320
 atttccccgc taccctgatg gtcattgctgt cctgggtgtc cttctggatc gaccgcagag 1380
 ccgtgcctgc cagagtcccc ttaggtatca caacggtgct gaccatgtcc accatcatca 1440
 cgggcgtgaa tgcctccatg ccgcgcgtct cctacatcaa ggccgtggac atctacctct 1500
 gggtcagctt tgtgttcgtg ttcctctcgg tgctggagta tgcggccgtc aactacctga 1560
 ccactgtgca ggagaggaag gaacagaagc tgcggggagaa gcttccctgc accagcggat 1620
 tacctccgcc ccgcactgcg atgctggacg gcaactacag tgatggggag gtgaatgacc 1680
 tggacaacta catgccagag aatggagaga agcccgacag gatgatggtg cagctgacct 1740
 tggcctcaga gaggagctcc ccacagagga aaagtcagag aagcagctat gtgagcatga 1800
 gaatcgacac ccacgccatt gataaatact ccaggatcat ctttccagca gcatacat 1860
 tattcaattt aatatactgg tctatcttct cctagatgct tgtaattcta caaatttcac 1920
 atttccatgg catgcactac agaaataact gtataatgaa aaagtattta aggatatggt 1980
 taacacacac tcccaggacc caccatgtt ttcactatcc cttctgcagc tttccaaagc 2040
 tacattgacg agacacttac tggtttaatt tgcacttatt aaccatctat tgaatacaca 2100
 gcattatatt aggtgctgca ggaaatacga cactgtagcg actgatgtta gttgttacct 2160
 agatcccctg gaaaagcaca ctaccagtgt tgtgggcaca tttagtcca cccgttagac 2220
 ccttgatgct attcacatga ataatttatt ttcctcaagt gtcattacat tgttcaggct 2280
 acgtgaactt ggaagcacct acaggccatt tgcatgaaat tcacatgcac ctaaatactc 2340
 actttgacag aaactcatgc ttcagtttat aacctattac ctattttgta tgcgactcca 2400
 cctccgcatg tttattttta taaaaggcaa tgataacatt cacattattt ttctttatat 2460
 gctgtgggtc acaggcttta ccccttcaca agaaaagctc tttagattgg cgcaattgct 2520
 tctgattttg gtgaaatttt ccctggtagg gaaactttga agataagagt acacacatgc 2580
 attttgtctg ttgtgtcata gaggttaacta ggctagaaaa tttgtgttta aatgttcctt 2640
 attttatata atcaccactt catgtttctt cttcttggag catgtccttg ttcaaagaga 2700
 agtgccttct cagtgatgtg atatcttcac tgaggaactt gggtagagaa tgatttcttc 2760
 tgcataaaca cttcaaggaa atacataatt tgggactact tgtaactcat tagaatgaga 2820
 aatactcaca tggtttctta agagaaaaag aacatcgga agcaaaataa atgggaagat 2880
 atcactggac atctgcattt atactcgaat taccagcatt ttctatggac cagaaaactg 2940
 ccatcaccta gaccacacag cccagatacc aggagacgg atggcccaat ggcaactgat 3000
 gtcaggcat ggggtaaaag agagggttct aatctggtgt atcacttaaa aacagttatt 3060
 tatattatat atctgctata tagatcaacc tccacaaac ttacccaaac agcatttggt 3120
 ttatttgaaa ctactttta taaagtgaat tatatacaca aaaaaaaaaa aaaa 3174

<210> 10

<211> 479

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Met Leu Ala Val Pro Asn Met Arg Phe Gly Ile Phe Leu Leu Trp Trp

1

5

10

15

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

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

<210> 11

<211> 4620

<212> DNA

<213> 智人

<400> 11

```

atgccttatt ttacaagact cattttgttc ttgttttgct tgatggttct cgtggagagc 60
agaaaaccca agaggaagcg atggacaggg caggtggaaa tgcccaagcc aagtcactta 120
tataagaaga accttgatgt gaccaagatc cggaaggga agcctcagca gcttctcaga 180
gtggacgagc acgacttcag catgagaccc gccttcggag gccctgccat cccggtgggc 240
gtggacgtac aggtggagag cctggacagc atctccgagg tggacatgga cttcactatg 300
accctgtacc tgcggcatta ctggaaggat gagaggetag ctttctccag cgccagcaac 360
aagagcatga ccttcgatgg ccggctggtg aagaagatct gggtcctga tgtcttcttt 420
gttcactcca aaagatcggt cactcatgac accaccactg acaacatcat gctgagggtg 480
ttcccagatg gacacgtgct gtacagcatg aggattacgg tcaactgcat gtgcaacatg 540
gacttcagcc actttcccct ggactcccag acctgttctt tggagctgga gagctatgcc 600
tatacagatg aagatctaata gctgtactgg aagaatgggg atgaatccct aaaaacagat 660
gagaagatct ccttgtctca gtttctgatt cagaaatttc acacaacttc caggctggcc 720
ttctacagca gcaactggct gtacaaccgt ctgtacatta acttcacgtt gcgtcgccac 780
atcttcttct tcttgtctca aacatatttc cctgccactc tgatggtcat gctgtcctgg 840
gtgtccttct ggatcgaccg cagagctgtg cctgccagag tttcactggg tatcacgacg 900

```

gtgctgacca tgaccaccat catcacgggc gtgaatgcct ccatgccgcg cgtctcctac 960
 gtcaaggccg tggacatcta cctctgggtc agctttgtgt tcgtgttcct ctcggtgctg 1020
 gagtatgcgg ctgtcaacta cctgaccacc gtgcaggagc gcaaggaacg gaagctgcgg 1080
 gagaagttcc cgtgcatgtg tggaatgctt cattcaaaaa ccatgatgct ggatggaagc 1140
 tacagtgagt ctgaggccaa cagcctggct gggtagccca gaagccatat cctgacagaa 1200
 gaagaaaggc aagacaaaaat agtgggtccac ctgggcctga gtggtgaagc caacgctgcc 1260
 agaaaagaagg ggcttctgaa gggccagacg ggttttcgta tcttcagaa taccatgcc 1320
 attgacaaat actctagggt gatattccct gcctcctaca tatttttcaa cttaatttat 1380
 tggtcagtgt tttcctaggg gctccaaggc tgttcctaga agagggcata gacatcgagg 1440
 gggcctggcc agtcattgac agacggactt gttgaccaca cggccctcac caaacaatgc 1500
 agcagctact ggaccaccct gagcagcact catctctcag agaagcccag gaggcttcca 1560
 gctgccctga cccagacccc cgtggggctg ctccatgttc atgctgtctc gcgtcacact 1620
 tcacatctct ctgggacctt ctgttcttgt gtgtgaacta attcacaaga actccctcc 1680
 tataaacaag gattcaaatg cctcctagac attcttagac cctcagattg cctaggagtc 1740
 agttgtggag ggaaaaggaa aaactgaagt acaagcttag gggcattctg gataggagat 1800
 aggaaattaa gaacaaaaaa caccctgtaa acccattgaa cttgattaag tgcctaccta 1860
 gaagggaaaa gagctgagat cccagacagg aatgatttg gcctgtggga gtatggcaac 1920
 ccacaggatt ctgcaatatt agaggagatt attcatttat ccatccattc aaccattcat 1980
 taaatattga ggtcccactc tgtgccaggt acggtagaaa tgagaaaata gtctctttcc 2040
 ttagagatct tctctaagtt gtgctcattc tacatatggc atgatgtact tctgctcttt 2100
 cccctccttc aaccccgctt accccacaga cccattctgt ttgctgttgc ttttactctt 2160
 aggcatataa ggcagggtcc aggagaggcc aggtccagaa ctttcaacta tcctcctcca 2220
 gtgaagttac acagatagca ctaattttgc ccagcaatga catgtagcaa tgtgcatgga 2280
 gtattgccag ccagagaaac ttaccaggc tcaccacggt gtacagtttt ttattgggg 2340
 tcggctcatgg atttatagct gattgccac atggctgact ttagtctttt gccctccag 2400
 aggttaagct ggtacctga ggtccaggc acctatcata aatcacattg ttggcataga 2460
 ctatctggtg tggcccaagg cccagtaga caaagacct tctatctcac aggacattcc 2520
 aaggcatag aggttgcttc ctagtaaagg ttagtccttt actacacagc aactcttgct 2580
 aattccctat tgtaaatgtt aattgcggtg ttactattat atattcaggc aataaacatt 2640
 ttaaagtatc tctgcactag gtacattggg gtccaaatta agaataagag tagtcgaagc 2700
 tctcagagaa ggaactagta aaggaaatac cacacaaata tctataatat aagattaaga 2760
 gtgttttagtg cctcagtaat agttcagtgt gagatgggaa ttccaaggga ggaaaaacag 2820
 tcccaccagg gagacagacc tcatggagaa agcagccctg agatgccct tgaaggctcag 2880
 gattttaaga agaagaaatg gagcagaatg catcctagat ctgggctgtc tcatatggta 2940
 gccactagcc acatgtctat ttaaatttaa attagtaaaa attaaaaata ttagccaggt 3000
 gtgggtggtg gtgcctgggg ttctagctac tcaggaggct gaggcgggag gattgcttga 3060
 gcccaggaat tccaggctgc cgtgagctgt gatcaagcca ctgcagtcca gcctgagtga 3120
 cagagcgaga ccctatctct aaaataataa ttattattat ttaaattagt tgaagttaaa 3180
 taaaattgaa aactcagttc cttggttaca ccatccacac tcaagtgggc ttagtaagca 3240

cagttgctag tagctactgc actgggctgg gcagcctaaa gaccaggaag ctctaccage 3300
 caagagacca gcttgagcgg acgcatgggg agaatgggaa ggtttgccat tgcagagaac 3360
 agggtttgtg ggcaagtcac tcattttggc aggatcctag gctgtgataa gaggaggtga 3420
 gcgactagct ttttccacaa cactagggat caaggcaggt cccaccatg ccggtgctta 3480
 tgaggacagc ttccccacta tggagttgct ggaccaaga ctactagatt tcccagtctc 3540
 acagaccaat gaagaacaaa aatgcataaa tatgggtaat tgggtggtac agggcatctg 3600
 gacttgttta gaaacctttt tttcttttct gagacagagt ttcactcttg ttgctcaggc 3660
 tggagtgcaa tggcttgatc ttggctcacc acaacctctg cctcccgggt tcaagcaatt 3720
 ctctgcctc agccctggag tagctgggat tacaggcatg cgccaccatg cctggctaac 3780
 ttttgtattt tttagtagag atggggtttc tccatgttag tcagcctggg cttgaactcc 3840
 tgacctcagg tgatccgcct gcctcagcct cccaaagtgc tgtgattaca ggcgtgagcc 3900
 accacacccg gccagaaacc ttttatctat agagactctc ccaggccaca gtgctgctcg 3960
 aagaatgata attctattgt cattaaatat atcatattgc tttgcttgta agtcttattt 4020
 aattccaacc cttctctgct tctgactgca ttgttttcat gcattatggc tcatataaca 4080
 tagttgcctg ttcacaaatt aaaacaaata tttatttttg ctagcttcta tgttaaactg 4140
 gagttaattc tatagcagac atatttagaa tcataaacag tgttttatca tgcagggccca 4200
 tgatacaatg acaccattgt atttagcatt gccttattac agtatactag tctgacacta 4260
 cttgagaaaa gtaggaaatt taaagaggta aagtggagac aacattggta ggagtagaaa 4320
 acaggaacta aggaaatagt gagaacatgg gatgattcac cctggaggca ggaagacaga 4380
 gaagcaaaca caattgttat caggaatgca tgaatgatac tttacttcac tgaatctaag 4440
 acatgggtgaa atgtaagatg caccatattt ttatgtactg agaaaaata ctaacaatca 4500
 aattctggaa tgccaatgat tataatatga atcctgattt caccaatatg aaactgtgaa 4560
 aaaatgttaa tggtacaata aaagaaatgg gttttatata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4620

<210> 12

<211> 465

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

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

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

Glu	Glu	Arg	Gln	Asp	Lys	Ile	Val	Val	His	Leu	Gly	Leu	Ser	Gly	Glu	
				405					410					415		
Ala	Asn	Ala	Ala	Arg	Lys	Lys	Gly	Leu	Leu	Lys	Gly	Gln	Thr	Gly	Phe	
				420					425					430		
Arg	Ile	Phe	Gln	Asn	Thr	His	Ala	Ile	Asp	Lys	Tyr	Ser	Arg	Leu	Ile	
				435					440					445		
Phe	Pro	Ala	Ser	Tyr	Ile	Phe	Phe	Asn	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ser	Val	Phe	
				450					455					460		

Ser

465

<210> 13

<211> 1404

<212> DNA

<213> 智人

<400> 13

```

atggctcctgg ctttccagtt agtctccttc acctacatct ggatcatatt gaaaccaa 60
gtttgtgctg cttctaacat caagatgaca caccagcggg gctcctcttc aatgaaacaa 120
acctgcaaac aagaaactag aatgaagaaa gatgacagta ccaaagcgcg gcctcagaaa 180
tatgagcaac ttctccatat agaggacaac gatttcgcaa tgagacctgg atttggaggg 240
tctccagtgc cagtaggtat agatgtccat gttgaaagca ttgacagcat ttcagagact 300
aacatggact ttacaatgac tttttatctc aggcatctact ggaaagacga gaggtctctc 360
tttccatgca cagcaaacaa aagcatgaca tttgatcata gattgaccag aaagatctgg 420
gtgcctgata tcttttttgt cactctaaa agatccttca tccatgatac aactatggag 480
aatatcatgc tgcgcgtaca ccctgatgga aacgtcctcc taagtctcag gataacgggt 540
tcggccatgt gctttatgga tttcagcagg tttcctcttg acactcaaaa ttgttctctt 600
gaactggaaa gctatgccta caatgaggat gacctaattgc tatactggaa acacggaaac 660
aagtccttaa atactgaaga acatatgtcc ctttctcagt tcttcattga agacttcagt 720
gcacttagtg gattagcttt ctatagcagc acaggttggg acaataggct tttcatcaac 780
tttgtgctaa ggaggcatgt tttcttcttt gtgctgcaaa cctatttccc agccatattg 840
atgggtgatgc tttcatgggt ttcattttgg attgaccgaa gagctgttcc tgcaagagtt 900
tccctgggaa tcaccacagt gctgaccatg tccacaatca tcaactgctgt gagcgctctc 960
atgccccagg tgcctacct caaggtgtg gatgtgtacc tgtgggtcag ctccctcttt 1020
gtgttcctgt cagtcattga gtatgcagct gtgaactacc tcaccacagt ggaagagcgg 1080
aaacaattca agaagacagg aaagatttct aggatgtaca atattgatgc agttcaagct 1140
atggcctttg atggttgta ccatgacagc gagattgaca tggaccagac ttccctctct 1200
ctaaactcag aagacttcat gagaagaaaa tcgatatgca gcccagcac cgattcatct 1260
cggataaaga gaagaaaatc cctaggagga catgttggtg gaatcattct ggaaaacaac 1320
catgtcattg acacctattc taggatttta tccccattg tgtatatttt atttaatttg 1380
ttttactggg gtgtatatgt atga 1404

```

<210> 14

<211> 467

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

```

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

```

Gln Thr Tyr Phe Pro Ala Ile Leu Met Val Met Leu Ser Trp Val Ser
 275 280 285
 Phe Trp Ile Asp Arg Arg Ala Val Pro Ala Arg Val Ser Leu Gly Ile
 290 295 300
 Thr Thr Val Leu Thr Met Ser Thr Ile Ile Thr Ala Val Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Met Pro Gln Val Ser Tyr Leu Lys Ala Val Asp Val Tyr Leu Trp Val
 325 330 335
 Ser Ser Leu Phe Val Phe Leu Ser Val Ile Glu Tyr Ala Ala Val Asn
 340 345 350
 Tyr Leu Thr Thr Val Glu Glu Arg Lys Gln Phe Lys Lys Thr Gly Lys
 355 360 365
 Ile Ser Arg Met Tyr Asn Ile Asp Ala Val Gln Ala Met Ala Phe Asp
 370 375 380
 Gly Cys Tyr His Asp Ser Glu Ile Asp Met Asp Gln Thr Ser Leu Ser
 385 390 395 400
 Leu Asn Ser Glu Asp Phe Met Arg Arg Lys Ser Ile Cys Ser Pro Ser
 405 410 415
 Thr Asp Ser Ser Arg Ile Lys Arg Arg Lys Ser Leu Gly Gly His Val
 420 425 430
 Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asn Asn His Val Ile Asp Thr Tyr Ser Arg
 435 440 445
 Ile Leu Phe Pro Ile Val Tyr Ile Leu Phe Asn Leu Phe Tyr Trp Gly
 450 455 460

Val Tyr Val

465

<210> 15

<211> 1320

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 15

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggetg gcgctggccg cgctcgctcct gcacgtgtcc 60
 ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
 gagaggcccc tggccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gacgctcctg 180
 cagatcatgg acgtggatga gaagaaccaa gttttaacca ccaacatttg gctgcaaattg 240
 tcttgacag atcactatct acagtgggaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
 cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360

cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
 ctgcctccag gcataattcaa gagttcctgc tacatcgatg tacgctgggt tccctttgat 480
 gtgcagcact gcaaactgaa gtttgggtcc tggctttacg gaggctggtc cttggatctg 540
 cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
 atccccggca agaggagtga aaggttctat gaggctgca aagagcccta ccccgatgtc 660
 accttcacag tgaccatgcg ccgcaggatg ggttactacc tgattcagat gtatattccc 720
 agcctgctca ttgtcatcct ctcattggatc tccttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780
 gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcacatga ccaccagag ctccggctct 840
 cgagcatctc tgcccaaggt gtcctatgtg aaagccattg acatttggat ggcagtttgc 900
 ctgctctttg tgttctcagc cctattagaa tatgctgccg ttaactttgt gtctcggcaa 960
 cataaggagc tgctccgatt caggaggaag cggagacatc acaagagccc catgttgaat 1020
 ctattccagg aggatgaagc tggagaaggc cgctttaact tctctgccta tgggatgggc 1080
 ccagcctgtc tacaggccaa ggatggcatc tcagtcaagg gcgccaacaa cagtaacacc 1140
 accaaccccc ctctgcacc atctaagtcc ccagaggaga tgcgaaaact cttcatccag 1200
 agggccaaga agatcgacaa aatatccgcg attggcttcc ccatggcctt cctcattttc 1260
 aacatgttct actggatcat ctacaagatt gtccgtagag aggacgtcca caaccagtga 1320

<210> 16

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 16

Met Arg Cys Ser Pro Gly Gly Val Trp Leu Ala Leu Ala Ala Ser Leu

1 5 10 15

Leu His Val Ser Leu Gln Gly Glu Phe Gln Arg Lys Leu Tyr Lys Glu

20 25 30

Leu Val Lys Asn Tyr Asn Pro Leu Glu Arg Pro Val Ala Asn Asp Ser

35 40 45

Gln Pro Leu Thr Val Tyr Phe Ser Leu Ser Leu Leu Gln Ile Met Asp

50 55 60

Val Asp Glu Lys Asn Gln Val Leu Thr Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met

65 70 75 80

Ser Trp Thr Asp His Tyr Leu Gln Trp Asn Val Ser Glu Tyr Pro Gly

85 90 95

Val Lys Thr Val Arg Phe Pro Asp Gly Gln Ile Trp Lys Pro Asp Ile

100 105 110

Leu Leu Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Arg Phe Asp Ala Thr Phe His Thr

115 120 125

Asn Val Leu Val Asn Ser Ser Gly His Cys Gln Tyr Leu Pro Pro Gly		
130	135	140
Ile Phe Lys Ser Ser Cys Tyr Ile Asp Val Arg Trp Phe Pro Phe Asp		
145	150	155
Val Gln His Cys Lys Leu Lys Phe Gly Ser Trp Ser Tyr Gly Gly Trp		
	165	170
Ser Leu Asp Leu Gln Met Gln Glu Ala Asp Ile Ser Gly Tyr Ile Pro		
	180	185
Asn Gly Glu Trp Asp Leu Val Gly Ile Pro Gly Lys Arg Ser Glu Arg		
	195	200
Phe Tyr Glu Cys Cys Lys Glu Pro Tyr Pro Asp Val Thr Phe Thr Val		
	210	215
Thr Met Arg Arg Arg Met Gly Tyr Tyr Leu Ile Gln Met Tyr Ile Pro		
225	230	235
Ser Leu Leu Ile Val Ile Leu Ser Trp Ile Ser Phe Trp Ile Asn Met		
	245	250
Asp Ala Ala Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val Leu Thr		
	260	265
Met Thr Thr Gln Ser Ser Gly Ser Arg Ala Ser Leu Pro Lys Val Ser		
	275	280
Tyr Val Lys Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys Leu Leu Phe Val		
	290	295
Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe Val Ser Arg Gln		
305	310	315
His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg His His Lys Ser		
	325	330
Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly Arg Phe		
	340	345
Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala Lys Asp		
	355	360
Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro		
	370	375
Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln		
385	390	395
Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala		
	405	410
Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg		
	420	425
Arg Glu Asp Val His Asn Gln		430

435

<210> 17

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 17

```

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

```

	245		250		255										
Asp	Ala	Ala	Pro	Ala	Arg	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Thr	Thr	Val	Leu	Thr
	260		265		270										
Met	Thr	Thr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	Ala	Ser	Leu	Pro	Lys	Val	Ser
	275		280		285										
Tyr	Val	Lys	Ala	Ile	Asp	Ile	Trp	Met	Ala	Val	Cys	Leu	Leu	Phe	Val
	290		295		300										
Phe	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Val	Asn	Phe	Val	Ser	Arg	Gln
305			310		315		320								
His	Lys	Glu	Leu	Leu	Arg	Phe	Arg	Arg	Lys	Arg	Arg	His	His	Lys	Ser
	325		330		335										
Pro	Met	Leu	Asn	Leu	Phe	Gln	Glu	Asp	Glu	Ala	Gly	Glu	Gly	Arg	Phe
	340		345		350										
Asn	Phe	Ser	Ala	Tyr	Gly	Met	Gly	Pro	Ala	Cys	Leu	Gln	Ala	Lys	Asp
	355		360		365										
Gly	Ile	Ser	Val	Lys	Gly	Ala	Asn	Asn	Ser	Asn	Thr	Thr	Asn	Pro	Pro
	370		375		380										
Pro	Ala	Pro	Ser	Lys	Ser	Pro	Glu	Glu	Met	Arg	Lys	Leu	Phe	Ile	Gln
385			390		395		400								
Arg	Ala	Lys	Lys	Ile	Asp	Lys	Ile	Ser	Arg	Ile	Gly	Phe	Pro	Met	Ala
	405		410		415										
Phe	Leu	Ile	Phe	Asn	Met	Phe	Tyr	Trp	Ile	Ile	Tyr	Lys	Ile	Val	Arg
	420		425		430										
Arg	Glu	Asp	Val	His	Asn	Gln									
	435														
<210>	18														
<211>	439														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	嵌合LGIC的合成序列														
<400>	18														
Met	Arg	Cys	Ser	Pro	Gly	Gly	Val	Trp	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu
1			5						10					15	
Leu	His	Val	Ser	Leu	Gln	Gly	Glu	Phe	Gln	Arg	Lys	Leu	Tyr	Lys	Glu
			20						25					30	
Leu	Val	Lys	Asn	Tyr	Asn	Pro	Leu	Glu	Arg	Pro	Val	Ala	Asn	Asp	Ser
			35						40					45	
Gln	Pro	Leu	Thr	Val	Tyr	Phe	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Gln	Ile	Met	Asp

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

Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro
 370 375 380
 Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln
 385 390 395 400
 Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala
 405 410 415
 Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg
 420 425 430
 Arg Glu Asp Val His Asn Gln
 435
 <210> 19
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 嵌合LGIC的合成序列
 <400> 19
 Met Arg Cys Ser Pro Gly Gly Val Trp Leu Ala Leu Ala Ala Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu His Val Ser Leu Gln Gly Glu Phe Gln Arg Lys Leu Tyr Lys Glu
 20 25 30
 Leu Val Lys Asn Tyr Asn Pro Leu Glu Arg Pro Val Ala Asn Asp Ser
 35 40 45
 Gln Pro Leu Thr Val Tyr Phe Ser Leu Ser Leu Leu Gln Ile Met Asp
 50 55 60
 Val Asp Glu Lys Asn Gln Val Leu Thr Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met
 65 70 75 80
 Ser Trp Thr Asp His Tyr Leu Gln Trp Asn Val Ser Glu Tyr Pro Gly
 85 90 95
 Val Lys Thr Val Arg Phe Pro Asp Gly Gln Ile Trp Lys Pro Asp Ile
 100 105 110
 Leu Leu Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Arg Phe Asp Ala Thr Phe His Thr
 115 120 125
 Asn Val Leu Val Asn Ser Ser Gly His Cys Gln Tyr Leu Pro Pro Gly
 130 135 140
 Ile Phe Lys Ser Ser Cys Tyr Ile Asp Val Arg Trp Phe Pro Phe Asp
 145 150 155 160
 Val Gln His Cys Lys Leu Lys Phe Gly Ser Trp Ser Tyr Gly Gly Trp
 165 170 175

Ser Leu Asp Leu Gln Met Gln Glu Ala Asp Ile Ser Gly Tyr Ile Pro		
180	185	190
Asn Gly Glu Trp Asp Leu Val Gly Ile Pro Gly Lys Arg Ser Glu Arg		
195	200	205
Phe Tyr Glu Cys Cys Lys Glu Pro Tyr Pro Asp Val Thr Phe Thr Val		
210	215	220
Thr Met Arg Arg Arg Thr Leu Tyr Tyr Leu Ile Gln Met Tyr Ile Pro		
225	230	235
Ser Leu Leu Ile Val Ile Leu Ser Trp Ile Ser Phe Trp Ile Asn Met		
245	250	255
Asp Ala Ala Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val Leu Thr		
260	265	270
Met Thr Thr Gln Ser Ser Gly Ser Arg Ala Ser Leu Pro Lys Val Ser		
275	280	285
Tyr Val Lys Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys Leu Leu Phe Val		
290	295	300
Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe Val Ser Arg Gln		
305	310	315
His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg His His Lys Ser		
325	330	335
Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly Arg Phe		
340	345	350
Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala Lys Asp		
355	360	365
Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro		
370	375	380
Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln		
385	390	395
Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala		
405	410	415
Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg		
420	425	430
Arg Glu Asp Val His Asn Gln		
435		

<210> 20

<211> 1329

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 20

```

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgtcgctcct gcacgtgtcc 60
ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
gagaggcccc tggccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gaggctcctg 180
cagatcatgg acgtggatga gaagaaccaa gttttaacca ccaacatttg gctgcaaatg 240
tcttggacag atcactattht acagtggaaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
cgtttccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
ctgcctccag gcatattcaa gagttctgc tacatcgatg tacgctgggt tccctttgat 480
gtgcagcact gcaaaactgaa gtttgggtcc tgggtcttac gaggctgggt cttggatctg 540
cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
atccccggca agaggagtga aaggttctat gactgctgca aagagcccta cccgatgtc 660
accttcacag tgacatgcg ccgcaggatg ggttactacc tgattcagat gtatattccc 720
agcctgctca ttgtatcct ctcattgatc tccttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780
gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcacatga ccaccagag ctccggctct 840
gagatcatgc ccgcaacatc cgattcggtg tcctatgtga aagccattga catttgatg 900
gcagtttgcc tgctctttgt gttctcagcc ctattagaat atgctgccgt taactttgtg 960
tctcggaac ataaggagct gctccgattc aggaggaagc ggagacatca caagagcccc 1020
atgttgaatc tattccagga ggatgaagct ggagaaggcc gctttaactt ctctgcctat 1080
gggatgggcc cagcctgtct acaggccaag gatggcatct cagtcaaggc cgccaacaac 1140
agtaacacca ccaaccccc tcctgcacca tctaagtccc cagaggagat gcgaaaactc 1200
ttcatccaga gggccaagaa gatcgacaaa atatcccga ttggcttccc catggccttc 1260
ctcattttca acatgttcta ctggatcatc tacaagattg tccgtagaga ggacgtccac 1320
aaccagtga 1329

```

<210> 21

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 21

```

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

```

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

Ala Lys Asp Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr		
370	375	380
Asn Pro Pro Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu		
385	390	395
Phe Ile Gln Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe		
	405	410
Pro Met Ala Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys		
	420	425
		430
Ile Val Arg Arg Glu Asp Val His Asn Gln		
435	440	

<210> 22

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 22

```

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgtcgctcct gcacgtgtcc 60
ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
gagaggcccc tggccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gagcctcctg 180
cagatcatgg acgtggatga gaagaaccaa gttttaacca ccaacatttg gctgcaaatt 240
tcttggacag atcactatit acagtggat gtgtcagaat atccagggtt gaagactgtt 300
cgtttccag atggccagat ttggaaacca gacattctt tctataacag tgctgatgag 360
cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttgggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
ctgcctccag gcatattcaa gagttcctgc tacatcgatg tacgctgggt tccctttgat 480
gtgcagcact gcaaactgaa gtttgggtcc tgggtcttac gaggctgggt cttggatctg 540
cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
atccccggca agaggagtga aaggttctat gagtgcctga aagagcccta cccgatgtc 660
accttcacag tgaccatgcg ccgcaggatg ggttactacc tgattcagat gtatattccc 720
agcctgctca ttgtatcct ctcattgatg tcttcttgga tcaacatgga tgctgcacct 780
gctcggtgtg gcctaggcat caccactgtg ctcaccatga ccaccagag ctccggctct 840
gagatcatgc ccgcaacatc cgattcggta ccattgatag cccaggccat tgacatttgg 900
atggcagttt gcctgctctt tgtgtttctc gccctattag aatatgctgc cgttaacttt 960
gtgtctcggc aacataagga gctgctccga ttcaggagga agcggagaca tcacaagagc 1020
cccatgttga atctattcca ggaggatgaa gctggagaag gccgctttaa cttctctgcc 1080
tatgggatgg gcccagcctg tctacaggcc aaggatggca tctcagtcaa gggcgccaac 1140
aacagtaaca ccaccaaccc ccctcctgca ccatctaagt ccccagagga gatgcgaaaa 1200
ctcttcatcc agaggggcaa gaagatcgac aaaatatccc gcattggctt ccccatggcc 1260
ttcctcattt tcaacatgtt ctactggatc atctacaaga ttgtccgtag agaggacgtc 1320

```

cacaaccagt ga 1332

<210> 23

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 23

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

245	250	255
Asp Ala Ala Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val Leu Thr		
260	265	270
Met Thr Thr Gln Ser Ser Gly Ser Glu Ile Met Pro Ala Thr Ser Asp		
275	280	285
Ser Val Pro Leu Ile Ala Gln Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys		
290	295	300
Leu Leu Phe Val Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe		
305	310	315
Val Ser Arg Gln His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg		
325	330	335
His His Lys Ser Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly		
340	345	350
Glu Gly Arg Phe Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu		
355	360	365
Gln Ala Lys Asp Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr		
370	375	380
Thr Asn Pro Pro Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys		
385	390	395
Leu Phe Ile Gln Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly		
405	410	415
Phe Pro Met Ala Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr		
420	425	430
Lys Ile Val Arg Arg Glu Asp Val His Asn Gln		
435	440	

<210> 24

<211> 1323

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 24

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggcgg cgctcgctcct gcacgtgtcc 60
ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
gagaggccccg tggccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gacgctcctg 180
cagatcatgg acgtggatga gaagaaccaa gttttaacca ccaacatttg gctgcaaata 240
tcttggacag atcactatct acagtgggaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420

ctgcctccag gcatattcaa gagttcctgc tacatcgatg tacgctgggt tccctttgat 480
 gtgcagcact gcaaactgaa gtttgggtcc tggctttacg gaggctggtc cttggatctg 540
 cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
 atccccggca agaggagtga aaggttctat gaggctgca aagagcccta ccccgatgtc 660
 accttcacag tgacctgcg ccgcaggatg ggttactacc tgattcagat gtatattccc 720
 agcctgctca ttgtcatcct ctcattggatc tccttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780
 gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcacctga ccaccagag ctccggctct 840
 cgagcatctc tgcccaaggt gtccgattcg gtaccattga ttgacatttg gatggcagtt 900
 tgctgctctc ttgtgttctc agccctatta gaatatgctg ccgttaactt tgtgtctcgg 960
 caacataagg agctgctccg attcaggagg aagcggagac atcacaagag ccccatgttg 1020
 aatctattcc aggaggatga agctggagaa ggccgcttta acttctctgc ctatgggatg 1080
 ggcccagcct gtctacagge caaggatggc atctcagtea agggcgccaa caacagtaac 1140
 accaccaacc cccctcctgc accatctaag tccccagagg agatgcgaaa actcttcate 1200
 cagagggcca agaagatcga caaaatatcc cgcattggct tccccatggc ctctctcatt 1260
 ttcaacatgt tctactggat catctacaag attgtccgta gagaggacgt ccacaaccag 1320
 tga 1323

<210> 25

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 25

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

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

435

440

<210> 26

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 26

```

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgtcgctcct gcacgtgtcc 60
ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
gagaggcccc tggccaatga ctcgcaacca ctcacgtct acttctccct gacgctcctg 180
cagatcatgg acgtggatga gaagaaccaa gttttaacca ccaacatttg gctgcaaattg 240
tcttggacag atcactatctt acagtggaa gtgtcagaat atccagggtg gaagactgtt 300
cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
ctgcctccag gcataattcaa gagttcctgc tacatcgatg tacgctggtt tccctttgat 480
gtgcagcact gcaaactgaa gtttgggtcc tggtcttacg gaggctggtc cttggatctg 540
cagatgcagg aggagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
atccccggca agaggagtga aaggttctat gagtgctgca aagagcccta cccgatgtc 660
accttcacag tgaccatgga gcggcagatg ggttactacc tgattcagat gtatatcccc 720
agcctgctca ttgtcatcct ctcatggatc tccttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780
gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcacatga ccaccagag ctccggctct 840
gagatcatgc ccgcaacatc cgattcggtg ccattgatag cccaggccat tgacatttgg 900
atggcagttt gcctgctctt tgtgttctca gccctattag aatatgctgc cgtaacttt 960
gtgtctcggc aacataagga gctgctccga ttcaggagga agcggagaca tcacaagagc 1020
cccatgttga atctattcca ggaggatgaa gctggagaag gccgctttaa cttctctgcc 1080
tatgggatgg gccagcctg tctacaggcc aaggatggca tctcagtcaa gggcgccaac 1140
aacagtaaca ccaccaaccc ccctcctgca ccattctaagt cccagagga gatgcgaaaa 1200
ctcttcatcc agagggccaa gaagatcgac aaaatatccc gcattggctt ccccatggcc 1260
ttcctcatctt tcaacatgtt ctactggatc atctacaaga ttgtccgtag agaggacgtc 1320
cacaaccagt ga 1332

```

<210> 27

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 27

Met Arg Cys Ser Pro Gly Gly Val Trp Leu Ala Leu Ala Ala Ser Leu

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

Val Ser Arg Gln His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg		
325	330	335
His His Lys Ser Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly		
340	345	350
Glu Gly Arg Phe Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu		
355	360	365
Gln Ala Lys Asp Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr		
370	375	380
Thr Asn Pro Pro Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys		
385	390	395
Leu Phe Ile Gln Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly		
405	410	415
Phe Pro Met Ala Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr		
420	425	430
Lys Ile Val Arg Arg Glu Asp Val His Asn Gln		
435	440	

<210> 28

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 28

```

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgtcgctcct gcacgtgtcc 60
ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
gagaggcccc tggccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gaggctcctg 180
cagatcatgg acgtggatga gaagaaccaa gttttaacca ccaacatttg gctgcaaatg 240
tcttggacag atcactatit acagtggaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
ctgcctccag gcatattcaa gagttctgc tacatcgatg tacgctgggt tccctttgat 480
gtgcagcact gcaaactgaa gtttgggttc tgggtcttac gaggctgggt cttggatctg 540
cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
atccccggca agaggagtga aaggttctat gagtgtctga aagagcccta cccgatgtc 660
accttcacag tgaccatgcg ccgcaggacg ggttactacc tgattcagat gtatatcccc 720
agcctgetca ttgtatcctt ctcatggatc tcttcttgga tcaacatgga tgctgcacct 780
gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcacatga ccaccagag ctccggtctt 840
gagatcatgc ccgcaacatc cgattcggtg ccattgatag cccaggccat tgacatttgg 900
atggcagttt gcctgctctt tgtgttctca gccctattag aatatgctgc cgtttaacttt 960

```

gtgtctcggc aacataagga gctgctccga ttcaggagga agcggagaca tcacaagagc 1020
 cccatgttga atctattcca ggaggatgaa gctggagaag gccgctttaa cttctctgcc 1080
 tatgggatgg gcccagcctg tctacaggcc aaggatggca tctcagtcaa gggcgccaac 1140
 aacagtaaca ccaccaaccc cctccttgca ccatctaagt ccccagagga gatgcgaaaa 1200
 ctcttcatcc agagggccaa gaagatcgac aaaatatccc gcattggctt ccccatggcc 1260
 ttccctcatTT tcaacatgTT ctactggatc atctacaaga ttgtccgtag agaggacgtc 1320
 cacaaccagt ga 1332

<210> 29

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 29

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

195	200	205
Phe Tyr Glu Cys Cys Lys Glu Pro Tyr Pro Asp Val Thr Phe Thr Val		
210	215	220
Thr Met Arg Arg Arg Thr Gly Tyr Tyr Leu Ile Gln Met Tyr Ile Pro		
225	230	235
Ser Leu Leu Ile Val Ile Leu Ser Trp Ile Ser Phe Trp Ile Asn Met		
245	250	255
Asp Ala Ala Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val Leu Thr		
260	265	270
Met Thr Thr Gln Ser Ser Gly Ser Glu Ile Met Pro Ala Thr Ser Asp		
275	280	285
Ser Val Pro Leu Ile Ala Gln Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys		
290	295	300
Leu Leu Phe Val Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe		
305	310	315
Val Ser Arg Gln His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg		
325	330	335
His His Lys Ser Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly		
340	345	350
Glu Gly Arg Phe Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu		
355	360	365
Gln Ala Lys Asp Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr		
370	375	380
Thr Asn Pro Pro Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys		
385	390	395
Leu Phe Ile Gln Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly		
405	410	415
Phe Pro Met Ala Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr		
420	425	430
Lys Ile Val Arg Arg Glu Asp Val His Asn Gln		
435	440	

<210> 30

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 30

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgctcgctcct gcacgtgtcc 60

ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
 gagaggcccc tggccaatga ctgcgaacca ctcaccgtct acttctccct gagcctcctg 180
 cagatcatgg acgtggatga gaagaaccaa gttttaacca ccaacatttg gctgcaaagt 240
 tcttggacag atcactattht acagtgggaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
 cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
 cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttgggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
 ctgcctccag gcatattcaa gagttcctgc tacatcgatg tacgctgggt tccctttgat 480
 gtgcagcact gcaaactgaa gtttgggtcc tgggtcttac gaggctgggt cttggatctg 540
 cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
 atccccggca agaggagtga aaggttctat gaggctgca aagagcccta cccgatgtc 660
 accttcacag tgaccatgcg ccgcaggacg ctctactacc tgattcagat gtatattccc 720
 agcctgctca ttgtcatcct ctcatggatc tcttcttgga tcaacatgga tgctgcacct 780
 gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcaccatga ccaccagag ctccggctct 840
 gagatcatgc ccgcaacatc cgattcggta ccattgatag cccaggccat tgacatttgg 900
 atggcagttt gcctgctctt tgtgttctca gccctattag aatatgctgc cgtaactttt 960
 gtgtctcggc aacataagga gctgctccga ttcaggagga agcggagaca tcacaagagc 1020
 cccatgttga atctattcca ggaggatgaa gctggagaag gccgctttaa cttctctgcc 1080
 tatgggatgg gccagcctg tctacaggcc aaggatggca tctcagtcaa gggcgccaac 1140
 aacagtaaca ccaccaaccc cctcctgca ccatctaagt cccagagga gatgcgaaaa 1200
 ctcttcatcc agagggccaa gaagatcgac aaaatatccc gcattggctt ccccatggcc 1260
 ttctcattht tcaacatgth ctactggatc atctacaaga ttgtccgtag agaggacgtc 1320
 cacaaccagt ga 1332

<210> 31

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 31

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

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

385	390	395	400
Leu Phe Ile Gln Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly			
	405	410	415
Phe Pro Met Ala Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr			
	420	425	430
Lys Ile Val Arg Arg Glu Asp Val His Asn Gln			
435	440		

<210> 32

<211> 1320

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 32

```

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgtcgctcct gcacgtgtcc 60
ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
gagaggcccc tggccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gacgctcctg 180
cagatcatgg acgtggatga gaagaaccaa gttttaacca ccaacatttg gctgcaaatg 240
tcttgacag atcactatct acagtggaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
ctgcctccag gcatattcaa gagttcctgc cccatggact tgaagaattt ccccatggat 480
gtccagacat gcaaactgaa gtttgggtcc tggtcttacg gaggctggtc cttggatctg 540
cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
atccccggca agaggagtga aaggttctat gagtgcctga aagagcccta cccgatgtc 660
accttcacag tgaccatgcg ccgcaggatg ggttactacc tgattcagat gtatattccc 720
agcctgctca ttgtcatcct ctcattggatc tccttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780
gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcaccatga ccaccagag ctccggctct 840
cgagcatctc tgcccaaggt gtcctatgtg aaagccattg acatttggat ggcagtttgc 900
ctgctctttg tgttctcagc cctattagaa tatgctgccg ttaactttgt gtctcggcaa 960
cataaggagc tgctccgatt caggaggaag cggagacatc acaagagccc catgttgaat 1020
ctattccagg aggatgaagc tggagaaggc cgctttaact tctctgccta tgggatgggc 1080
ccagcctgtc tacaggccaa ggatggcatc tcagtcaagg gcgccaacaa cagtaacacc 1140
accaaccccc ctctgcacc atctaagtcc ccagaggaga tgcgaaaact cttcatccag 1200
agggccaaga agatcgacaa aatatccgcg attggcttcc ccatggcctt cctcattttc 1260
aacatgttct actggatcat ctacaagatt gtccgtagag aggacgtcca caaccagtga 1320

```

<210> 33

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 33

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

275	280	285
Tyr Val Lys Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys Leu Leu Phe Val		
290	295	300
Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe Val Ser Arg Gln		
305	310	315
His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg His His Lys Ser		
325	330	335
Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly Arg Phe		
340	345	350
Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala Lys Asp		
355	360	365
Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro		
370	375	380
Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln		
385	390	395
Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala		
405	410	415
Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg		
420	425	430
Arg Glu Asp Val His Asn Gln		
435		

<210> 34

<211> 1320

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 34

```

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgctcgctcct gcacgtgtcc 60
ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
gagaggccccg tggccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gacccctctg 180
cagatcatgg acgtggatga gaagaaccaa gttttaacca ccaacatttg gctgcaaatg 240
tcttggacag atcactatatt acagtggaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
ctgcctccag gcataattcaa gagttcctgc cccatggact tgaagaattt tccctttgat 480
gtgcagcact gcaaactgaa gtttgggtcc tggtcttacg gaggctggtc cttggatctg 540
cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
atccccggca agaggagtga aaggttctat gagtgtgca aagagcccta ccccgatgtc 660

```

accttcacag tgaccatgcg ccgcaggatg ggttactacc tgattcagat gtatatcccc 720
 agcctgctca ttgtcatcct ctcattggatc tccttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780
 gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcacatga ccacccagag ctccggctct 840
 cgagcatctc tgcccaaggt gtcctatgtg aaagccattg acatttggat ggcagtttgc 900
 ctgctctttg tgttctcagc cctattagaa tatgctgccg ttaactttgt gtctcggcaa 960
 cataaggagc tgctccgatt caggaggaag cggagacatc acaagagccc catgttgaat 1020
 ctattccagg aggatgaagc tggagaaggc cgctttaact tctctgccta tgggatgggc 1080
 ccagcctgtc tacaggccaa ggatggcatc tcagtcaagg gcgccaacaa cagtaacacc 1140
 accaaccccc ctctgcacc atctaagtcc ccagaggaga tgcgaaaact cttcatccag 1200
 agggccaaga agatcgacaa aatatccgc attggcttcc ccatggcctt cctcattttc 1260
 aacatgttct actggatcat ctacaagatt gtccgtagag aggacgtcca caaccagtga 1320

<210> 35

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 35

Met Arg Cys Ser Pro Gly Gly Val Trp Leu Ala Leu Ala Ala Ser Leu

1 5 10 15

Leu His Val Ser Leu Gln Gly Glu Phe Gln Arg Lys Leu Tyr Lys Glu

20 25 30

Leu Val Lys Asn Tyr Asn Pro Leu Glu Arg Pro Val Ala Asn Asp Ser

35 40 45

Gln Pro Leu Thr Val Tyr Phe Ser Leu Ser Leu Leu Gln Ile Met Asp

50 55 60

Val Asp Glu Lys Asn Gln Val Leu Thr Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met

65 70 75 80

Ser Trp Thr Asp His Tyr Leu Gln Trp Asn Val Ser Glu Tyr Pro Gly

85 90 95

Val Lys Thr Val Arg Phe Pro Asp Gly Gln Ile Trp Lys Pro Asp Ile

100 105 110

Leu Leu Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Arg Phe Asp Ala Thr Phe His Thr

115 120 125

Asn Val Leu Val Asn Ser Ser Gly His Cys Gln Tyr Leu Pro Pro Gly

130 135 140

Ile Phe Lys Ser Ser Cys Pro Met Asp Leu Lys Asn Phe Pro Phe Asp

145 150 155 160

Val Gln His Cys Lys Leu Lys Phe Gly Ser Trp Ser Tyr Gly Gly Trp

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

<210> 36

<211> 1320

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 36

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgtcgctcct gcacgtgtcc 60
 ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
 gagaggcccc tggccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gaggctcctg 180
 cagatcatgg acgtggatga gacaaccatg gttttaacca ccaacatttg gctgcaaattg 240
 tcttggacag atcactatctt acagtgggaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
 cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
 cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
 ctgcctccag gcataattcaa gagttctgc tacatcgatg tacgctgggt tccctttgat 480
 gtgcagcact gcaaaactgaa gtttgggtcc tgggtcttac gaggctgggc cttggatctg 540
 cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
 atccccggca agaggagtga aaggttctat gagtgtgca aagagcccta cccgatgtc 660
 accttcacag tgaccatgcg ccgcaggatg gggtactacc tgattcagat gtatatccccc 720
 agcctgctca ttgtcatcct ctcatggatc tccttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780
 gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctccacatga ccaccagag ctccggctct 840
 cgagcatctc tgcccaaggt gtcctatgtg aaagccattg acatttgat ggcagtttgc 900
 ctgctctttg tgttctcagc cctattagaa tatgctgccg ttaactttgt gtctcggcaa 960
 cataaggagc tgctccgatt caggaggaag cggagacatc acaagagccc catgttgaat 1020
 ctattccagg aggatgaagc tggagaaggc cgctttaact tctctgccta tgggatgggc 1080
 ccagcctgtc tacaggccaa ggatggcatc tcagtcaagg gcgccaacaa cagtaacacc 1140
 accaaccccc ctctgcacc atctaagtcc ccagaggaga tgcgaaaact cttcatccag 1200
 agggccaaga agatcgacaa aatatccgc attggcttcc ccatggcctt cctcattttc 1260
 aacatgttct actggatcat ctacaagatt gtccgtagag aggacgtcca caaccagtga 1320

<210> 37

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 37

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

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

Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro
 370 375 380
 Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln
 385 390 395 400
 Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala
 405 410 415
 Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg
 420 425 430
 Arg Glu Asp Val His Asn Gln
 435

<210> 38

<211> 1320

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 38

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgtcgctcct gcacgtgtcc 60
 ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
 gagaggcccg tggccaatga ctgcgaacca ctcaccgtct acttctccct gagcctcctg 180
 cagatcatgg acattgctga gacaaccatg gacttaacca ccaacatttg gctgcaaattg 240
 tcttggacag atcactatct acagtggaaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
 cgtttccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
 cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttgggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
 ctgcctccag gcatattcaa gagttcctgc ccatggact tgaagaattt ccccatggat 480
 gtccagacat gcaaactgaa gtttgggtcc tgggtcttac gaggctggtc cttggatctg 540
 cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
 atccccggca agaggagtga aaggttctat gagtgcctga aagagcccta cccgatgtc 660
 accttcacag tgaccatgcg ccgcaggatg ggttactacc tgattcagat gtatattccc 720
 agcctgctca ttgtcatcct ctcatggatc tcttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780
 gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcaccatga ccaccagag ctccggctct 840
 cgagcatctc tgcccaaggt gtcctatgtg aaagccattg acatttggat ggcagtttgc 900
 ctgctctttg tgttctcagc cctattagaa tatgctgccg ttaactttgt gtctcggcaa 960
 cataaggagc tgctccgatt caggaggaag cggagacatc acaagagccc catgttgaat 1020
 ctattccagg aggatgaagc tggagaaggc cgctttaact tctctgccta tgggatgggc 1080
 ccagcctgtc tacaggccaa ggatggcatc tcagtcaagg gcgccaacaa cagtaacacc 1140
 accaaccccc ctctgcacc atctaagtcc ccagaggaga tgcgaaaact cttcatccag 1200
 agggccaaga agatcgacaa aatatccgcg attggcttcc ccatggcctt cctcattttc 1260
 aacatgttct actggatcat ctacaagatt gtccgtagag aggacgtcca caaccagtga 1320

<210> 39

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 39

```

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

```

Asp Ala Ala Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val Leu Thr
 260 265 270
 Met Thr Thr Gln Ser Ser Gly Ser Arg Ala Ser Leu Pro Lys Val Ser
 275 280 285
 Tyr Val Lys Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys Leu Leu Phe Val
 290 295 300
 Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe Val Ser Arg Gln
 305 310 315 320
 His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg His His Lys Ser
 325 330 335
 Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly Arg Phe
 340 345 350
 Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala Lys Asp
 355 360 365
 Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro
 370 375 380
 Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln
 385 390 395 400
 Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala
 405 410 415
 Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg
 420 425 430
 Arg Glu Asp Val His Asn Gln
 435

<210> 40

<211> 1320

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 40

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggetg gcgctggcgg cgctcgctcct gcacgtgtcc 60
 ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
 gagaggcccc tggccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gacgctcctg 180
 cagatcatgg acgtggatga gacaacatg gttttaacca ccaacatttg gctgcaaattg 240
 tcttgacag atcactatct acagtgggaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
 cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
 cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
 ctgcctccag gcataattcaa gagttcctgc cccatggact tgaagaattt ccccatggat 480

gtccagacat gcaaactgaa gtttgggtcc tggctttacg gaggctggtc cttggatctg 540
 cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
 atccccggca agaggagtga aaggttctat gagtgcctga aagagcccta ccccgatgtc 660
 accttcacag tgaccatgcg ccgcaggatg ggttactacc tgattcagat gtatattccc 720
 agcctgctca ttgtcatcct ctcattggatc tccttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780
 gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcacatga ccaccagag ctccggctct 840
 cgagcatctc tgcccaaggt gtcctatgtg aaagccattg acatttggat ggcagtttgc 900
 ctgctctttg tgttctcagc cctattagaa tatgctgccg ttaactttgt gtctcgga 960
 cataaggagc tgctccgatt caggaggaag cggagacatc acaagagccc catgttgaat 1020
 ctattccagg aggatgaagc tggagaaggc cgctttaact tctctgccta tgggatgggc 1080
 ccagcctgtc tacaggccaa ggatggcatc tcagtcaagg gcgccaacaa cagtaacacc 1140
 accaaccccc ctctgcacc atctaagtc ccagaggaga tgcgaaaact cttcatccag 1200
 aggccaaga agatcgacaa aatatccgc attggttcc ccatggcctt cctcattttc 1260
 aacatgttct actggatcat ctacaagatt gtccgtagag aggacgtcca caaccagtga 1320

<210> 41

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 41

Met Arg Cys Ser Pro Gly Gly Val Trp Leu Ala Leu Ala Ala Ser Leu

1 5 10 15

Leu His Val Ser Leu Gln Gly Glu Phe Gln Arg Lys Leu Tyr Lys Glu

20 25 30

Leu Val Lys Asn Tyr Asn Pro Leu Glu Arg Pro Val Ala Asn Asp Ser

35 40 45

Gln Pro Leu Thr Val Tyr Phe Ser Leu Ser Leu Leu Gln Ile Met Asp

50 55 60

Val Asp Glu Thr Thr Met Val Leu Thr Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met

65 70 75 80

Ser Trp Thr Asp His Tyr Leu Gln Trp Asn Val Ser Glu Tyr Pro Gly

85 90 95

Val Lys Thr Val Arg Phe Pro Asp Gly Gln Ile Trp Lys Pro Asp Ile

100 105 110

Leu Leu Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Arg Phe Asp Ala Thr Phe His Thr

115 120 125

Asn Val Leu Val Asn Ser Ser Gly His Cys Gln Tyr Leu Pro Pro Gly

130 135 140

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

<210> 42

<211> 1317

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 42

```

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgtcgctcct gcacgtgtcc 60
ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
gagaggcccc tggccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gaggctcctg 180
cagatcatgg acgtggatga gacaacatg gttttaacca ccaacatttg gctgcaaatg 240
tcttggacag atcactattht acagtggat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
ctgcctccag gcatattcaa gagttcctgc cccatggact tgaagaattt ccccatggat 480
gtccagacat gcaaactgaa gtttgggtcc tggctttacg gaggctggtc cttggatctg 540
cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
atccccggca agaggagtga aaggttctat gagtgtctga aagagcccta cccgatgtc 660
accttcacag tgacatgga gcggcagatg gtttactacc tgattcagat gtatattccc 720
agcctgtctc ttgtcatcct ctcatggatc tccttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780
gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcacatga ccaccagag ctccggctct 840
cgagcatctc tgcccaaggt gtcctatgtg aaagccattg acatttggat ggcagtttgc 900
ctgctctttg tgttctcagc cctattagaa tatgctgccg ttaactttgt gtctcggcaa 960
cataaggagc tgctccgatt caggaggaag cggagacatc acaagagccc catgttgaat 1020
ctattccagg aggatgaagc tggagaaggc cgctttaact tctctgccta tgggatgggc 1080
ccagcctgtc tacaggccaa ggatggcatc tcagtcaagg gcgccaacaa cagtaacacc 1140
accaaccccc ctctgcacc atctaagtcc ccagaggaga tgcgaaaact cttcatccag 1200
agggccaaga agatcgacaa aatatccgc attggcttcc ccatggcctt cctcattht 1260
aacatgttct actggatcat ctacaagatt gtccgtagag aggacgtcca caaccag 1317

```

<210> 43

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 43

```

Met Arg Cys Ser Pro Gly Gly Val Trp Leu Ala Leu Ala Ala Ser Leu
1           5           10           15
Leu His Val Ser Leu Gln Gly Glu Phe Gln Arg Lys Leu Tyr Lys Glu
                20           25           30

```

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

340	345	350
Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala Lys Asp		
355	360	365
Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro		
370	375	380
Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln		
385	390	395
Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala		
405	410	415
Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg		
420	425	430
Arg Glu Asp Val His Asn Gln		

435

<210> 44

<211> 1317

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 44

```

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgtegcctcct gcacgtgtcc 60
ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
gagaggcccg tggccaatga ctgcgaacca ctcaccgtct acttctccct gaggctcctg 180
cagatcatgg acattgctga gacaacatg gacttaacca ccaacatttg gctgcaaattg 240
tcttggacag atcactatctt acagtgggaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300
cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
ctgcctccag gcatattcaa gatttctgc cccatggact tgaagaattt ccccatggat 480
gtccagacat gcaaactgaa gtttgggtcc tggtcttacg gaggtgggtc cttggatctg 540
cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
atccccggca agaggagtga aaggttctat gattgctgca aagagcccta cccgatgtc 660
accttcacag tgaccatgga gcggcagatg ggttactacc tgattcagat gtatattccc 720
agcctgctca ttgtcatcct ctcattggatc tcttcttgga tcaacatgga tgctgcacct 780
gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcaccatga ccaccagag ctccggtctc 840
cgagcatctc tgcccaaggt gtcctatgtg aaagccattg acatttggat ggcagtttgc 900
ctgctctttg tgttctcagc cctattagaa tatgctgccg ttaactttgt gtctcggcaa 960
cataaggagc tgctccgatt caggaggaag cggagacatc acaagagccc catgttgaat 1020
ctattccagg aggatgaagc tggagaagc cgctttaact tctctgccta tgggatgggc 1080
ccagcctgtc tacaggccaa ggatggcatc tcagtcaagg gcgccaacaa cagtaacacc 1140

```

accaaccccc ctctgcacc atctaagtcc ccagaggaga tgcgaaaact cttcatccag 1200
 agggccaaga agatcgacaa aatatccgcg attggcttcc ccatggcctt cctcattttc 1260
 aacatgttct actggatcat ctacaagatt gtccgtagag aggacgtcca caaccag 1317

<210> 45

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 45

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

225	230	235	240
Ser Leu Leu Ile Val Ile Leu Ser Trp Ile Ser Phe Trp Ile Asn Met			
	245	250	255
Asp Ala Ala Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val Leu Thr			
	260	265	270
Met Thr Thr Gln Ser Ser Gly Ser Arg Ala Ser Leu Pro Lys Val Ser			
	275	280	285
Tyr Val Lys Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys Leu Leu Phe Val			
	290	295	300
Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe Val Ser Arg Gln			
305	310	315	320
His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg His His Lys Ser			
	325	330	335
Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly Arg Phe			
	340	345	350
Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala Lys Asp			
	355	360	365
Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro			
	370	375	380
Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln			
385	390	395	400
Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala			
	405	410	415
Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg			
	420	425	430
Arg Glu Asp Val His Asn Gln			
	435		

<210> 46

<211> 1329

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 46

```

atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggccg cgctcgtcct gcacgtgtcc 60
ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120
gagaggcccc tgccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gagcctcctg 180
cagatcatgg acgtggatga gacaaccatg gttttaacca ccaacatttg gctgcaaatt 240
tcttggacag atcactattht acagtgggaat gtgtcagaat atccagggtt gaagactgtt 300

```

cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360
 cgctttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420
 ctgcctccag gcatattcaa gagttcctgc tacatcgatg tacgctggtt tccctttgat 480
 gtgcagcact gcaaactgaa gtttgggtcc tggctttacg gaggctggtc cttggatctg 540
 cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600
 atccccggca agaggagtga aaggttctat gagtgcctga aagagcccta ccccgatgtc 660
 accttcacag tgaccatgcg ccgcaggatg ggttactacc tgattcagat gtatattccc 720
 agcctgctca ttgtcatcct ctcattggatc tccttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780
 gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcacatga ccacccagag ctccggctct 840
 gagatcatgc ccgcaacatc cgattcggta ccattgatag cccaggccat tgacatttgg 900
 atggcagttt gcctgctctt tgtgtttctca gccctattag aatatgctgc cgtttaacttt 960
 gtgtctcggc aacataagga gctgctccga ttcaggagga agcggagaca tcacaagagc 1020
 cccatgttga atctattcca ggaggatgaa gctggagaag gccgctttaa cttctctgcc 1080
 tatgggatgg gcccagcctg tctacaggcc aaggatggca tctcagtcaa gggcgccaac 1140
 aacagtaaca ccaccaaccc ccctcctgca ccatctaagt ccccagagga gatgcgaaaa 1200
 ctcttcatcc agagggccaa gaagatcgac aaaatatccc gcattggctt ccccatggcc 1260
 ttctcatatt tcaacatggt ctactggatc atctacaaga ttgtccgtag agaggacgtc 1320
 cacaaccag 1329

<210> 47

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 47

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

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

420	425	430
Lys Ile Val Arg Arg Glu Asp Val His Asn Gln		
435	440	
<210> 48		
<211> 1332		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 嵌合LGIC的合成序列		
<400> 48		
atgcgctgct cgccgggagg cgtctggctg gcgctggcgc cgctcgctcct gcacgtgtcc 60		
ctgcaaggcg agttccagag gaagctttac aaggagctgg tcaagaacta caatcccttg 120		
gagaggcccc tggccaatga ctcgcaacca ctcaccgtct acttctccct gaggctcctg 180		
cagatcatgg acgtggatga gaagaaccaa gttttaacca ccaacatttg gctgcaaattg 240		
tcttggacag atcactatct acagtggaat gtgtcagaat atccaggggt gaagactgtt 300		
cgtttcccag atggccagat ttggaaacca gacattcttc tctataacag tgctgatgag 360		
cgttttgacg ccacattcca cactaacgtg ttggtgaact cttctgggca ttgccagtac 420		
ctgcctccag gcataattcaa gagttcctgc cccatggact tgaagaattt ccccatggat 480		
gtccagacat gcaaactgaa gtttgggtcc tggtcttacg gaggctggtc cttggatctg 540		
cagatgcagg aggcagatat cagtggctat atccccaatg gagaatggga cctagtggga 600		
atccccggca agaggagtga aaggttctat gagtgtctga aagagcccta cccgatgtc 660		
accttcacag tgaccatgcg ccgcaggatg ggttactacc tgattcagat gtatatccc 720		
agcctgctca ttgtcatcct ctcatggatc tccttctgga tcaacatgga tgctgcacct 780		
gctcgtgtgg gcctaggcat caccactgtg ctcacatga ccaccagag ctccggctct 840		
gagatcatgc ccgcaacatc cgattcggtg ccattgatag cccaggccat tgacatttgg 900		
atggcagttt gcctgctctt tgtgttctca gccctattag aatatgctgc cgttaacttt 960		
gtgtctcggc aacataagga gctgtccga ttcaggagga agcggagaca tcacaagagc 1020		
cccatgttga atctattcca ggaggatgaa gctggagaag gccgctttaa cttctctgcc 1080		
tatgggatgg gcccagcctg tctacaggcc aaggatggca tctcagtcaa gggcgccaac 1140		
aacagtaaca ccaccaaccc cctcctgca ccattctaagt cccagagga gatgcgaaaa 1200		
ctcttcatcc agagggccaa gaagatcgac aaaatatccc gcattggctt ccccatggcc 1260		
ttcctcatct tcaacatgtt ctactggatc atctacaaga ttgtccgtag agaggacgtc 1320		
cacaaccagt ga 1332		
<210> 49		
<211> 443		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 嵌合LGIC的合成序列		

<400> 49

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

Leu Leu Phe Val Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe
 305 310 315 320
 Val Ser Arg Gln His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg
 325 330 335
 His His Lys Ser Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly
 340 345 350
 Glu Gly Arg Phe Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu
 355 360 365
 Gln Ala Lys Asp Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr
 370 375 380
 Thr Asn Pro Pro Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys
 385 390 395 400
 Leu Phe Ile Gln Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly
 405 410 415
 Phe Pro Met Ala Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr
 420 425 430
 Lys Ile Val Arg Arg Glu Asp Val His Asn Gln
 435 440

<210> 50

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 50

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

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

	420		425		430
Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg Arg Glu Asp Val					
	435		440		445
His Asn Gln					
	450				
<210> 51					
<211> 451					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 嵌合LGIC的合成序列					
<400> 51					
Met Leu Leu Trp Val Gln Gln Ala Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Thr					
1	5		10		15
Leu Leu Ala Gln Gly Glu Ala Arg Arg Ser Arg Asn Thr Thr Arg Pro					
	20		25		30
Ala Leu Leu Arg Leu Ser Asp Tyr Leu Leu Thr Asn Tyr Arg Lys Gly					
	35		40		45
Val Arg Pro Val Arg Asp Trp Arg Lys Pro Thr Thr Val Ser Ile Asp					
	50		55		60
Val Ile Val Tyr Ala Ile Leu Asn Val Asp Glu Lys Asn Gln Val Leu					
65	70		75		80
Thr Thr Tyr Ile Trp Tyr Arg Gln Tyr Trp Thr Asp Glu Phe Leu Gln					
	85		90		95
Trp Asn Pro Glu Asp Phe Asp Asn Ile Thr Lys Leu Ser Ile Pro Thr					
	100		105		110
Asp Ser Ile Trp Val Pro Asp Ile Leu Ile Asn Glu Phe Val Asp Val					
	115		120		125
Gly Lys Ser Pro Asn Ile Pro Tyr Val Tyr Ile Arg His Gln Gly Glu					
	130		135		140
Val Gln Asn Tyr Lys Pro Leu Gln Val Val Thr Ala Cys Ser Leu Asp					
145	150		155		160
Ile Tyr Asn Phe Pro Phe Asp Val Gln Asn Cys Ser Leu Thr Phe Thr					
	165		170		175
Ser Trp Leu His Thr Ile Gln Asp Ile Asn Ile Ser Leu Trp Arg Leu					
	180		185		190
Pro Glu Lys Val Lys Ser Asp Arg Ser Val Phe Met Asn Gln Gly Glu					
	195		200		205
Trp Glu Leu Leu Gly Val Leu Pro Tyr Phe Arg Glu Phe Ser Met Glu					

210	215	220
Ser Ser Asn Tyr Tyr Ala Glu Met Lys Phe Tyr Val His Leu Glu Arg		
225	230	235
Gln Met Gly Tyr Tyr Leu Ile Gln Met Tyr Ile Pro Ser Leu Leu Ile		240
	245	250
Val Ile Leu Ser Trp Ile Ser Phe Trp Ile Asn Met Asp Ala Ala Pro		255
	260	265
Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val Leu Thr Met Thr Thr Gln		270
	275	280
Ser Ser Gly Ser Arg Ala Ser Leu Pro Lys Val Ser Tyr Val Lys Ala		285
290	295	300
Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys Leu Leu Phe Val Phe Ser Ala Leu		
305	310	315
Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe Val Ser Arg Gln His Lys Glu Leu		320
	325	330
Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg His His Lys Ser Pro Met Leu Asn		335
	340	345
Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly Arg Phe Asn Phe Ser Ala		350
	355	360
Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala Lys Asp Gly Ile Ser Val		365
370	375	380
Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro Pro Ala Pro Ser		
385	390	395
Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln Arg Ala Lys Lys		400
	405	410
Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala Phe Leu Ile Phe		415
	420	425
Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg Arg Glu Asp Val		430
	435	440
His Asn Gln		445
450		
<210> 52		
<211> 455		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 嵌合LGIC的合成序列		
<400> 52		
Met Trp Gly Leu Ala Gly Gly Arg Leu Phe Gly Ile Phe Ser Ala Pro		

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

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

<210> 53

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GABAR1的C-末端氨基酸

<400> 53

Ile Asp Arg Leu Ser Arg Ile Ala Phe Pro Leu Leu Phe Gly Ile Phe
 1 5 10 15
 Asn Leu Val Tyr Trp Ala Thr Tyr Leu Asn Arg Glu Pro Gln Leu
 20 25 30

<210> 54

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人CHRNA7的氨基酸残基260-281

<400> 54

Glu Lys Ile Ser Leu Gly Ile Thr Val Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe
 1 5 10 15
 Met Leu Leu Val Ala Glu

20

<210> 55

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 55

Pro Ala Lys Ile Gly Leu Gly Ile Thr Val Leu Leu Ser Leu Thr Thr

1

5

10

15

Phe Met Ser Gly Val Ala Asn

20

<210> 56

<211> 1780

<212> DNA

<213> 智人

<400> 56

atgttgtcaa gtgtaatggc tcccctgtgg gcctgcatcc tgggtggctgc aggaattcta 60
 gccacagata cacatcatcc ccaggattct gctctgtatc atctcagcaa gcagctatta 120
 cagaaatata ataaagaagt gagacctgtt tacaactgga ccaaggccac cacagtctac 180
 ctggacctgt tcgtccatgc tatattggat gtggatgcag agaatcaaatt attaaagaca 240
 agtgtatggg accaagaggt ctggaatgat gaatttttat cctggaactc cagcatgttt 300
 gatgagatta gagagatctc cctacctcta agtgccatct gggcccccca tatcatcatc 360
 aatgagtttg tggacattga aagataccct gaccttccct atgtttatgt gaactcatct 420
 gggaccattg agaactataa gcccatccag gtgggtctctg cgtgcagttt agagacatat 480
 gcttttccat ttgatgtcca gaattgcagc ctgaccttca agagcattct gcatacagtg 540
 gaagacgtag acctggcctt tctgaggagc ccagaagaca ttcagcatga caaaaaggcg 600
 tttttgaatg acagtgagtg ggaacttcta tctgtgtcct ccacatacag catcctgcag 660
 agcagcgctg gaggatttgc acagattcag tttaatgtgg tgatgcgcag gcacccctg 720
 gtctatgtcg tgagtctgct gattcctagc atctttctca tgctgggtgga cctggggagc 780
 ttctacctgc cacccaactg ccgagccagg attgtgttca agaccagtgt gctgggtgggc 840
 tacaccgtct tcagggtcaa catgtccaac caggtgccac ggagtgtagg gagcaccct 900
 ctgattgggc acttcttcac catctgcatg gccttcttgg ttctcagctt agctaagtcc 960
 atcgtgttgg tcaaattcct ccatgatgag cagcgtgggtg gacaggagca gcccttcttg 1020
 tgccttcgag gggacaccga tgctgacagg cctagagtgg aaccagggc ccaacgtgct 1080
 gtggtaacag agtcctcgct gtatggagag cacctggccc agccaggaa cctgaaggaa 1140
 gtctggctgc agcttcaatc tatcagcaac tacctccaaa ctcaggacca gacagaccaa 1200
 caggaggcag agtggctggt cctcctgtcc cgctttgacc gactgctctt ccaaagctac 1260
 cttttcatgc tggggatcta caccatcact ctgtgctccc tctgggcact gtggggcggc 1320

gtgtgaagac tgaagtgttc ttcagtaatt gtgctggcac ttaggagaga gaggaggggg 1380
 aataatagtg ggftaaaaag ctttctgggt cgggtgtggt ggttcttgcc tatagtccca 1440
 gtgctttggg aggccatagc aggaggattg cttgagccca ggagttcgag accagccaga 1500
 gcaacatagt gagaccacat ctctaccagt aaataaataa ataaataaat aaataaataa 1560
 ataaataaat agctgggcat agtggctcat gcctgtactc tcagctactt gggaggttga 1620
 ggtgggagga ttgcttgagc ccaggatttc aaggctgcag tgagccatga ttgcaccact 1680
 gcaccccagc ctgggtgaca gagcaagacc ctgtctcaaa aaaaataaaa taaaaggctt 1740
 tctgccttca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1780

<210> 57

<211> 441

<212> PRT

<213> 智人

<400> 57

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

Leu	Leu	Ser	Val	Ser	Ser	Thr	Tyr	Ser	Ile	Leu	Gln	Ser	Ser	Ala	Gly
210						215					220				
Gly	Phe	Ala	Gln	Ile	Gln	Phe	Asn	Val	Val	Met	Arg	Arg	His	Pro	Leu
225					230					235					240
Val	Tyr	Val	Val	Ser	Leu	Leu	Ile	Pro	Ser	Ile	Phe	Leu	Met	Leu	Val
				245					250					255	
Asp	Leu	Gly	Ser	Phe	Tyr	Leu	Pro	Pro	Asn	Cys	Arg	Ala	Arg	Ile	Val
			260						265					270	
Phe	Lys	Thr	Ser	Val	Leu	Val	Gly	Tyr	Thr	Val	Phe	Arg	Val	Asn	Met
			275					280						285	
Ser	Asn	Gln	Val	Pro	Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Thr	Pro	Leu	Ile	Gly	His
			290				295							300	
Phe	Phe	Thr	Ile	Cys	Met	Ala	Phe	Leu	Val	Leu	Ser	Leu	Ala	Lys	Ser
305					310					315					320
Ile	Val	Leu	Val	Lys	Phe	Leu	His	Asp	Glu	Gln	Arg	Gly	Gly	Gln	Glu
				325					330					335	
Gln	Pro	Phe	Leu	Cys	Leu	Arg	Gly	Asp	Thr	Asp	Ala	Asp	Arg	Pro	Arg
			340					345						350	
Val	Glu	Pro	Arg	Ala	Gln	Arg	Ala	Val	Val	Thr	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr
			355					360						365	
Gly	Glu	His	Leu	Ala	Gln	Pro	Gly	Thr	Leu	Lys	Glu	Val	Trp	Ser	Gln
			370				375							380	
Leu	Gln	Ser	Ile	Ser	Asn	Tyr	Leu	Gln	Thr	Gln	Asp	Gln	Thr	Asp	Gln
385					390					395					400
Gln	Glu	Ala	Glu	Trp	Leu	Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Phe	Asp	Arg	Leu	Leu
				405					410					415	
Phe	Gln	Ser	Tyr	Leu	Phe	Met	Leu	Gly	Ile	Tyr	Thr	Ile	Thr	Leu	Cys
			420					425						430	
Ser	Leu	Trp	Ala	Leu	Trp	Gly	Gly	Val							
			435					440							
<210> 58															
<211> 439															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 嵌合LGIC的合成序列															
<400> 58															
Met	Arg	Cys	Ser	Pro	Gly	Gly	Val	Trp	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu
1				5					10					15	

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

	325		330		335
Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly Arg Phe					
	340		345		350
Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala Lys Asp					
	355		360		365
Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro					
	370		375		380
Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln					
385		390		395	400
Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala					
	405		410		415
Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg					
	420		425		430
Arg Glu Asp Val His Asn Gln					
	435				
<210> 59					
<211> 439					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 嵌合LGIC的合成序列					
<400> 59					
Met Arg Cys Ser Pro Gly Gly Val Trp Leu Ala Leu Ala Ala Ser Leu					
1	5		10		15
Leu His Val Ser Leu Gln Gly Glu Phe Gln Arg Lys Leu Tyr Lys Glu					
	20		25		30
Leu Val Lys Asn Tyr Asn Pro Leu Glu Arg Pro Val Ala Asn Asp Ser					
	35		40		45
Gln Pro Leu Thr Val Tyr Phe Ser Leu Ser Leu Leu Gln Ile Met Asp					
	50		55		60
Val Asp Glu Lys Asn Gln Val Leu Thr Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met					
65		70		75	80
Ser Trp Thr Asp His Tyr Leu Gln Trp Asn Val Ser Glu Tyr Pro Gly					
	85		90		95
Val Lys Thr Val Arg Phe Pro Asp Gly Gln Ile Trp Lys Pro Asp Ile					
	100		105		110
Leu Leu Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Arg Phe Asp Ala Thr Phe His Thr					
	115		120		125
Asn Val Ser Val Asn Ser Ser Gly His Cys Gln Tyr Leu Pro Pro Gly					

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

<210> 60

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 60

```

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

```

Asp Ala Ala Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val Leu Thr
 260 265 270
 Met Thr Thr Gln Ser Ser Gly Ser Arg Ala Ser Leu Pro Lys Val Ser
 275 280 285
 Tyr Val Lys Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys Leu Leu Phe Val
 290 295 300
 Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe Val Ser Arg Gln
 305 310 315 320
 His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg His His Lys Ser
 325 330 335
 Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly Arg Phe
 340 345 350
 Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala Lys Asp
 355 360 365
 Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro
 370 375 380
 Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln
 385 390 395 400
 Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala
 405 410 415
 Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg
 420 425 430
 Arg Glu Asp Val His Asn Gln
 435

<210> 61

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 61

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

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

370	375	380
Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln		
385	390	395
Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala		400
	405	410
Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg		415
	420	425
Arg Glu Asp Val His Asn Gln		430
435		
<210> 62		
<211> 439		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 嵌合LGIC的合成序列		
<400> 62		
Met Arg Cys Ser Pro Gly Gly Val Trp Leu Ala Leu Ala Ala Ser Leu		
1	5	10
Leu His Val Ser Leu Gln Gly Glu Phe Gln Arg Lys Leu Tyr Lys Glu		
	20	25
Leu Val Lys Asn Tyr Asn Pro Leu Glu Arg Pro Val Ala Asn Asp Ser		30
	35	40
Gln Pro Leu Thr Val Tyr Phe Ser Leu Ser Leu Leu Gln Ile Met Asp		45
	50	55
Val Asp Glu Lys Asn Gln Val Leu Thr Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met		60
65	70	75
Ser Trp Thr Asp His Tyr Leu Gln Trp Asn Val Ser Glu Tyr Pro Gly		80
	85	90
Val Lys Thr Val Arg Phe Pro Asp Gly Gln Ile Trp Lys Pro Asp Ile		95
	100	105
Leu Leu Asp Asn Ser Ala Asp Glu Arg Phe Asp Ala Thr Phe His Thr		110
	115	120
Asn Val Gln Val Asn Ser Ser Gly His Cys Gln Tyr Leu Pro Pro Gly		125
	130	135
Ile Phe Lys Ser Ser Cys Pro Met Asp Leu Lys Asn Phe Pro Met Asp		140
145	150	155
Val Gln Thr Cys Lys Leu Lys Phe Gly Ser Trp Ser Tyr Gly Gly Trp		160
	165	170
Ser Leu Asp Leu Gln Met Gln Glu Ala Asp Ile Ser Gly Tyr Ile Pro		175

180	185	190
Asn Gly Glu Trp Asp Leu Val Gly Ile Pro Gly Lys Arg Ser Glu Arg		
195	200	205
Phe Tyr Glu Cys Cys Lys Glu Pro Tyr Pro Asp Val Thr Phe Thr Val		
210	215	220
Thr Met Arg Arg Arg Met Gly Tyr Tyr Leu Ile Gln Met Tyr Ile Pro		
225	230	235
Ser Leu Leu Ile Val Ile Leu Ser Trp Ile Ser Phe Trp Ile Asn Met		
245	250	255
Asp Ala Ala Pro Ala Arg Val Gly Leu Gly Ile Thr Thr Val Leu Thr		
260	265	270
Met Thr Thr Gln Ser Ser Gly Ser Arg Ala Ser Leu Pro Lys Val Ser		
275	280	285
Tyr Val Lys Ala Ile Asp Ile Trp Met Ala Val Cys Leu Leu Phe Val		
290	295	300
Phe Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Val Asn Phe Val Ser Arg Gln		
305	310	315
His Lys Glu Leu Leu Arg Phe Arg Arg Lys Arg Arg His His Lys Ser		
325	330	335
Pro Met Leu Asn Leu Phe Gln Glu Asp Glu Ala Gly Glu Gly Arg Phe		
340	345	350
Asn Phe Ser Ala Tyr Gly Met Gly Pro Ala Cys Leu Gln Ala Lys Asp		
355	360	365
Gly Ile Ser Val Lys Gly Ala Asn Asn Ser Asn Thr Thr Asn Pro Pro		
370	375	380
Pro Ala Pro Ser Lys Ser Pro Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Ile Gln		
385	390	395
Arg Ala Lys Lys Ile Asp Lys Ile Ser Arg Ile Gly Phe Pro Met Ala		
405	410	415
Phe Leu Ile Phe Asn Met Phe Tyr Trp Ile Ile Tyr Lys Ile Val Arg		
420	425	430
Arg Glu Asp Val His Asn Gln		
435		

<210> 63

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合LGIC的合成序列

<400> 63

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

Phe	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Val	Asn	Phe	Val	Ser	Arg	Gln
305						310				315					320
His	Lys	Glu	Leu	Leu	Arg	Phe	Arg	Arg	Lys	Arg	Arg	His	His	Lys	Ser
					325					330					335
Pro	Met	Leu	Asn	Leu	Phe	Gln	Glu	Asp	Glu	Ala	Gly	Glu	Gly	Arg	Phe
					340					345					350
Asn	Phe	Ser	Ala	Tyr	Gly	Met	Gly	Pro	Ala	Cys	Leu	Gln	Ala	Lys	Asp
					355					360					365
Gly	Ile	Ser	Val	Lys	Gly	Ala	Asn	Asn	Ser	Asn	Thr	Thr	Asn	Pro	Pro
					370					375					380
Pro	Ala	Pro	Ser	Lys	Ser	Pro	Glu	Glu	Met	Arg	Lys	Leu	Phe	Ile	Gln
385						390				395					400
Arg	Ala	Lys	Lys	Ile	Asp	Lys	Ile	Ser	Arg	Ile	Gly	Phe	Pro	Met	Ala
					405					410					415
Phe	Leu	Ile	Phe	Asn	Met	Phe	Tyr	Trp	Ile	Ile	Tyr	Lys	Ile	Val	Arg
					420					425					430
Arg	Glu	Asp	Val	His	Asn	Gln									
					435										

经工程改造的受体的序列	50 nM abt	100 nM abt	300 nM abt	1 uM abt
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-11.96	-10.72	11.65	-3.06
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	11.09	-10.37	-4	4.05
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-3.19	7.58	-1.65	31.29
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	-11.83	-11.5	-8.01	-9.34
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	1.81	-2.61	-3.78	-2.6
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	-1.68	-2.25	-2.37	3.68

图1A

经工程改造的受体的序列	10 uM ach	100 uM ach	1 mM ach	3 mM ach
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-11.3	-27.53	2.84	14.65
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-12.24	-26.23	-1.16	2.97
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-12.91	-20.88	79.85	79.93
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	-0.46	-4.93	-11.18	-3.53
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	9.47	6.12	-1.56	17.57
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	15.45	13.77	27.42	53.62

图1B

经工程改造的受体的序列	100 nM apn	1 uM apn	30 uM apn
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	14.26	45.55	64.93
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	1.23	35.77	68.29
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	71.72	77.25	77.5
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	-18.17	-15.2	-14
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	-10.03	-3.33	6.96
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	-5.71	13.03	25.2

图1C

经工程改造的受体的序列	100 nM azd	300 nM azd	30 μ M azd
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-9.32	4.94	60.61
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-7.02	-0.48	70.16
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	51.44	77.13	79.26
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	-0.71	-1.73	47.39
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	12.15	30.92	68.65
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	24.49	45.34	71.21

图1D

经工程改造的受体的序列	1 nM brd	3 nM brd	10 nM brd	30 nM brd	100 nM brd	300 nM brd	1 uM brd
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-1.13	-3.83	-3.78		-2.03		1.68
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-1.24	0.25	-2.57	0.78	4.51	30.97	44.41
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	-9.78	-12.06	-9.02	-16.3	-7.44	-10.93	-4.55
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	0.92	-4.65	0.38	-8.96	12.18	-0.3	45.47
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	-1.52	-5.35	-3.49	-2.16	4.18	70.2	43.11

图1E

经工程改造的受体的序列	30 nM fac	100 nM fac	300 nM fac	10 μ M fac	30 μ M fac
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-23.44		2.75	69.71	61.44
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-21.36		4.17		65.94
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	24.15		80.17	81.34	73.9
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	38.08	14.37	19.41	67.33	79.67
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	41.32	59.51	74.85	78.53	84.45
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	45.76	63.92	73.43	80.1	84.31

图1F

乙酰胆碱剂量响应

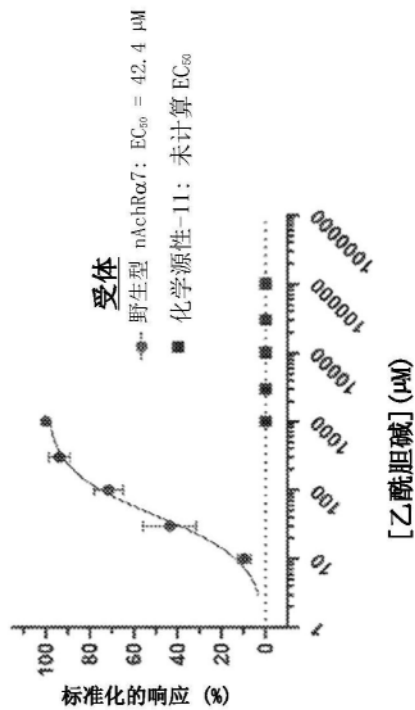


图2A

经工程改造的受体的序列	1 μM tc6	10 μM tc6	500 μM tc6
L131S_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-20.99	-27.62	-24.22
L131T_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-21.8	-27.08	-21.56
L131D_S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	-18.24	-23.06	-19.3
Y115D_S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	31.9	25.54	21.13
Y115D_L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	38.83	31.59	29.83
Y115D_L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	36.07	31.35	28.18

图1G

化学源性-11 (CR-11): Y115D+L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中

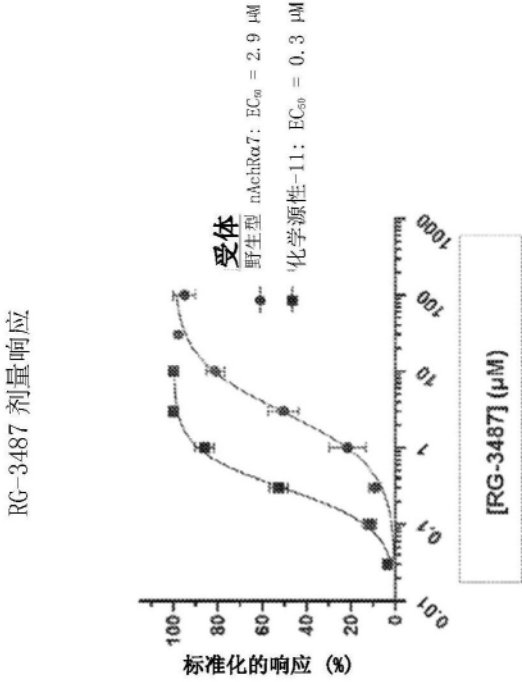


图2B

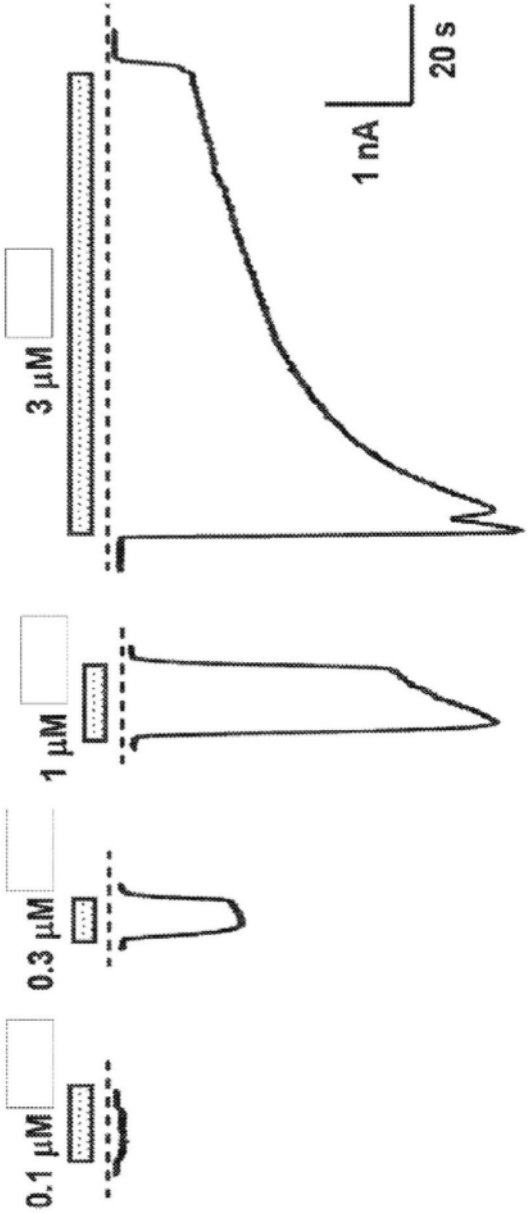


图3

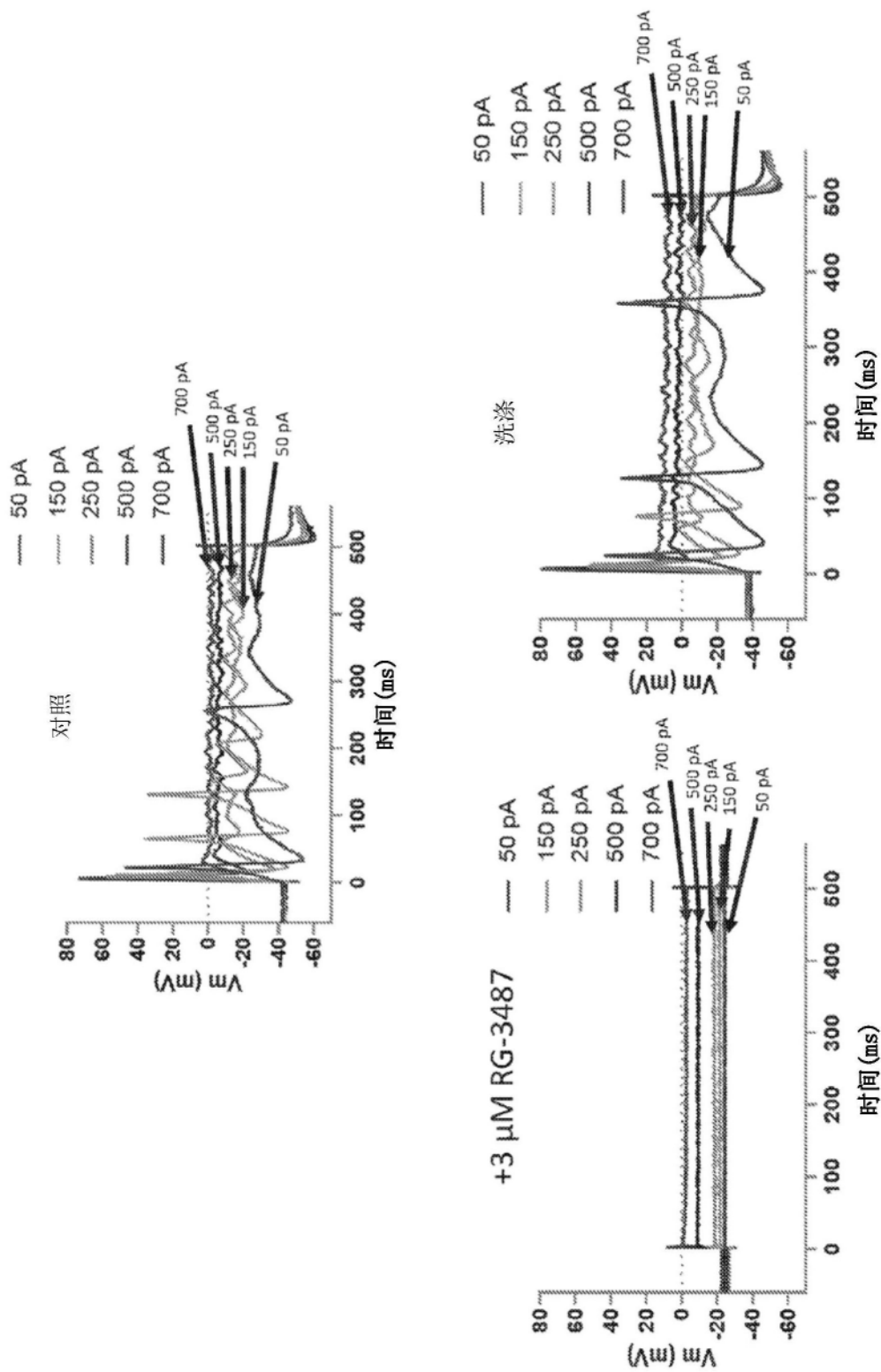


图4A

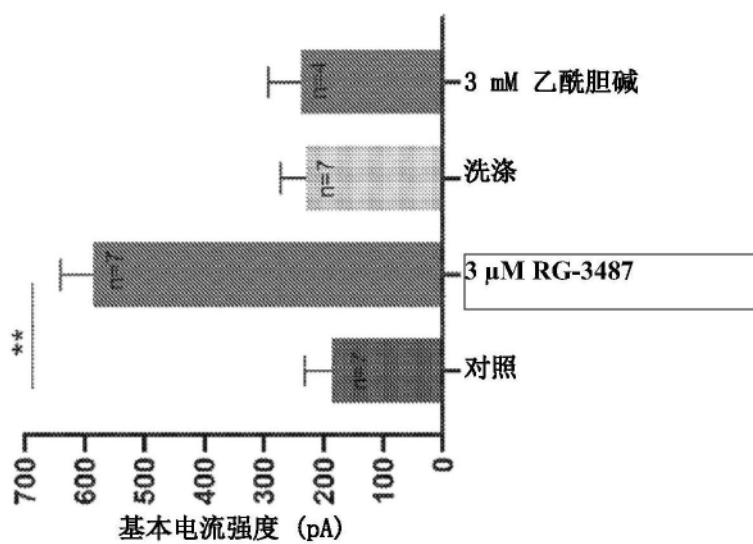


图4B

经工程改造的受体的序列	平均 HA 标签%	平均 HA MFI	N	标准化的 AB%	标准化的 AB MFI	N
L131S、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	33	0.77	2	0.48	0.83	4
L131T、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	92	0.93	1	0.32	0.75	4
L131D、S172D 在 SEQ ID NO: 33 中	58	0.82	1	0.45	0.88	4
Y115D、S170T 在 SEQ ID NO: 33 中	6	0.80	1	0.17	0.64	1
Y115D、L131Q 在 SEQ ID NO: 33 中	62	0.76	2	0.35	0.72	3
Y115D、L131E 在 SEQ ID NO: 33 中	87	0.92	1	0.73	0.90	1

图5