



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102422158 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201080020198. X

(22) 申请日 2010. 03. 12

(30) 优先权数据

61/160, 217 2009. 03. 13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 11. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/027244 2010. 03. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/105236 EN 2010. 09. 16

(73) 专利权人 阿勒根公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 J·王 朱宏 D·D·霍奇斯

E·费尔南德斯-萨拉斯

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

公司 11285

代理人 胡洪慧 张广育

(51) Int. Cl.

G01N 33/50(2006. 01)

C12Q 1/37(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 96/33273 A1, 1996. 10. 24,

CN 1187217 A, 1998. 07. 08,

CN 1122718 C, 2003. 10. 01,

WO 95/33850 A1, 1995. 12. 14,

US 2004/219619 A1, 2004. 11. 04,

JONES ET AL. Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins. 《JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS》. 2007, 第 329 卷 (第 1-2 期),

审查员 周露露

权利要求书2页 说明书136页

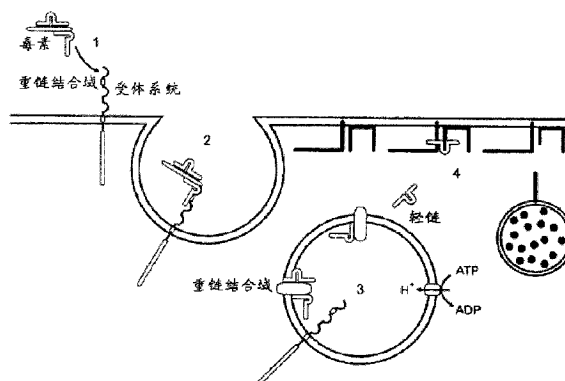
序列表64页 附图7页

(54) 发明名称

基于免疫的重靶向内肽酶活性测定

(57) 摘要

本说明书公开 SNAP-25 免疫响应诱导组合物; 制备 α -SNAP-25 抗体的方法, 所述 α -SNAP-25 抗体选择性结合包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的表位; α -SNAP-25 抗体, 所述 α -SNAP-25 抗体选择性结合包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的表位; 检测重靶向内肽酶活性的方法; 以及检测中和 α -重靶向内肽酶抗体的方法。



1. 一种检测重靶向内肽酶活性的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a. 用包含重靶向内肽酶的样本处理来自确立细胞系的细胞,其中所述来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感;
 - b. 从所述经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分,所述 SNAP-25 组分包含具有 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P1 残基的羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;
 - c. 使所述 SNAP-25 组分与连接到固相载体的 α -SNAP-25 抗体接触,
其中所述 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中包含所述 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P1 残基的羧基末端的表位;
 - d. 检测抗体-抗原复合物的存在,所述抗体-抗原复合物包含所述 α -SNAP-25 抗体和所述 SNAP-25 裂解产物;
其中通过所述抗体-抗原复合物的检测指示重靶向内肽酶活性;
其中所述 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中包含所述 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P1 残基的羧基末端的表位;
其中所述 α -SNAP-25 抗体具有由核酸序列 SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79 或 SEQ ID NO:81 编码的氨基酸序列的重链可变区;
并且其中所述 α -SNAP-25 抗体具有由核酸序列 SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:89 或 SEQ ID NO:91 编码的氨基酸序列的轻链可变区。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述 α -SNAP-25 抗体具有包含选自 SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80 和 SEQ ID NO:82 组成的组的氨基酸序列的重链可变区;和包含选自 SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:90 和 SEQ ID NO:92 组成的组的氨基酸序列的轻链可变区。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述 SNAP-25 裂解产物为 SNAP-25₁₉₇。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中使用夹心 ELISA 检测抗体-抗原复合物的存在。
5. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述 α -SNAP-25 抗体具有包含 SEQ ID NO:72 的氨基酸序列的重链可变区;和包含 SEQ ID NO:84 的氨基酸序列的轻链可变区。
6. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述 α -SNAP-25 抗体具有包含 SEQ ID NO:76 的氨基酸序列的重链可变区;和包含 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列的轻链可变区。
7. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述 α -SNAP-25 抗体具有包含 SEQ ID NO:78 的氨基酸序列的重链可变区;和包含 SEQ ID NO:90 的氨基酸序列的轻链可变区。
8. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述 α -SNAP-25 抗体具有包含 SEQ ID NO:80 或 SEQ ID NO:82 的氨基酸序列的重链可变区;和包含 SEQ ID NO:92 的氨基酸序列的轻链可变区。
9. 一种结合 SNAP-25 裂解产物中包含 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P1 残基的羧基末端的表位的 α -SNAP-25 抗体;
其中所述 α -SNAP-25 抗体具有由核酸序列 SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79 或 SEQ ID NO:81 编码的氨基酸序列的重链可变区;
并且其中所述 α -SNAP-25 抗体具有由核酸序列 SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:89 或 SEQ ID NO:91 编码的氨基酸序列的轻链可变区。

10. 根据权利要求 9 所述的抗体,其中所述 α -SNAP-25 抗体具有包含选自 SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80 和 SEQ ID NO:82 组成的组的氨基酸序列的重链可变区 ;和包含选自 SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:90 和 SEQ ID NO:92 组成的组的氨基酸序列的轻链可变区。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的抗体,其中所述 SNAP-25 裂解产物为 SNAP-25₁₉₇。

12. 根据权利要求 9 或 10 所述的抗体,其中所述 α -SNAP-25 抗体具有包含 SEQ ID NO:72 的氨基酸序列的重链可变区 ;和包含 SEQ ID NO:84 的氨基酸序列的轻链可变区。

13. 根据权利要求 9 或 10 所述的抗体,其中所述 α -SNAP-25 抗体具有包含 SEQ ID NO:76 的氨基酸序列的重链可变区 ;和包含 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列的轻链可变区。

14. 根据权利要求 9 或 10 所述的抗体,其中所述 α -SNAP-25 抗体具有包含 SEQ ID NO:78 的氨基酸序列的重链可变区 ;和包含 SEQ ID NO:90 的氨基酸序列的轻链可变区。

15. 根据权利要求 9 或 10 所述的抗体,其中所述 α -SNAP-25 抗体具有包含 SEQ ID NO:80 或 SEQ ID NO:82 的氨基酸序列的重链可变区 ;和包含 SEQ ID NO:92 的氨基酸序列的轻链可变区。

基于免疫的重靶向内肽酶活性测定

[0001] 本专利申请依照美国法典第 35 篇第 119 条 (e) 款要求 2009 年 3 月 13 日提交的美国临时专利申请第 61/160,217 号的优先权,该申请的全部内容据此以引用的方式并入本文。

[0002] 本说明书中公开的序列包含在序列表中,其与本说明书一起呈递,其全部内容据此以引用的方式并入本文。

[0003] 梭菌毒素(例如,肉毒杆菌神经毒素(Botulinum neurotoxin, BoNT), BoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F 和 BoNT/G;以及破伤风神经毒素(Tetanus neurotoxin, TeNT))抑制神经信号传递的能力被使用在很多治疗和美容应用中,参见例如 William J. Lipham, *Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin*(Slack, Inc., 2004)。可以药物组合物形式商购的梭菌毒素包括 BoNT/A 制剂,例如 BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA)、DYSPORT® /RELOXIN® (Ipsen Ltd., Slough, England)、PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA)、XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Germany)、NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, South Korea)、BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China);和 BoNT/B 制剂,例如 MYOBLOC® /NEUROBLOC® (Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA)。例如, BOTOX® 目前在一个或多个国家被批准用于以下适应症:弛缓不能、成人痉挛、肛裂、背痛、眼睑痉挛、夜间磨牙、颈肌张力障碍、原发性震颤、眉间纹或面部动力性皱纹、头痛、面肌痉挛、膀胱机能亢进、多汗症、小儿脑性瘫痪、多发性硬化症、肌阵挛性病症、鼻唇线、痉挛性发音障碍、斜视和颜面神经病症(VII nerve disorder)。

[0004] 梭菌毒素治疗法通过中断用于将神经递质和神经肽分泌到突触间隙中的胞吐过程来抑制神经递质和神经肽的释放。医药工业迫切需要扩展除了当前的肌松药应用以外梭菌毒素疗法的其它用途,以治疗感觉神经疾病,例如各种类型的慢性疼痛、神经源性炎症和泌尿生殖器病症,以及其它病症,例如胰腺炎。当前用于扩展基于梭菌毒素的疗法的一种方法涉及修饰梭菌毒素,以使经过修饰的毒素对相关神经元或非神经元细胞具有改变的细胞靶向能力。这些称为重靶向内肽酶或靶向囊泡胞吐调节蛋白(Targeted Vesicular Exocytosis Modulator Protein, TVEMP)的分子通过使用存在于相关神经元或非神经元靶细胞上的靶受体来实现其胞吐抑制作用。该重靶向的能力通过用对存在于相关神经元或非神经元靶细胞中的非梭菌毒素受体显示选择性结合活性的靶向域替代梭菌毒素的天然结合域来实现。该对结合域的修饰产生能够选择性结合靶细胞上存在的非梭菌毒素受体的分子。重靶向内肽酶可结合靶受体,转位到细胞质中,并对相关神经元或非神经元靶细胞的 SNARE 复合物发挥其蛋白水解作用。

[0005] 一组重靶向内肽酶包含具有阿片靶向域的分子。这些阿片重靶向内肽酶包含阿片靶向域、梭菌毒素转位域和梭菌毒素酶域。阿片重靶向内肽酶或阿片-TVEMP 的非限制性实例描述于以下专利文献中:例如 Keith A. Foster 等, *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, 美国专利 5,989,545; J. Oliver Dolly 等, *Activatable Recombinant Neurotoxins*, 美国专利 7,132,259;

Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, 美国专利 7,244,437 ;Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, 美国专利 7,413,742 ;Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, 美国专利 7,415,338 ;Lance E. Steward 等, Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, 美国专利 7,514,088 ;Keith A. Foster, Fusion Proteins, 美国专利公开 2008/0064092 ;Keith A. Foster, Fusion Proteins, 美国专利公开 2009/0035822 ;Lance E. Steward 等, Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, 美国专利公开 2009/0048431 ;Keith A. Foster, Non-Cytotoxic Protein Conjugates, 美国专利公开 2009/0162341 ;Keith A. Foster 等, Re-targeted Toxin Conjugates, 国际专利公开 WO 2005/023309 ;和 Lance E. Steward, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells, 国际专利申请 WO 2008/008805 ;各专利的全部内容据此以引用的方式并入本文。

[0006] 重靶向内肽酶与梭菌毒素之间的一个主要差异是, 由于重靶向内肽酶通常不靶向运动神经元, 故如果过量服用不能完全避免, 将在很大程度上使与哺乳动物过量服用重靶向内肽酶有关的死亡减到最少。例如, 以治疗有效剂量的 10,000 倍的量施用阿片重靶向内肽酶时, 才能观察到致死的迹象, 并且该致死迹象是由分子的被动扩散而非中毒过程引起。因此, 出于所有实用的目的, 重靶向内肽酶是非致死性分子。尽管该非致死特性具有重要的治疗意义, 但因为用于制造基于梭菌毒素的生物制剂的标准活性测定是小鼠 LD₅₀ 生物测定 (一种致死试验), 所以会引起制造方面的问题。S. S. Arnon 等, JAMA 285 : 1059-1070 (2001)。目前, 所有医药制造商都使用小鼠 LD₅₀ 生物测定来表示其梭菌毒素制剂的效力。事实上, 梭菌毒素的活性单位是小鼠 LD₅₀ 单位。然而, 由于重靶向内肽酶基本上无致死性, 故无法使用小鼠 LD₅₀ 生物测定来评估这些分子的效力。因此, 一种可以评估重靶向内肽酶摄取过程中所有必要步骤的完整性的简单、可靠、经过验证且政府机构可接受的活性测定将具有重要价值。

[0007] 本说明书提供用于测定适用于多种工业 (例如制药工业和食品工业) 的重靶向内肽酶的活性的新型组合物、细胞和方法, 并且还提供相关益处。这些组合物、细胞和方法不使用活体动物或从活体动物上获取的组织, 但能评估重靶向内肽酶起作用必需的所有步骤。

附图说明

[0008] 图 1 示出中枢和外周神经元中神经递质释放和梭菌毒素中毒的范例的现行示意图。图 1A 示出中枢和外周神经元中神经递质释放机制的示意图。释放过程可描述为包括两个步骤: 1) 囊泡停靠, 其中含有神经递质分子的囊泡的囊泡结合 SNARE 蛋白与位于质膜处的膜结合 SNARE 蛋白缔合; 和 2) 神经递质释放, 其中囊泡与质膜融合, 并且神经递质分子被胞吐。图 1B 示出中枢和外周神经元中破伤风毒素和肉毒毒素活性的中毒机制的示意图。该中毒过程可描述为包括四个步骤: 1) 受体结合, 其中梭菌毒素结合梭菌受体复合物, 并开始中毒过程; 2) 复合物内化, 其中在毒素结合之后, 含有毒素 / 受体系统复合物的囊泡通过胞吞作用进入细胞中; 3) 轻链转位, 其中认为发生了多个事件, 包括囊泡内部 pH 值改变、

形成包含梭菌毒素重链 H_N 域的通道孔、梭菌毒素的轻链与重链分离和轻链释放；以及 4) 酶促靶修饰，其中梭菌毒素的轻链通过蛋白水解裂解其靶 SNARE 底物，例如 SNAP-25、VAMP 或突触融合蛋白 (Syntaxin)，由此阻止囊泡停靠和神经递质释放。

[0009] 图 2 示出对过表达 ORL-1 的 ORL-1 克隆 #6 无性细胞系中重靶向内肽酶 Noc/A 的全剂量响应。Noc/A 的特异性摄取可在过表达 ORL-1 的 ORL-1 克隆 #6 无性细胞系中观察到。在裂解的 SNAP-25₁₉₇ 的 ECL ELISA 中，利用 Noc/A (LHN/A 加结合配体痛敏肽 (nociceptin) 变体) 和 LH_N/A (LC/A 和不含任何结合域的 H_N) 对 ORL-1 稳定细胞系克隆 #6 进行的处理证实：Noc/A 摄取对该无性细胞系是特异的。该无性细胞系也对 Noc/A 显示出较强敏感性，其中 EC₅₀ 为 1.2 nM。

[0010] 图 3 示出对 SK-N-DZ 单细胞源性克隆 #3 和 #22 中的 Noc/A 的全剂量响应。与 LH_N/A 相比较，SK-N-DZ 克隆 #3 和 #22 特异性摄取 Noc/A (n = 4 个独立进行的实验)。在 RPMI SFM+N2+B27+NGF 中将细胞接种到聚 D-赖氨酸 96 孔板上。用配混物处理 22 小时。裂解的 SNAP-25₁₉₇ 的 ECL ELISA 证实 Noc/A 摄取对该无性细胞系是特异的。这些无性细胞系还对 Noc/A 显示出较强敏感性，其中克隆 #3 的 EC₅₀ 为 0.3 nM，而克隆 #22 的 EC₅₀ 为 0.9 nM。

[0011] 图 4 示出用重靶向内肽酶 Noc/A 处理的 ORL1 ND7 克隆 1C11、4B7 和 4C9 得到的 ECL 夹心 ELISA 测定结果。用 Noc/A 处理亲本 ND7 和 ORL1 ND7 克隆 24 小时，随后孵育 2 天。由于亲本 ND7 仅达到约 50% SNAP-25₁₉₇ 裂解，故无法计算出其 EC₅₀ 值。克隆 4B7 和 1C11 中有超过 80% SNAP-25₁₉₇ 裂解。计算得到三个克隆的 EC₅₀ 值分别为 5.7 ± 0.5 、 6.7 ± 1 和 8.6 ± 2 nM。

[0012] 图 5 示出抗痛敏肽多克隆抗体可阻止 SK-N-DZ 克隆 #3、克隆 #22 和 AGN P33 ORL-1 克隆 #6 细胞系中重靶向内肽酶 Noc/A 的摄取。在 RPMI SFM+N2+B27+NGF 中将细胞接种到聚 D-赖氨酸 96 孔板上，并在含有抗痛敏肽多克隆抗体的无血清培养基中处理 22 小时，这些抗痛敏肽多克隆抗体在 1 nM Noc/A 稀释达到不同浓度 (0-3 μ g/mL)。

[0013] 图 6 示出如蛋白印迹 (Western blot) 图像所描述的用浓度为 0.017 nM 到 1 μ M 的重靶向内肽酶 Dyn/A 处理来自 SiMa 克隆 AF4 和确立细胞系 PC-12 的细胞。这两种细胞系都观察到剂量依赖性摄取。

[0014] 图 7 示出 7.8 nM 抗体 2E2A6、1D3B8、3C1A5 和 2C9B10 以及市售 MC-6050 和 MC-6053 的归一化 BIAcore SPR 曲线。图 7A 示出每种抗体的缔合速率 (on-rate) 的归一化数据。图 7B 示出每种抗体的解离速率 (off-rate) 的归一化数据。

[0015] 详细描述

[0016] 本说明书提供用于确定样本中活性重靶向内肽酶的存在与否以及用于确定重靶向内肽酶的活性/效力的新型测定法。本说明书中公开的基于细胞的新型测定法取决于使本测定法能够检测样本中纳摩尔量的重靶向内肽酶的细胞、试剂和检测方法。本说明书中公开的基于细胞的测定法用于分析重靶向内肽酶的多种功能，即，重靶向内肽酶与细胞表面受体的结合、内肽酶-受体复合物的内化、酶域向细胞质中的转位、底物的酶域裂解。如下文的进一步论述，这些新型方法和组合物可用于分析粗制样本和大块样本以及高度纯化的双链重靶向内肽酶和配制的重靶向内肽酶产物，而且还可按照自动高通量测定形式来测定。

[0017] 因此，本说明书中公开的一方面提供用于产生 α -SNAP-25 抗体的免疫响应诱导

组合物,这些 α -SNAP-25 抗体可选择性结合包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物的表位。免疫响应诱导组合物可包含佐剂以及免疫响应诱导组合物,该免疫响应诱导组合物包括 SNAP-25 抗原、连接到 SNAP-25 抗原的载体、或与连接到 SNAP-25 抗原的柔性间隔子连接的载体,其中柔性连接子插入 SNAP-25 抗原与载体之间。预期引发免疫响应从而产生可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的任何和所有 SNAP-25 抗原可用作 SNAP-25 抗原,包括但不限于,源自天然 SNAP-25 的 SNAP-25 抗原、源自非天然 SNAP-25 的 SNAP-25 抗原以及包含 SNAP-25 (即,来自天然 SNAP-25 或非天然 SNAP-25 的 SNAP-25) 的免疫响应性片段的 SNAP-25 抗原。适用于产生可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的 SNAP-25 抗原包括但不限于,包含具有连接到载体肽的羧基化 C-末端谷氨酰胺的 SNAP-25 肽的 SNAP-25 抗原,包括但不限于 SEQ ID NO:38。适用于制备可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的其它免疫响应诱导组合物包括但不限于,包含与连接到 SNAP-25 抗原羧基化 C-末端谷氨酰胺的柔性连接子连接的载体的免疫响应诱导组合物,其中柔性连接子插入 SNAP-25 抗原与载体之间。预期任任何和所有佐剂均可适用于此类免疫响应诱导组合物中,包括但不限于,聚乙二醇 (PEG)、单甲氧基聚乙二醇 (mPEG)、聚乙烯醇 (PVA)、完全和不完全弗氏佐剂 (Freund's adjuvant)。

[0018] 本说明书中公开的另一方面提供用于产生 α -SNAP-25 抗体的方法,这种 α -SNAP-25 抗体可选择性结合包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物的表位。该方法的方面包括以下步骤:(a) 对动物施用本说明书中公开的 SNAP-25 免疫响应诱导组合物;(b) 从动物收集含有 α -SNAP-25 抗体或 α -SNAP-25 抗体产生细胞的样本;和 (c) 从样本中分离出 α -SNAP-25 抗体。所公开的方法适用于制备可选择性结合包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物的表位的 α -SNAP-25 单克隆抗体,或可选择性结合包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物的表位的 α -SNAP-25 多克隆抗体。

[0019] 本说明书中公开的另一方面提供 α -SNAP-25 抗体,其可选择性结合包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的表位。此类 α -SNAP-25 抗体包括天然抗体和非天然抗体,以及单克隆 α -SNAP-25 抗体或多克隆 α -SNAP-25 抗体。适用作选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的 α -SNAP-25 抗体的单克隆 α -SNAP-25 抗体包括但不限于,由杂交瘤细胞系 1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5 和 3C3E2 产生的单克隆 α -SNAP-25 抗体。

[0020] 本说明书中公开的另一方面提供用于检测重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法。该方法的方面包括以下步骤:(a) 用包含重靶向内肽酶的样本处理来自确立细胞系的细胞,其中来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感;(b) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分,所述组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;(c) 使 SNAP-25 组分与本说明书中公开的 α -SNAP-25 抗体接触;和 (d) 检测抗体-抗原复合物的存在,所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;其中抗体-抗原复合物的检测将指示重靶向内肽酶活性。步骤 (c) 中的 α -SNAP-25 抗体可任选

连接到固相载体。

[0021] 本说明书中公开的又一方面提供用于检测阿片-TVEMP 活性的基于免疫的方法。该方法的方面包括以下步骤：(a) 用包含重靶向内肽酶的样本处理来自确立细胞系的细胞，其中来自确立细胞系的细胞可摄取重靶向内肽酶；(b) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分，所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25；(c) 使 SNAP-25 组分与本说明书中公开的 α -SNAP-25 抗体接触；和 (d) 检测抗体-抗原复合物的存在，所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25；其中抗体-抗原复合物的检测将指示重靶向内肽酶活性。步骤 (c) 中的 α -SNAP-25 抗体可任选连接到固相载体。

[0022] 本说明书中公开的另一方面提供用于测定哺乳动物体内的重靶向内肽酶免疫抗性的方法。该方法的方面包括以下步骤：(a) 将重靶向内肽酶加入从哺乳动物获得的用于测试 α -重靶向内肽酶中和抗体的存在与否的测试样本中；(b) 用测试样本处理来自确立细胞系的细胞，其中来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶活性敏感；(c) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分，所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物；(d) 使 SNAP-25 组分与本说明书中公开的 α -SNAP-25 抗体接触；(e) 检测抗体-抗原复合物的存在，所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物；(f) 用阴性对照样本代替测试样本，重复步骤 a-e；和 (g) 将步骤 (e) 中检测到的抗体-抗原复合物的量与步骤 (f) 中检测到的抗体-抗原复合物的量相比较，其中如果检测出步骤 (e) 中检测到的抗体-抗原复合物的量少于步骤 (f) 中检测到的抗体-抗原复合物的量，就指示存在 α -重靶向内肽酶中和抗体。步骤 (d) 中的 α -SNAP-25 抗体可任选连接到固相载体。步骤 (f) 中的对照样本除包括阴性对照样本外，还可包括阳性对照样本。

[0023] 由肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、巴氏梭菌 (*Clostridium baratii*) 和丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) 产生的梭菌毒素被广泛用于人类和其它哺乳动物的治疗和美容中。肉毒梭菌菌株产生 7 种抗原性不同的肉毒毒素 (BoNT) 血清型，这些血清型是通过研究肉毒中毒在人类 (BoNT/A、BoNT/B、BoNT/E 和 BoNT/F)、动物 (BoNT/C1 和 BoNT/D) 中的发作而鉴别的，或是从土壤 (BoNT/G) 中分离得到。尽管所有七种肉毒毒素血清型具有类似的结构和生物特性，但其各自也呈现异质特征，例如不同的药理学特性。相比之下，破伤风毒素 (TeNT) 是由均一的破伤风梭菌组产生。其它两种梭菌属，即巴氏梭菌和丁酸梭菌，也分别产生类似于 BoNT/F 和 BoNT/E 的毒素。

[0024] 每种梭菌毒素被翻译为约 150kDa 的单链多肽，该单链多肽的二硫环随后被天然蛋白酶（例如内源性梭菌毒素蛋白酶或环境中产生的天然蛋白酶）通过蛋白水解切割作用而裂解。这种翻译后加工产生双链分子，其包含约 50kDa 轻链 (LC) 和约 100kDa 重链 (HC)，二者通过单个二硫键和非共价相互作用结合在一起。每个成熟的双链分子包含三个功能上不同的域：1) 酶域，位于包括金属蛋白酶区的 LC 中，该金属蛋白酶区含有特异性靶向神经递质释放器官的核心部分的锌依赖性内肽酶活性；2) 转位域，包含在 HC(H_N) 的氨基末端半部分之内，其促进细胞内囊泡将 LC 释放到靶细胞的细胞质中；和 3) 结合域，发现于 HC(H_C) 的羧基末端半部分之内，其决定梭菌毒素与位于靶细胞表面的受体复合物的结合活性和结合特异性。

[0025] 这三个功能域的结合、转位和酶活性均是产生毒性所必需的。虽然该过程的所有细节尚未精确获知,但梭菌毒素进入神经元并抑制神经递质释放的整个细胞中毒机制都是相似的,而不管是何种血清型或亚型。虽然申请人不希望受以下描述的限制,但是中毒机制可描述为包括至少 4 个步骤:1) 受体结合、2) 复合物内化、3) 轻链转位,和 4) 酶促靶修饰(图 1)。当梭菌毒素的 HC 域结合位于靶细胞质膜表面上的毒素特异性受体系统时,开始该过程。受体复合物的结合特异性被认为是部分地通过似乎明显包含各梭菌毒素受体复合物的神经节苷脂与蛋白受体的特定组合来实现。一旦结合,毒素/受体复合物就通过胞吞作用内化,且内化的囊泡被归类为特定细胞内途径。转位步骤看起来是由囊泡隔室的酸化所引发。该过程似乎会开始重要的 pH 依赖性结构重排,从而使疏水性增加、促进孔形成、并促使毒素重链与轻链分离。一旦重链与轻链分离,毒素的轻链内肽酶就会从胞内囊泡释放到细胞溶质中,在细胞溶质中,其似乎会特异性靶向神经递质释放器官的核心部分。这些核心蛋白,即囊泡相关膜蛋白(VAMP)/小突触囊泡蛋白、25kDa 的突触体相关蛋白(SNAP-25)和突触融合蛋白,对于突触囊泡在神经末梢停靠和融合必需的,并构成可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体(SNARE)家族的成员。BoNT/A 和 BoNT/E 裂解 SNAP-25 的羧基末端区,分别释放出具有 9 个或 26 个氨基酸的片段,且 BoNT/C1 也在羧基末端附近裂解 SNAP-25,释放出含 8 个氨基酸的片段。肉毒血清型 BoNT/B、BoNT/D、BoNT/F 和 BoNT/G 以及破伤风毒素作用于 VAMP 的保守中心部分,并将 VAMP 的氨基末端部分释放到细胞溶质中。BoNT/C1 在细胞质膜表面附近的单位点处裂解突触融合蛋白。突触 SNARE 的选择性蛋白水解将导致封闭体内由梭菌毒素引起的神经递质释放。梭菌毒素的 SNARE 蛋白质靶是多种非神经元类型中发生胞吐作用所共有的;在这些细胞中,如在神经元中,轻链肽酶活性将抑制胞吐作用,参见例如 Yann Humeau 等,How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release,82(5)Biochimie.427-446(2000);Kathryn Turton 等,Botulinum and Tetanus Neurotoxins;Structure,Function and Therapeutic Utility,27(11)Trends Biochem. Sci.552-558.(2002);Giovanna Lalli 等,The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons,11(9)Trends Microbiol.431-437,(2003)。

[0026] 重靶向内肽酶一般用外源性蛋白酶裂解位点取代天然双链环蛋白酶裂解位点。参见例如,Dolly, J.O. 等,Activatable Clostridial Toxins,美国专利 7,419,676,该专利以引用的方式并入本文。尽管重靶向内肽酶的总分子量因靶向性部分的大小而不同,但活化过程和其依赖于在外源性裂解位点裂解来产生双链分子方面与梭菌毒素基本上是相同的。参见例如,Steward, L.E. 等,Activatable Clostridial Toxins,美国专利公布 2009/0005313;Steward, L.E. 等,Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells,美国专利申请 11/776,075;Steward, L.E. 等,Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity for Clostridial Toxin Target Cells,美国专利公布 2008/0241881,各专利以引用的方式并入本文。

[0027] 本公开的方面部分包括用于产生 α -SNAP-25 抗体的免疫响应诱导组合物,所述 α -SNAP-25 抗体可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的

SNAP-25。本文中使用的术语“免疫响应诱导组合物”是指包含 SNAP-25 抗原的组合物,当将其施用于动物时,将刺激对 SNAP-25 抗原的免疫响应,由此产生可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体。术语“免疫响应”是指动物的免疫系统对免疫响应诱导组合物的任何响应。示例性免疫响应包括但不限于:细胞以及局部和全身性体液免疫,例如 CTL 响应,包括 CD8+CTL 的抗原特异性诱导响应、辅助性 T 细胞响应(包括 T 细胞增殖响应和细胞因子释放)和 B 细胞响应(包括例如产生抗体的响应)。术语“诱导免疫响应”是指施用免疫响应诱导组合物或编码免疫响应诱导组合物的多核苷酸,在此过程中,免疫响应受到影响,即被刺激、引发或诱导。

[0028] SNAP-25 免疫响应诱导组合物包含 SNAP-25 抗原。本文中使用的术语“抗原”是指引发免疫响应的分子,并且包括但不限于肽、多糖以及例如脂蛋白和糖脂等脂质的缀合物。本文中使用的术语“SNAP-25 抗原”是指在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的任何抗原,其可引发免疫响应。免疫响应诱导组合物中所用的 SNAP-25 抗原须大到足以具有显著独特的序列,由此降低产生与除 SNAP-25 外的抗原发生交叉反应的抗体的可能性。此外,免疫响应诱导组合物中所用的 SNAP-25 抗原还必须小到足以只引发大致上针对在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的免疫响应,由此增加产生可区别在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 与在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处没有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体的可能性。而且,还迫切需要产生具有单一氨基酸序列的 α -SNAP-25 抗体,这些抗体具有良好的产率,可再现选择性并以可接受的亲和力结合,由此允许设计出高灵敏度的测定法。

[0029] 出现在 SNAP-25 中的 BoNT/A 裂解位点周围的序列表示为 P₅-P₄-P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅',其中 P₁-P₁'表示易分裂键。在重靶向内肽酶裂解后,由此产生的裂解产物包含包括 P₅-P₄-P₃-P₂-P₁ 序列的片段和包括 P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅'的片段。因此,本文中使用的术语“在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25”是指具有作为其羧基末端氨基酸的 P₁ 残基的任何 SNAP-25。例如,人 SNAP-25 (SEQ ID NO:5) 中的 Q₁₉₇-R₁₉₈ 代表 BoNT/A 裂解位点的 P₁-P₁'易分裂键。因此,“具有 BoNT/A 裂解位点易分裂键的羧基末端谷氨酰胺的 SNAP-25”就是在其羧基末端氨基酸具有谷氨酰胺的任何 SNAP-25 裂解产物,其中谷氨酰胺代表易分裂键中的 Q₁₉₇。再例如,石纹电鳐 (*Torpedo marmorata*) SNAP-25 (SEQ ID NO:16) 中的 K₂₀₄-H₂₀₅ 代表 BoNT/A 裂解位点的 P₁-P₁'易分裂键。因此,“具有 BoNT/A 裂解位点易分裂键的羧基末端赖氨酸的 SNAP-25”就是在其羧基末端氨基酸具有赖氨酸的任何 SNAP-25 裂解产物,其中赖氨酸代表易分裂键中的 K₂₀₄。

[0030] 在 BoNT/A 裂解位点中 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原经过修饰,可增强未结合修饰的 SNAP-25 抗原、半抗原或任何其它免疫原性、非免疫原性或弱免疫原性的抗原性化合物的免疫原性。在该实施方案的一方面,可羧基化来自 SNAP-25 抗原的易分裂键的羧基末端 P₁ 残基。羧基化将从两个方面增加 SNAP-25 抗原的所需免疫原性。第一,由于带电氨基酸可增强免疫原性,故将 COO⁻基团加入羧基末端残基将增加 SNAP-25 抗原的整体免疫原性。第二,由于 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基在裂解时处于带电状态,故将 COO⁻基团加入羧基末端残基将更好地模拟本说明书中公开的 α -SNAP-25 抗体被设计来选择性结合的实际抗原。

[0031] 在该实施方案的一方面,可通过加入适于连接 SNAP-25 抗原与载体蛋白的氨基酸

来修饰 SNAP-25 抗原的氨基末端残基,该载体蛋白为例如匙孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemacyanin, KLH)、卵清蛋白 (ovalbumin, OVA)、甲状腺球蛋白 (thyroglobulin, THY)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、大豆胰蛋白酶抑制剂 (soybean trypsin inhibitor, STI) 或多连接肽 (multiple attachment peptide, MAP)。例如,半胱氨酸残基可位于氨基末端,以便缀合载体蛋白 KLH。

[0032] 因此,在一个实施方案中,在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的长度可以是例如至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 11 个、至少 12 个、至少 13 个、至少 14 个、至少 15 个、至少 16 个、至少 17 个、至少 18 个、至少 19 个、至少 20 个、至少 25 个或至少 30 个氨基酸。在另一实施方案中,在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的长度可以是例如最多 5 个、最多 6 个、最多 7 个、最多 8 个、最多 9 个、最多 10 个、最多 11 个、最多 12 个、最多 13 个、最多 14 个、最多 15 个、最多 16 个、最多 17 个、最多 18 个、最多 19 个、最多 20 个、最多 25 个或最多 30 个氨基酸。在又一实施方案中,在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的氨基酸数量可以例如介于 7 到 12 个之间、介于 10 到 15 个之间或介于 13 到 18 个之间。

[0033] 在另一实施方案中,在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO :33。在该实施方案的方面,在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38 或 SEQ ID NO :39。在另一实施方案中,在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO :40。

[0034] 在又一实施方案中,在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO :41。在该实施方案的方面,在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45、SEQ ID NO :46。在另一实施方案中,在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO :47。

[0035] 预期引发免疫响应,从而产生可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体的任何和所有 SNAP-25 抗原都可用作 SNAP-25 抗原。因此,包含 SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45 或 SEQ ID NO :46 的氨基酸序列变体可用作 SNAP-25 抗原,以引发免疫响应,从而产生可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体。由此,在一个实施方案中,SNAP-25 抗原可通过至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个或至少 5 个氨基酸的取代、缺失或添加而取代成包含 SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45 或 SEQ ID NO :46 的 SNAP-25 抗原。在另一实施方案中,SNAP-25 抗原与包含 SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45 或 SEQ ID NO :46 的 SNAP-25 抗原可具有至

少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的氨基酸同一性。

[0036] 预期一个或多个载体可连接到 SNAP-25 抗原,以便增强未结合载体的免疫原性、非免疫原性或弱免疫原性 SNAP-25 抗原的免疫原性。非限制性实例包括例如匙孔血蓝蛋白 (KLH)、卵清蛋白 (OVA)、甲状腺球蛋白 (THY)、牛血清白蛋白 (BSA)、大豆胰蛋白酶抑制剂 (STI) 或多连接肽 (MAP)。如本领域中众所周知的,通过将抗原与载体偶联,可使非抗原性或弱抗原性抗原具有抗原性。用于将抗原与载体偶联的各种其它载体和方法是本领域中众所周知的。参见例如,Harlow 和 Lane,同上文,1998a;Harlow 和 Lane,同上文,1998b;以及 David W. Waggoner, Jr. 等, Immunogenicity-enhancing carriers and compositions thereof and methods of using the same,美国专利公布第 20040057958 号(2004 年 3 月 25 日)。也可通过将表位表达成融合蛋白来产生表位。本领域的技术人员熟知用于表达多肽融合物的方法,如例如以下文献中所述:Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology(增刊 47), John Wiley & Sons, New York(1999)。由于 SNAP-25 抗原的羧基末端必须是 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基,故载体须连接到 SNAP-25 抗原的氨基末端。

[0037] 预期一个或多个柔性间隔子可连接到 SNAP-25 抗原,以便增强未结合柔性连接子的免疫原性、非免疫原性或弱免疫原性 SNAP-25 抗原的免疫原性。柔性间隔子可增加 SNAP-25 抗原的总体肽长度,并提供柔性,从而有助于将 SNAP-25 抗原适当地呈递到免疫细胞。如非限制性实例, SNAP-25 免疫响应诱导组合物可包含与一个或多个柔性间隔子串联连接的 SNAP-25 抗原,以更好地将 SNAP-25 抗原呈递到免疫细胞,由此促进免疫响应。

[0038] 包含肽的柔性间隔子的长度为至少一个氨基酸,并且包含带有小侧链 R 基团的不带电氨基酸,例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或丝氨酸。因此,在一个实施方案中,柔性间隔子的长度可以是例如至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个或至少 10 个氨基酸。在另一实施方案中,柔性间隔子的长度可以是例如至少 1 个、最多 2 个、最多 3 个、最多 4 个、最多 5 个、最多 6 个、最多 7 个、最多 8 个、最多 9 个或最多 10 个氨基酸。在另一实施方案中,柔性间隔子的氨基酸数量可例如介于 1 到 3 个之间、介于 2 到 4 个之间、介于 3 到 5 个之间、介于 4 到 6 个之间或介于 5 到 7 个之间。柔性间隔子的非限制性实例包括例如 G 间隔子,例如 GGG、GGGG (SEQ ID NO :57) 和 GGGGS (SEQ ID NO :58);或 A 间隔子,例如 AAA、AAAA (SEQ ID NO :59) 和 AAAAV (SEQ ID NO :60)。柔性间隔子框内连接到 SNAP-25 抗原,成为融合蛋白。

[0039] 如上文所论述,使用柔性间隔子将部分增加 SNAP-25 抗原的总体肽长度。举例来说,具有 5 到 10 个氨基酸的 SNAP-25 抗原可通过将具有 3 到 5 个氨基酸的柔性间隔子连接至 SNAP-25 抗原的氨基末端来增加其总长度。再例如,具有 5 到 10 个氨基酸的 SNAP-25 抗原可通过将具有 4 到 6 个氨基酸的柔性间隔子连接至 SNAP-25 抗原的氨基末端来增加其总长度。再例如,具有 5 到 10 个氨基酸的 SNAP-25 抗原可通过将具有 7 到 10 个氨基酸的柔性间隔子连接至 SNAP-25 抗原的氨基末端来增加其总长度。再例如,具有 7 到 12 个氨基酸的 SNAP-25 抗原可通过将具有 1 到 3 个氨基酸的柔性间隔子连接至 SNAP-25 抗原的氨基末端来增加其总长度。再例如,具有 7 到 12 个氨基酸的 SNAP-25 抗原可通过将具有 4 到 6 个氨基酸的柔性间隔子连接至 SNAP-25 抗原的氨基末端来增加其总长度。利用柔性间隔子增加长度将允许选择尺寸较小的 SNAP-25 抗原,进而增加使 SNAP-25 抗原只 引发大致上针对在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的免疫响应的可能性,由

此增加了产生可区别在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 与在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处没有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体的可能性。

[0040] 预期本说明书中公开的 SNAP-25 免疫响应诱导组合物可任选包含本说明书中公开的 SNAP-25 抗原以及一种或多种佐剂。当结合 SNAP-25 免疫响应诱导组合物使用时,本文中使用的术语“佐剂”是指使针对 SNAP-25 抗原的免疫响应增加或多样化的任何物质或物质混合物。免疫响应诱导佐剂可例如用于减少保护性免疫所需的免疫次数或抗原量。在免疫响应诱导组合物中使用免疫响应诱导佐剂是众所周知的。使用这些佐剂的主要目的是使免疫响应增强。非限制性佐剂包括例如脂质体、油相,包括但不限于,弗氏佐剂,例如弗氏完全佐剂(FCA);弗氏不完全佐剂(FIA);皂苷元糖苷(sapogenin glycoside),例如皂苷;聚羧乙烯(carbopol);N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺(常称为胞壁酰二肽或“MDP”);以及脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。这样的佐剂一般是以与水相形成的乳液的形式使用,或者更常见的是,其可由不溶于水的无机盐组成。这些无机盐可由例如氢氧化铝、硫酸锌、胶状氢氧化铁、磷酸钙或氯化钙组成。氢氧化铝(Al(OH)₃)是一种常用佐剂。目前,FDA 批准用于人类的唯一佐剂是铝盐(Alum),其可通过使抗原沉淀来“储积”抗原。上文提供的佐剂只是示例性的。事实上,任何免疫响应诱导佐剂都可用于本说明书中公开的免疫响应诱导组合物中,只要这种佐剂能满足诱导免疫响应所需要的特征。

[0041] 本说明书中公开的载体也可充当佐剂。特定佐剂以及其制备和使用方法描述于例如以下文献中:Gupta 等, Vaccine, 11:993-306, 1993; Arnon, R. (编辑) Synthetic Vaccines 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987; 和 David W. Waggoner, Jr. 等, Immunogenicity-Enhancing Carriers and Compositions Thereof and Methods of Using the Same, 美国专利公布第 20040057958 号(2004 年 3 月 25 日)。其它佐剂包括 Plenum Press(New York) 出版的 Pharmaceutical Biotechnology 的“Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach”(Powell, M. F. 和 Newman, M. J. 编辑), 第 6 卷, 第 7 章(第 141-227 页)中所述的任何化合物。这本书中的实例包括胞壁酰二肽(MDP) 和 Montanide 720。如聚肌苷:胞嘧啶(Poly I:C) 或含有 CpG 基元的质粒 DNA 等分子也可作为佐剂与抗原一起封装在微粒中施用。在另一实例中,佐剂是有助于使抗原性化合物进入细胞的细胞质中的试剂,例如李斯特菌素(listeriolysin)、链球菌溶血素(streptolysin) 或其混合物。

[0042] 因此,在一个实施方案中,SNAP-25 免疫响应诱导组合物包含具有连接到载体肽的羧基化羧基末端谷氨酰胺的 SNAP-25 抗原。在该实施方案的方面,具有羧基化羧基末端谷氨酰胺的 SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38 或 SEQ ID NO:39。在该实施方案的另一方面,SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO:40。在该实施方案的方面,载体肽是匙孔血蓝蛋白(KLH)、卵清蛋白(OVA)、甲状腺球蛋白(THY)、牛血清白蛋白(BSA)、大豆胰蛋白酶抑制剂(STI) 或多连接肽(MAP)。

[0043] 在另一实施方案中,SNAP-25 免疫响应诱导组合物包含具有连接到载体肽的羧基化羧基末端赖氨酸的 SNAP-25 抗原。在该实施方案的方面,具有羧基化羧基末端赖氨酸的 SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID

NO:45 或 SEQ ID NO:46。在该实施方案的另一方案, SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO:47。在该实施方案的方面, 载体肽是匙孔血蓝蛋白 (KLH)、卵清蛋白 (OVA)、甲状腺球蛋白 (THY)、牛血清白蛋白 (BSA)、大豆胰蛋白酶抑制剂 (STI) 或多连接肽 (MAP)。

[0044] 在另一实施方案中, SNAP-25 免疫响应诱导组合物包含具有连接到一个或多个柔性连接子和载体肽的羧基化 C 末端谷氨酰胺的 SNAP-25 抗原, 其中柔性连接子插入 SNAP-25 抗原与载体肽之间。在该实施方案的方面, 具有羧基化羧基末端谷氨酰胺的 SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38 或 SEQ ID NO:39。在另一实施方案中, SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO:46。在该实施方案的方面, 载体肽是匙孔血蓝蛋白 (KLH)、卵清蛋白 (OVA)、甲状腺球蛋白 (THY)、牛血清白蛋白 (BSA)、大豆胰蛋白酶抑制剂 (STI) 或多连接肽 (MAP)。在该实施方案的方面, 柔性连接子是 G- 间隔子或 A- 间隔子。

[0045] 在又一实施方案中, SNAP-25 免疫响应诱导组合物包含具有连接到柔性连接子和载体肽的羧基化 C 末端赖氨酸的 SNAP-25 抗原, 其中柔性连接子插入 SNAP-25 抗原与载体肽之间。在该实施方案的方面, 具有羧基化羧基末端赖氨酸的 SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45 或 SEQ ID NO:46。在该实施方案的另一方案, SNAP-25 抗原包含 SEQ ID NO:47。在该实施方案的方面, 载体肽是匙孔血蓝蛋白 (KLH)、卵清蛋白 (OVA)、甲状腺球蛋白 (THY)、牛血清白蛋白 (BSA)、大豆胰蛋白酶抑制剂 (STI) 或多连接肽 (MAP)。在该实施方案的方面, 柔性连接子是 G- 间隔子或 A- 间隔子。

[0046] 本公开的方面部分包括用于产生可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体的方法。可利用本领域中众所周知的多种方法来产生选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体。本领域中已知用于制备和使用抗体以及检测和测量抗体结合特异性、结合亲和力和结合亲和力的特定方案。参见例如, ANTIBODIES:A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, 编辑, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版, 1998a); 和 USING ANTIBODIES:A LABORATORY MANUAL:PORTABLE PROTOCOL No. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001; 以及 Current Protocols in Molecular Biology, 2004; David Anderson 等, Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use, 美国专利 7,034,132 (2005 年 4 月 25 日); 和 Beatriz M. Carreno 等, Antibodies Against CTLA4, 美国专利 7,034,121 (2006 年 4 月 25 日)。

[0047] 在非限制性实例中, 可通过对动物 (例如兔、山羊、小鼠或其它哺乳动物) 注射本说明书中公开的免疫响应诱导组合物的一种或多种注射剂, 来产生选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 多克隆抗体。在另一非限制性实例中, 可通过对卵 (例如鸡蛋) 注射本说明书中公开的免疫响应诱导组合物的一种或多种注射剂, 来产生选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 多克隆抗体。可利用标准技术 (例如使用固定抗原的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 或基于细胞的活性测定法) 随时间监测免疫动物体内的抗体滴度。必要时, 可从哺乳动物体内 (例如血液) 分离出选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂

键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的多克隆抗体,并利用众所周知的技术(例如用于获得 IgG 部分的蛋白质 A 亲和色谱法,或对于产生抗体的肽的亲和纯化法)进行进一步纯化。

[0048] 在另一非限制性实例中,可以使用杂交瘤方法产生选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 单克隆抗体。参见例如,第 6 章 Monoclonal Antibodies,第 196-244 页,Harlow 和 Lane,同上文,1998a;和第 7 章 Growing Hybridomas,第 245-282 页,Harlow 和 Lane,同上文,1998a;和 Goding,第 59-103 页,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press,(1986)。在该方法中,通常将宿主动物(例如小鼠、仓鼠或另一适合的宿主动物)暴露于本说明书中公开的 SNAP-25 抗原的一种或一种以上注射剂下,以引出产生或能够产生 α -SNAP-25 抗体的淋巴细胞,所述 α -SNAP-25 抗体将特异性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25。可利用标准技术(例如使用固定抗原的酶联免疫吸附测定(ELISA)或基于细胞的活性测定法)随时间监测免疫动物体内的抗体滴度。或者,可以在体外使用适合的细胞培养系使淋巴细胞免疫。在免疫后一段合适时间的时候,例如当抗体滴度达到最大时,从动物体内分离出产生抗体的细胞。一般说来,如果需要人类来源的细胞,则使用外周血淋巴细胞;而如果需要非人类哺乳动物来源的细胞,则使用脾细胞或淋巴结细胞。使用适合的融合剂(例如聚乙二醇)将分离出的产生抗体的细胞与永生细胞系融合,以形成杂交瘤细胞。永生化细胞系通常是经过转化的哺乳动物细胞,尤其是啮齿动物、牛和人类来源的骨髓瘤细胞。通常,将鼠类骨髓瘤细胞系与从经过适当免疫的小鼠收获的脾细胞融合,以产生杂交瘤。优选永生细胞系为对含有次黄嘌呤(hypoxanthine)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸苷(thymidine)(HAT)的培养基敏感的小鼠骨髓瘤细胞系。根据标准技术,多种骨髓瘤细胞系中的任一种都可用作融合配偶体,例如 P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653 或 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞系。然后使用 HAT 培养基选择通过融合得到的杂交瘤细胞,这种培养基会杀死未融合和无效融合的骨髓瘤细胞(未融合的脾细胞在孵育数天后死亡,因为其没有经过转化)。然后可测定杂交瘤细胞所生长的培养基中选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 单克隆抗体的存在。例如,在免疫沉淀测定、体外结合测定(例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))或基于细胞的活性测定中,可以使用 α -SNAP-25 阳性培养基来筛选杂交瘤上清液。这些技术和测定是本领域中已知的。参见例如,第 11 章,Immunoprecipitation,第 421-470 页,Harlow 和 Lane,同上文,1998a;第 12 章,Immunoblotting,第 471-510 页,Harlow 与 Lane,同上文,1998a;第 14 章,Immunoassays,第 553-612 页,Harlow 和 Lane,同上文,1998a。然后可以进行其它研究来确定这种抗体是否也对在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处没有羧基末端的 SNAP-25 不具反应性。 α -SNAP-25 单克隆抗体的结合亲和力也可例如通过 Scatchard 分析法(Scatchard analysis)来确定。参见例如,Peter J. Munson 和 David Rodbard,Ligand:A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand-Binding Systems,107(1)Anal. Biochem. 220-239(1980)。在鉴别出所需杂交瘤细胞后,使用限制性稀释程序分离来源于单个细胞的克隆,直到获得表达所需单克隆抗体的无性细胞系。选择对在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 具有足够选择性且结合亲和力足够高的那些抗体进行进一步表征和研究。

[0049] 用于制备选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 单克隆抗体的另一替代性方法是用 SNAP-25 肽筛选重组组合免疫球蛋白文库（例如抗体噬菌体展示文库），并分离免疫球蛋白文库中结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的成员。用于产生和筛选噬菌体展示文库的试剂盒可以商购获得，例如重组噬菌体抗体系统 (Recombinant Phage Antibody System) (Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ)；和 SurfZAP™ 噬菌体展示试剂盒 (Stratagene, La Jolla, CA)。此外，适用于产生和筛选抗体展示文库的方法和试剂的实例可见于例如 Ladner 等，美国专利 5,223,409；Borrebaeck 等，美国专利 5,712,089；Griffiths 等，美国专利 5,885,793；Griffiths 等，美国专利 5,962,255；McCafferty 等，美国专利 5,969,108；Griffiths 等，美国专利 6,010,884；Jespersen 等，美国专利 6,017,732；Borrebaeck 等，美国专利 6,027,930；Johnson 等，美国专利 6,140,471；McCafferty 等，美国专利 6,172,197，各专利的全部内容据此以引用的方式并入本文。

[0050] 本公开的方面部分包括收集含有 α -SNAP-25 抗体或产生 α -SNAP-25 抗体的细胞的样本。本文中使用的术语“含有 α -SNAP-25 抗体或产生 α -SNAP-25 抗体的细胞的样本”是指含有或可能含有至少一种选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的任何生物物质。预期本方法中可以使用可含有选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的任何和所有样本，包括但不限于，血液、血浆、血清和淋巴液。还预期本方法中可以使用能够产生选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的任何细胞，包括但不限于，CD8 细胞、CTL 细胞、辅助性 T 细胞和 B 细胞。多种众所周知的方法可用于从个体收集含有 α -SNAP-25 抗体或产生 α -SNAP-25 抗体的细胞的样本，参见例如，Harlow 和 Lane，同上文，1998a；以及 Harlow 和 Lane，同上文，1998b。类似地，也可以使用多种众所周知的方法处理样本，以分离出选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体。可以根据欲分离的抗体的类型选择用于收集样本的程序。在非限制性实例中，当分离选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 多克隆抗体时，适合的样本可以是含有此类 α -SNAP-25 抗体的血液样本，而当分离选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 单克隆抗体时，适合的样本可以是产生 α -SNAP-25 抗体的细胞，例如脾细胞或杂交瘤。

[0051] 本公开的方面部分包括从样本中分离出选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体。本领域中的技术人员众所周知用于分离此类 α -SNAP-25 抗体的方法，这些抗体例如为选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 多克隆抗体或选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 单克隆抗体。参见例如，Harlow 和 Lane，同上文，1998a；以及 Harlow 和 Lane，同上文，1998b。例如，可以利用众所周知的技术（例如使用蛋白质 A 或蛋白质 G 的亲亲和色谱法（该方法主要提供免疫血清中的 IgG 部分））从样本中分离出此类 α -SNAP-25 多克隆抗体。随后或可选地，可将特定 SNAP-25 抗原固定于柱或磁珠上，以通过免疫亲和层法纯化选择性结合在 BoNT/A

裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 多克隆抗体。可通过例如蛋白质 A-琼脂糖凝胶 (Sepharese) 法、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳法、透析法或亲和色谱法等常规免疫球蛋白纯化程序将选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 单克隆抗体从培养基或腹水液中分离。

[0052] 因此,在一个实施方案中,用于产生可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体的方法包括以下步骤:(a) 对动物施用 SNAP-25 免疫响应诱导组合物,这种组合物包含具有连接到载体肽的羧基化 C 末端谷氨酰胺的 SNAP-25 抗原;(b) 从动物收集含有 α -SNAP-25 抗体或产生 α -SNAP-25 抗体的细胞的样本;以及 (c) 从样本中分离出 α -SNAP-25 抗体组分。在该实施方案的一方面,可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体为多克隆抗体。在该实施方案的另一方面,可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体为单克隆抗体。在该实施方案的又一方面,产生的可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 单克隆抗体为 IgG 亚型。在该实施方案的其它方面,SNAP-25 免疫响应诱导组合物还包含佐剂,例如聚乙二醇 (PEG)、单甲氧基聚乙二醇 (mPEG) 或聚乙烯醇 (PVA)。

[0053] 在另一实施方案中,用于产生可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体的方法包括以下步骤:(a) 对动物施用 SNAP-25 免疫响应诱导组合物,这种组合物包含具有连接到柔性连接子和载体肽的羧基化 C 末端谷氨酰胺的 SNAP-25 肽,其中柔性连接子插入 SNAP-25 肽与载体肽之间;(b) 从动物收集含有 α -SNAP-25 抗体或产生 α -SNAP-25 抗体的细胞的样本;以及 (c) 从样本中分离出 α -SNAP-25 抗体。在该实施方案的一方面,可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体为多克隆抗体。在该实施方案的另一方面,可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体为单克隆抗体。在该实施方案的又一方面,产生的可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 单克隆抗体为 IgG 亚型。在该实施方案的其它方面,SNAP-25 免疫响应诱导组合物还包含佐剂,例如聚乙二醇 (PEG)、单甲氧基聚乙二醇 (mPEG) 或聚乙烯醇 (PVA)。

[0054] 本公开发明的方面部分包括分离的 α -SNAP-25 抗体,所述分离的 α -SNAP-25 抗体选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位。本文中使用的术语“抗体”是指免疫系统对特定抗原起反应而产生的特异性结合该抗原的分子,且其包括天然抗体和非天然抗体。本文中使用的术语“分离的”是指利用人类的介入使分子脱离其天然环境。例如,抗体可以为多克隆抗体、单克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双功能抗体、缔合细胞的抗体(如 Ig 受体)、线性抗体、微型双功能抗体(diabody)或微抗体,只要片段呈现所需的生物活性,还可以是这些抗体的单链衍生物。抗体可以是包含 V_H 域和 V_L 域以及轻链恒定域(C_L)和重链恒定域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 的全长免疫球蛋白分子,或全长免疫球蛋白分子的免疫活性片段,例如 Fab 片段、 $F(ab')_2$ 片段、Fc 片段、Fd 片段、Fv 片段。抗体可源自于任何脊椎动物物种(例如,人类、山羊、马、驴、鼠类、大鼠、兔或鸡),且可以属于任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD 和 IgA)、类别(例

如, IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM) 或亚类 (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)。有关天然抗体、非天然抗体和其抗原性化合物结合片段的结构的总的公开内容, 参见例如, Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编辑, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 第 2 版 (Oxford University Press 1995), 各文献的全部内容据此以引用的方式并入本文。

[0055] 天然抗体常常是约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白, 由两个相同的轻 (L) 链和两个相同的重 (H) 链构成。每一轻链都借助一个共价二硫键连接到一个重链, 但不同免疫球蛋白同种型的重链中二硫键的数量不同。每一重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫键。每一重链的一端具有一个可变域 (V_H), 随后是多个恒定域。每一轻链的一端具有一个可变域 (V_L), 且在其另一端具有一个恒定域。轻链的恒定域与重链的第一个恒定域对准, 且轻链可变域与重链可变域对准。据悉, 特定的氨基酸残基形成了轻链可变域与重链可变域之间的界面。

[0056] 完整的抗原识别和抗原结合位点包含在抗体可变域内, 即 Fv 片段。该片段包括由一个重链可变域 (V_H) 与一个轻链可变域 (V_L) 紧密、非共价缔合形成的二聚体。每一域包含由三个高变区连接的四个框架区 (framework region, FR), 主要采用 β 折叠构型, 三个高变区形成环连接, 且在一些情况下形成 β 折叠结构的一部分。每一高变区包含对应于互补决定区 (complementarity determining region, CDR) 的氨基酸序列。总的说来, 6 个 CDR 区的三维构型界定了 V_H - V_L 二聚体表面上的抗原结合位点, 从而赋予抗原结合特异性。参见例如, Cyrus Chothia, 等, *Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions*, *Nature* 342 (6252): 877-883 (1989); Elvin A. Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), 各文献的全部内容以引用的方式并入本文。抗体的恒定域不直接参与抗体与抗原的结合, 但呈现各种效应功能, 例如抗体参与抗体依赖性细胞毒性过程。

[0057] 靶抗原一般具有一个或多个结合位点, 又称表位, 可由 CDR 形成的抗原结合位点识别。本文中使用的“表位”与“抗原决定簇”同义, 意思指例如肽、多糖或含脂质分子等靶抗原上能够特异性结合免疫球蛋白或 T 细胞受体, 或者以其它方式与分子相互作用的位点。特异性结合不同表位的每一抗体具有不同结构。因此, 一个抗原可具有一种以上的对应抗体。

[0058] 多克隆抗体是指含有至少两种能够结合特定抗原的抗体的异质抗体分子群。根据定义, 多克隆抗体包括结合至少两个不同表位的两种不同的抗体。本文中使用的术语“单克隆抗体”是指只含有一种能够结合特定抗原的抗体的大致上均一的抗体分子群, 即, 包含所述群体的个体抗体除可能少量存在的天然突变外其余都相同。根据定义, 单克隆抗体结合单一表位。单克隆抗体针对单一抗原位点具有高度特异性。此外, 相比多克隆抗体, 每一单克隆抗体都针对抗原上的单一决定簇。除特异性外, 单克隆抗体的优势还在于, 其合成不会受到其它抗体的污染。修饰语“单克隆的”表示从大致上均一的抗体群获得的抗体的性质, 且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如, 根据本公开使用的单克隆抗体可通过杂交瘤方法 (最先由 Kohler 等 (1975) 在 *Nature* 256:495 中描述) 制备; 或者可通过重组 DNA 方法 (参见例如, 美国专利第 4,816,567 号; 美国专利第 5,807,715 号) 制备。还

可以使用例如 Clackson 等 (1991) Nature, 352 :624-628 和 Marks 等 (1991) J. Mol. Biol., 222 :581-597 中所描述的技术从噬菌体抗体文库中分离单克隆抗体。

[0059] 因此,在一个实施方案中, α -SNAP-25 抗体包含重链可变域 (V_H) 和轻链可变域 (V_L),其选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25。在该实施方案的一方面,重链可变域 (V_H) 为 SEQ ID NO :72、SEQ ID NO :74、SEQ ID NO :76、SEQ ID NO :80、SEQ ID NO :82 或 SEQ ID NO :133。在该实施方案的另一方面,轻链可变域 (V_L) 为 SEQ ID NO :84、SEQ ID NO :86、SEQ ID NO :88、SEQ ID NO :90 或 SEQ ID NO :92。

[0060] 在另一实施方案中,核酸序列编码包含重链可变域 (V_H) 和轻链可变域 (V_L) 且选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体。在该实施方案的一方面,重链可变域 (V_H) 由核酸序列 SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :73、SEQ ID NO :75、SEQ ID NO :77、SEQ ID NO :79、SEQ ID NO :81 或 SEQ ID NO :132 编码。在该实施方案的另一方面,重链可变域 (V_H) 由与 SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :73、SEQ ID NO :75、SEQ ID NO :77、SEQ ID NO :79、SEQ ID NO :81 或 SEQ ID NO :132 具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的同一性的核酸序列编码。在该实施方案的另一方面,轻链可变域 (V_L) 由 SEQ ID NO :83、SEQ ID NO :85、SEQ ID NO :87、SEQ ID NO :89 或 SEQ ID NO :91 编码。在该实施方案的又一方面,轻链可变域 (V_L) 由与 SEQ ID NO :83、SEQ ID NO :85、SEQ ID NO :87、SEQ ID NO :89 或 SEQ ID NO :91 具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的同一性的核酸序列编码。

[0061] 在另一实施方案中, α -SNAP-25 抗体包含重链可变域 (V_H) 的 CDR1 区、CDR2 区、CDR3 区或其任何组合,该抗体选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25。在该实施方案的一方面,重链可变域 (V_H) 的 CDR1 区为 SEQ ID NO :93、SEQ ID NO :94、SEQ ID NO :95、SEQ ID NO :118、SEQ ID NO :119 或 SEQ ID NO :120。在该实施方案的另一方面,重链可变域 (V_H) 的 CDR2 区为 SEQ ID NO :96、SEQ ID NO :97、SEQ ID NO :98、SEQ ID NO :99、SEQ ID NO :121、SEQ ID NO :122 或 SEQ ID NO :123。在该实施方案的又一方面,重链可变域 (V_H) 的 CDR3 区为 SEQ ID NO :100、SEQ ID NO :101、SEQ ID NO :102、SEQ ID NO :124、SEQ ID NO :134 或 SEQ ID NO :135。

[0062] 在另一实施方案中, α -SNAP-25 抗体包含轻链可变域 (V_L) 的 CDR1 区、CDR2 区、CDR3 区或其任何组合,该抗体选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25。在该实施方案的一方面,轻链可变域 (V_L) 的 CDR1 区为 SEQ ID NO :103、SEQ ID NO :104、SEQ ID NO :105、SEQ ID NO :106、SEQ ID NO :107、SEQ ID NO :125、SEQ ID NO :126、SEQ ID NO :127、SEQ ID NO :128 或 SEQ ID NO :129。在该实施方案的另一方面,轻链可变域 (V_L) 的 CDR2 区为 SEQ ID NO :108、SEQ ID NO :109、SEQ ID NO :110、SEQ ID NO :111 或 SEQ ID NO :112。在该实施方案的又一方面,轻链可变域 (V_L) 的 CDR3 区为 SEQ ID NO :113、SEQ ID NO :114、SEQ ID NO :115、SEQ ID NO :116 或 SEQ ID NO :117。

[0063] 在另一实施方案中, α -SNAP-25 抗体特异性结合表位,该表位包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25。在该实施方案的一方面,表位包含 SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36 或 SEQ ID NO :37。在该实施方案的一方面,表位包含 SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :41、SEQ ID

NO:42、SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:44。

[0064] 如上文所述,存在于 SNAP-25 中的 BoNT/A 裂解位点周围的序列表示为 $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$,其中 P_1-P_1' 表示易分裂键。在 BoNT/A 裂解后,由此产生的裂解产物包含包括 $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$ 序列的片段和包括 $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$ 的片段。本文中使用的术语“选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体”是指选择性结合包含 $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$ 序列的任何 SNAP-25 裂解产物片段,但不结合包含 $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$ 序列的任何 SNAP-25 裂解产物片段或具有完整 BoNT/A 裂解位点的 P_1-P_1' 易分裂键的任何 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体。本文中使用的术语“ α -SNAP-25₁₉₇ 抗体”是指选择性结合羧基末端 P_1 残基对应于 SEQ ID NO:5 中的谷氨酰胺 197 的 SNAP-25 的抗体。本文中使用的术语“ α -SNAP-25₂₀₄ 抗体”是指选择性结合羧基末端 P_1 残基对应于 SEQ ID NO:16 中的赖氨酸 204 的 SNAP-25 的抗体。

[0065] 本文中使用的术语“选择性”是指具有独特作用或影响,或者只按一种方式或只与一种物质反应。当用于抗体时,本文中使用的术语“选择性结合”是指抗体与指定靶表位有差别地结合,以致抗体大致上不与非靶表位交叉反应。本文中定义的肽表位的最小尺寸为约 5 个氨基酸,且肽表位通常包含至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 15 个或至少 20 个氨基酸。肽表位可以是非连续的,即,其包含的氨基酸残基在肽的一级结构中不相邻,但借助于肽的二级结构、三级结构或四级结构连在一起成为表位。此外,还应注意,表位可能包含除氨基酸序列外的分子的一部分,例如碳水化合物部分、如脂蛋白或糖脂等脂质部分,或如磷酸化氨基酸等经过化学修饰的氨基酸部分。在该实施方案的方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位,该表位包含至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 15 个或至少 20 个氨基酸。在该实施方案其它方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位,该表位包含最多 5 个、最多 6 个、最多 7 个、最多 8 个、最多 9 个、最多 10 个、最多 15 个或最多 20 个氨基酸。

[0066] 选择性结合包括例如结合亲和力、结合特异性和结合亲合力等结合特性。参见 David J.King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies,第 240 页 (1998)。结合亲和力是指抗体在其表位结合位点停留的时间长度,并且可以视为抗体结合其表位的强度。结合亲和力可以用抗体的平衡解离常数 (dissociation constant, KD) 来描述,平衡解离常数定义为平衡时 K_d/K_a 的比。其中 K_a 是抗体的缔合速率常数, k_d 是抗体的解离速率常数。结合亲和力是由缔合作用和解离作用一起决定,且仅有高缔合作用或低解离作用都无法确保高亲和力。缔合速率常数 (association rate constant, K_a), 或结合速率常数 (on-rate constant, K_{on}) 是单位时间内结合事件的数量,或抗体与抗原可逆缔合形成其抗体-抗原复合物的倾向的量度。缔合速率常数是以 $M^{-1}s^{-1}$ 为单位表示,且用符号表示如下: $[Ab] \times [Ag] \times K_{on}$ 。缔合速率常数越大,则抗体与其抗原的结合就越快,或者抗体与抗原之间的结合亲和力越高。解离速率常数 (dissociation rate constant, K_d) 或分解速率常数 (off-rate constant, K_{off}) 是单位时间内解离事件的数量,或抗体-抗原复合物可逆分离 (解离) 成其组分分子 (即抗体和抗原) 的倾向的量度。解离速率常数是以 s^{-1}

为单位表示,且用符号表示如下: $[Ab+Ag] \times K_{off}$ 。解离速率常数越小,抗体与其抗原的结合就越紧密,或者抗体与抗原之间的结合亲和力越高。平衡解离常数 (KD) 是平衡时形成新抗体-抗原复合物的速率等于抗体-抗原复合物解离的速率的量度。平衡解离常数是以 M 为单位表示,且定义为 $K_{off}/K_{on} = [Ab] \times [Ag]/[Ab+Ag]$, 其中 $[Ab]$ 是抗体的摩尔浓度, $[Ag]$ 是抗原的摩尔浓度,且 $[Ab+Ag]$ 是抗体-抗原复合物的摩尔浓度,其中所有浓度都是当系统达到平衡时这些组分的浓度。平衡解离常数越小,则抗体与其抗原的结合就越紧密,或抗体与抗原之间的结合亲和力越高。

[0067] 因此,在一个实施方案中,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有例如小于 $1 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、小于 $1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 、小于 $1 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 或小于 $1 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ 的缔合速率常数。在另一实施方案中,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有例如大于 $1 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、大于 $1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 、大于 $1 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 或大于 $1 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ 的缔合速率常数。在其它方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有介于 $1 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 至 $1 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ 、 $1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 至 $1 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ 、 $1 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 至 $1 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 或 $1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 至 $1 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 之间的缔合速率常数。

[0068] 在另一实施方案中,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有小于 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、小于 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或小于 $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ 的解离速率常数。在该实施方案的其它方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有例如小于 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、小于 $2.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、小于 $3.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、小于 $4.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、小于 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、小于 $6.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、小于 $7.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、小于 $8.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或小于 $9.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 的解离速率常数。在另一实施方案中,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有例如大于 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、大于 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或大于 $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ 的解离速率常数。在该实施方案其它方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有例如大于 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、大于 $2.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、大于 $3.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、大于 $4.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、大于 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、大于 $6.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、大于 $7.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、大于 $8.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或大于 $9.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 的解离速率常数。

[0069] 在另一实施方案中,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有小于 0.500nM 的平衡解离常数。在该实施方案的方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有例如小于 0.500nM、小于 0.450nM、小于 0.400nM、小于 0.350nM、小于 0.300nM、小于 0.250nM、小于 0.200nM、小于 0.150nM、小于 0.100nM 或小于 0.050nM 的平衡解离常数。在另一实施方案中,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有大于 0.500nM 的平衡解离常数。在该实施方案的方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有例如大于 0.500nM、大于 0.450nM、大于 0.400nM、大于 0.350nM、大于

0.300nM、大于 0.250nM、大于 0.200nM、大于 0.150nM、大于 0.100nM 或大于 0.050nM 的平衡解离常数。

[0070] 在另一实施方案中,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有例如小于 $1 \times 10^0 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、小于 $1 \times 10^1 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、小于 $1 \times 10^2 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、小于 $1 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 或小于 $1 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的针对完整 SNAP-25 的缔合速率常数。在另一实施方案中,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合亲和力可具有例如最多 $1 \times 10^0 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、最多 $1 \times 10^1 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、最多 $1 \times 10^2 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、最多 $1 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 或最多 $1 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的针对完整 SNAP-25 的缔合速率常数。

[0071] 结合特异性是抗体区分含其表位的分子与不含该表位的分子的能力。测量结合特异性的一种方式是将抗体对含其表位的分子的 K_{on} 缔合速率与抗体对不含该表位的分子的 K_{on} 缔合速率相比较。例如,比较 α -SNAP-25 抗体对在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的缔合速率常数 (K_a) 与对不包含该表位的 SNAP-25 (例如在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处没有羧基末端的 SNAP-25 表位或具有 BoNT/A 裂解位点的完整 P_1 - P_1' 易分裂键的 SNAP-25 表位) 的缔合速率常数 (K_a)。在该实施方案的方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体对不包含其表位的 SNAP-25 的缔合速率常数 (K_a) 例如小于 $1 \times 10^0 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、小于 $1 \times 10^1 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、小于 $1 \times 10^2 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、小于 $1 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 或小于 $1 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。在该实施方案的其它方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体对不包含其表位的 SNAP-25 缔合速率常数 (K_a) 为例如最多 $1 \times 10^0 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、最多 $1 \times 10^1 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、最多 $1 \times 10^2 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、最多 $1 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 或最多 $1 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。

[0072] 在该实施方案的另一方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体对其表位的缔合速率常数 (K_a) 是对不包含该表位的 SNAP-25 的 K_a 的例如至少 2 倍以上、至少 3 倍以上、至少 4 倍以上、至少 5 倍以上、至少 6 倍以上、至少 7 倍以上、至少 8 倍以上或至少 9 倍以上。在该实施方案的其它方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体对其表位的缔合速率常数 (K_a) 是对不包含该表位的 SNAP-25 的 K_a 的例如至少 10 倍多、至少 100 倍多、至少 1,000 倍多或至少 10,000 倍多。在该实施方案的其它方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体对其表位的缔合速率常数 (K_a) 是对不包含该表位的 SNAP-25 的 K_a 的例如最多 1 倍以上、最多 2 倍以上、最多 3 倍以上、最多 4 倍以上、最多 5 倍以上、最多 6 倍以上、最多 7 倍以上、最多 8 倍以上或最多 9 倍以上。在该实施方案的其它方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体对其表位的缔合速率常数 (K_a) 是对不包含该表位的 SNAP-25 的 K_a 的例如最多 10 倍以上、最多 100 倍以上、最多 1,000 倍以上或最多 10,000 倍以上。

[0073] 选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体的结合特异性也可以比率形式表征,致使此类 α -SNAP-25 抗体可区分其 SNAP-25 表位与不包含该表位的 SNAP-25 (例如在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处没有羧基末端的 SNAP-25 表位或具有 BoNT/A 裂解位点的完整 P_1 - P_1' 易分裂键的 SNAP-25

表位)。在该实施方案的方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体对其 SNAP-25 表位与对不包含该表位的 SNAP-25 的结合特异性比率为例如至少 2 : 1、至少 3 : 1、至少 4 : 1、至少 5 : 1、至少 64 : 1、至少 7 : 1、至少 8 : 1、至少 9 : 1、至少 10 : 1、至少 15 : 1、至少 20 : 1、至少 25 : 1、至少 30 : 1、至少 35 : 1 或至少 40 : 1。在该实施方案的其它方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体对其 SNAP-25 表位与对在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处没有羧基末端的 SNAP-25 的结合特异性比率为例如至少 2 : 1、至少 3 : 1、至少 4 : 1、至少 5 : 1、至少 6 : 1、至少 7 : 1、至少 8 : 1、至少 9 : 1、至少 10 : 1、至少 15 : 1、至少 20 : 1、至少 25 : 1、至少 30 : 1、至少 35 : 1 或至少 40 : 1。在该实施方案的其它方面,选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体对其 SNAP-25 表位与对具有 BoNT/A 裂解位点的完整 P_1 - P_1' 易分裂键的 SNAP-25 的结合特异性比率为例如至少 2 : 1、至少 3 : 1、至少 4 : 1、至少 5 : 1、至少 64 : 1、至少 7 : 1、至少 8 : 1、至少 9 : 1、至少 10 : 1、至少 15 : 1、至少 20 : 1、至少 25 : 1、至少 30 : 1、至少 35 : 1 或至少 40 : 1。

[0074] 结合亲合力,又称功能性亲和力,是指多价抗体与其抗原之间功能性结合强度的总和。抗体分子可具有一个以上结合位点(例如,对于 IgG 是 2 个,对于 IgM 是 10 个),而且许多抗原含有一个以上抗原位点。尽管抗体的结合亲合力取决于个体抗体结合位点的结合亲合力,但由于所有抗体-抗原相互作用必须在抗体完全解离的同时破坏,故结合亲合力大于结合亲和力。预期选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体可选择性结合该抗体的任何和所有表位。

[0075] 因此,在一个实施方案中, α -SNAP-25 抗体为选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体。在该实施方案的方面, α -SNAP-25 抗体为选择性结合具有羧基末端谷氨酰胺的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体,或选择性结合具有羧基末端赖氨酸的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体。在该实施方案的其它方面, α -SNAP-25 抗体为选择性结合具有对应于 SEQ ID NO :5 中的谷氨酰胺 197 的羧基末端 P_1 残基的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体,或选择性结合具有对应于 SEQ ID NO :16 中的赖氨酸 204 的羧基末端 P_1 残基的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体。在该实施方案的其它方面, α -SNAP-25 抗体为选择性结合具有 SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45 或 SEQ ID NO :46 的羧基末端氨基酸序列的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体。

[0076] 本公开的方面部分包括用于检测重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法。本说明书中公开的基于免疫的方法可以通过几个参数来评估,这些参数包括例如准确度、精确度、检测限(limit of detection, LOD)、定量限(limits of quantitation, LOQ)、范围、特异性、选择性、线性、重现性和系统适应性。方法的准确度是分析方法的正确性或测量值与作为公认的常规真值或公认参考值的值之间的一致接近度的量度。方法的精确度是当对同种样本的多次取样试样重复应用本程序时个别测试结果之间的一致程度。因此,精确度将评估 1) 测定法内可变性;2) 日内可变性(可重复性);以及 3) 日间可变性(中间精确度);和 4) 实验室间可变性(可再现性)。变异系数(CV%)是相对于观察平均值或理论平均值所表

达的精确度的定量度量。

[0077] 本说明书中公开的基于免疫的方法须能够在背景上检测包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 抗体-抗原复合物的存在。方法的检测限 (LOD) 是指分析物产生与阴性对照物或空白明显不同的信号的浓度, 并且表示可与背景相区别的分析物的最低浓度。

[0078] 因此, 在一个实施方案中, 本说明书中公开的基于免疫的方法可检测重靶向内肽酶的 LOD, 其中重靶向内肽酶的量明显不同于阴性对照物或空白的量。在该实施方案的一方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOD 为例如 10ng 或更少、9ng 或更少、8ng 或更少、7ng 或更少、6ng 或更少、5ng 或更少、4ng 或更少、3ng 或更少、2ng 或更少、1ng 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOD 为例如 900pg 或更少、800pg 或更少、700pg 或更少、600pg 或更少、500pg 或更少、400pg 或更少、300pg 或更少、200pg 或更少、100pg 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOD 为例如 90pg 或更少、80pg 或更少、70pg 或更少、60pg 或更少、50pg 或更少、40pg 或更少、30pg 或更少、20pg 或更少、10pg 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOD 为例如 9pg 或更少、8pg 或更少、7pg 或更少、6pg 或更少、5pg 或更少、4pg 或更少、3pg 或更少、2pg 或更少、1pg 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOD 为例如 0.9pg 或更少、0.8pg 或更少、0.7pg 或更少、0.6pg 或更少、0.5pg 或更少、0.4pg 或更少、0.3pg 或更少、0.2pg 或更少、0.1pg 或更少的重靶向内肽酶。

[0079] 在该实施方案的另一方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOD 为例如 100nM 或更少、90nM 或更少、80nM 或更少、70nM 或更少、60nM 或更少、50nM 或更少、40nM 或更少、30nM 或更少、20nM 或更少、10nM 或更少、9nM 或更少、8nM 或更少、7nM 或更少、6nM 或更少、5nM 或更少、4nM 或更少、3nM 或更少、2nM 或更少或 1nM 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOD 为例如 900pM 或更少、800pM 或更少、700pM 或更少、600pM 或更少、500pM 或更少、400pM 或更少、300pM 或更少、200pM 或更少或 100pM 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOD 为例如 100pM 或更少、90pM 或更少、80pM 或更少、70pM 或更少、60pM 或更少、50pM 或更少、40pM 或更少、30pM 或更少、20pM 或更少或 10pM 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOD 为例如 10pM 或更少的重靶向内肽酶、9pM 或更少、8pM 或更少、7pM 或更少、6pM 或更少、5pM 或更少、4pM 或更少、3pM 或更少、2pM 或更少或 1pM 或更少的重靶向内肽酶。

[0080] 定量限 (LOQ) 为可以可接受的准确度和精确度水平测量的样本或试样中分析物的最低浓度和最高浓度。定量下限是指检测方法始终能从背景中测量到的最低剂量。定量上限为在信号出现饱和前检测方法始终能检测到的最高浓度。方法的线性范围为定量下限与定量上限之间的区域。线性范围是通过用定量上限减去定量下限计算得到的。本文中使用的术语“下渐近线的信噪比”是指本方法在检测下限检测到的信号与背景信号的比率。本文中使用的术语“上渐近线的信噪比”是指本方法在检测上限检测到的信号与背景信号的比率。

[0081] 因此, 在一个实施方案中, 本说明书中公开的基于免疫的方法可检测重靶向内肽

酶的 LOQ, 其中重靶向内肽酶的量明显不同于阴性对照物或空白的量。在该实施方案的一方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOQ 为例如 10ng 或更少、9ng 或更少、8ng 或更少、7ng 或更少、6ng 或更少、5ng 或更少、4ng 或更少、3ng 或更少、2ng 或更少、1ng 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOQ 为例如 900pg 或更少、800pg 或更少、700pg 或更少、600pg 或更少、500pg 或更少、400pg 或更少、300pg 或更少、200pg 或更少、100pg 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOQ 为例如 90pg 或更少、80pg 或更少、70pg 或更少、60pg 或更少、50pg 或更少、40pg 或更少、30pg 或更少、20pg 或更少、10pg 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOQ 为例如 9pg 或更少、8pg 或更少、7pg 或更少、6pg 或更少、5pg 或更少、4pg 或更少、3pg 或更少、2pg 或更少、1pg 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOQ 为例如 0.9pg 或更少、0.8pg 或更少、0.7pg 或更少、0.6pg 或更少、0.5pg 或更少、0.4pg 或更少、0.3pg 或更少、0.2pg 或更少、0.1pg 或更少的重靶向内肽酶。

[0082] 在该实施方案的另一方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOQ 为例如 100nM 或更少、90nM 或更少、80nM 或更少、70nM 或更少、60nM 或更少、50nM 或更少、40nM 或更少、30nM 或更少、20nM 或更少、10nM 或更少、9nM 或更少、8nM 或更少、7nM 或更少、6nM 或更少、5nM 或更少、4nM 或更少、3nM 或更少、2nM 或更少或 1nM 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOQ 为例如 900pM 或更少、800pM 或更少、700pM 或更少、600pM 或更少、500pM 或更少、400pM 或更少、300pM 或更少、200pM 或更少或 100pM 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOQ 为例如 100pM 或更少、90pM 或更少、80pM 或更少、70pM 或更少、60pM 或更少、50pM 或更少、40pM 或更少、30pM 或更少、20pM 或更少或 10pM 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法的 LOQ 为例如 10pM 或更少的重靶向内肽酶、9pM 或更少、8pM 或更少、7pM 或更少、6pM 或更少、5pM 或更少、4pM 或更少、3pM 或更少、2pM 或更少或 1pM 或更少的重靶向内肽酶。

[0083] 适用于所公开的方法的实践方面的基于免疫的测定的精确度须不超过 50%。在该实施方案的方面, 基于免疫的测定的精确度不超过 50%、不超过 40%、不超过 30% 或不超过 20%。在该实施方案的其它方面, 基于免疫的测定的精确度不超过 15%、不超过 10% 或不超过 5%。在该实施方案的其它方面, 基于免疫的测定的精确度不超过 4%、不超过 3%、不超过 2% 或不超过 1%。

[0084] 适用于所公开的方法的实践方面的基于免疫的测定的准确度须为至少 50%。在该实施方案的方面, 基于免疫的测定的准确度为至少 50%、至少 60%、至少 70% 或至少 80%。在该实施方案的其它方面, 基于免疫的测定的准确度为至少 85%、至少 90% 或至少 95%。在该实施方案的其它方面, 基于免疫的测定的准确度为至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99%。

[0085] 本说明书中公开的基于免疫的方法须具有统计上显著的下渐近线的信噪比以及统计上显著的上渐近线的信噪比。在该实施方案的方面, 本说明书中公开的基于免疫的方法在下渐近线的信噪比为例如至少 3 : 1、至少 4 : 1、至少 5 : 1、至少 6 : 1、至少 7 : 1、至少 8 : 1、至少 9 : 1、至少 10 : 1、至少 15 : 1 或至少 20 : 1。在该实施方案的其它方

面,基于免疫的方法在上渐近线的信噪比为例如至少 10 : 1、至少 15 : 1、至少 20 : 1、至少 25 : 1、至少 30 : 1、至少 35 : 1、至少 40 : 1、至少 45 : 1、至少 50 : 1、至少 60 : 1、至少 70 : 1、至少 80 : 1、至少 90 : 1 或至少 100 : 1、至少 150 : 1、至少 200 : 1、至少 250 : 1、至少 300 : 1、至少 350 : 1、至少 400 : 1、至少 450 : 1、至少 500 : 1、至少 550 : 1 或至少 600 : 1。

[0086] 方法的特异性定义为这种方法排除其它相关组分(例如部分活性或无活性分析物)测量相关分析物的能力。方法的选择性将描述分析方法区别样本中各种物质的能力。方法的线性是其引起直接或通过明确确定的数学变换与样本中分析物的浓度成比例的结果的能力。因此,在一个实施方案中,本说明书中公开的基于免疫的方法可将具有完全活性的重靶向内肽酶与活性是具有完全活性的重靶向内肽酶的例如 70%或更少、60%或更少、50%或更少、40%或更少、30%或更少、20%或更少或者 10%或更少的具有部分活性的重靶向内肽酶区分开来。

[0087] 方法的重现性为在正常(但可变化)的测试条件下由相同样本得到的测试结果的可再现性。一种程序的稳健性是在方法参数较小但有意的变动下仍保持不受影响的能力的度量,并且提供了其在正常使用中的可靠性的指示。因此,重现性评估不能避免的变化,而稳健性则评估有意的变化。利用重现性和稳健性评估的典型参数包括冷冻/解冻、孵育时间、孵育温度、试剂使用期限、样本制备、样本储存、细胞传代数、重靶向内肽酶批次、纯化之间的变化性以及切口反应之间的变化性的影响。基于细胞的测定的稳健性参数包括细胞库(冷冻开始、期间和结束)、细胞传代水平、细胞接种密度、细胞储备液密度(在培养液中孵育多少天)、烧瓶中的胞龄(等待接种的时间)、孵育时间、不同的板、过量血清和试剂来源。方法的系统适应性是通过参照标准或参照分子的分析随时间进行的测定性能(包括试剂和仪器的性能)的测定,包括试剂和仪器的性能。系统适应性在 FDA 指南中提到设备、电子仪器、测定性能和欲分析的样本构成完整系统的事实时强调过。系统适应性可通过进行平行测试来评估,平行测试是指,当将对数剂量相对于响应作图时,参照物的连续稀释与样本的连续稀释应产生平行曲线。

[0088] 本公开的方面部分包括来自确立细胞系的细胞。本文中使用的术语“细胞”是指对重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感的任何真核细胞,或可摄取重靶向内肽酶的任何真核细胞。术语细胞涵盖来自多种生物体的细胞,例如鼠类、大鼠、猪、牛、马、灵长类动物和人类的细胞;来自多种细胞类型的细胞,例如神经元和非神经元细胞;且这些细胞可从异质细胞群、组织或生物体分离,或者作为异质细胞群、组织或生物体的一部分。本文中使用的术语“确立细胞系”与“永生细胞系”或“转化的细胞系”同义,且是指为由源自于某一生物体、组织或器官来源的细胞群的无限繁殖而选择的细胞的细胞培养物。根据定义,确立细胞系不包括原代细胞的细胞培养物。本文中使用的术语“原代细胞”是直接来自新鲜组织或器官收获的细胞,并且这些细胞没有发生无限繁殖的潜能。确立细胞系可以包含异质细胞群或均一细胞群。源自于单个细胞的确立细胞系称为无性细胞系。确立细胞系可以是所含细胞内源性表达使细胞经历整个细胞机制,由此使重靶向内肽酶蛋白水解裂解 SNAP-25 底物所需的所有组分的细胞系,所述细胞机制涵盖重靶向内肽酶与其受体的结合、内肽酶/受体复合物的内化、重靶向内肽酶轻链由细胞内囊泡转位到细胞质中以及 SNAP-25 的蛋白水解裂解。或者,确立细胞系可以是所含细胞从外源性来源引入至少一种使细胞经历整个

细胞机制,由此使重靶向内肽酶蛋白水解裂解 SNAP-25 底物所需的组分的细胞系,所述细胞机制涵盖重靶向内肽酶与其受体的结合、内肽酶 / 受体复合物的内化、重靶向内肽酶轻链由细胞内囊泡转位到细胞质中以及 SNAP-25 的蛋白水解裂解。确立细胞系又称为遗传工程改造的细胞系,来自此类确立细胞系的细胞可例如表达外源性重靶向内肽酶,例如外源性 ORL1、外源性 DOR、外源性 KOR、外源性 MOR、外源性甘丙肽受体 1、外源性甘丙肽受体 2、外源性甘丙肽受体 3 或其任何组合。

[0089] 本公开的方面部分包括来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞。本文中使用的术语“对重靶向内肽酶活性敏感的细胞”、“对重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感的细胞”或“来自确立细胞系的对重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感的细胞”是指可经历整个细胞机制,由此使重靶向内肽酶蛋白水解裂解 SNAP-25 底物,从而抑制胞吐作用的细胞,所述细胞机制涵盖重靶向内肽酶与其受体的结合、内肽酶 / 受体复合物的内化、重靶向内肽酶轻链由细胞内囊泡转位到细胞质中以及 SNAP-25 的蛋白水解裂解。根据定义,对重靶向内肽酶活性敏感的细胞必须表达,或被工程改造成表达至少一种重靶向内肽酶受体和至少一种 SNAP-25 底物。本文中使用的术语“可摄取重靶向内肽酶的细胞”或“构成确立细胞系的摄取重靶向内肽酶的细胞”是指可经历整个细胞机制,由此使重靶向内肽酶蛋白水解裂解 SNAP-25 底物,从而抑制胞吐作用的细胞,所述细胞机制涵盖重靶向内肽酶与其受体的结合、内肽酶 / 受体复合物的内化、重靶向内肽酶轻链由细胞内囊泡转位到细胞质中以及 SNAP-25 的蛋白水解裂解。根据定义,可摄取重靶向内肽酶的细胞必须表达,或被工程改造成表达至少一种重靶向内肽酶受体和至少一种 SNAP-25 底物。

[0090] 因此,在一个实施方案中,来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶活性敏感。在该实施方案的方面,来自确立细胞系的细胞对例如约 100nM 或更少、约 90nM 或更少、约 80nM 或更少、约 70nM 或更少、约 60nM 或更少、约 50nM 或更少、约 40nM 或更少、约 30nM 或更少、约 20nM 或更少、约 10nM 或更少的重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感。在其它方面,来自确立细胞系的细胞对例如约 9nM 或更少、约 8nM 或更少、约 7nM 或更少、约 6nM 或更少、约 5nM 或更少、约 4nM 或更少、约 3nM 或更少、约 2nM 或更少或者约 1nM 或更少的重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感。在其它方面,来自确立细胞系的细胞对例如约 0.9nM 或更少、约 0.8nM 或更少、约 0.7nM 或更少、约 0.6nM 或更少、约 0.5nM 或更少、约 0.4nM 或更少、约 0.3nM 或更少、约 0.2nM 或者约 0.1nM 或更少的重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感。当定量指定项目、数字、百分比或术语的值时,本文中使用的术语“约”是指该指定项目、百分比、参数或术语的值 $\pm 10\%$ 的范围。

[0091] 在另一实施方案中,构成确立细胞系的细胞可摄取重靶向内肽酶。在该实施方案的方面,构成确立细胞系的细胞可摄取例如约 100nM 或更少、约 90nM 或更少、约 80nM 或更少、约 70nM 或更少、约 60nM 或更少、约 50nM 或更少、约 40nM 或更少、约 30nM 或更少、约 20nM 或更少、约 10nM 或更少的重靶向内肽酶。在其它方面,构成确立细胞系的细胞能够摄取约 9nM 或更少、约 8nM 或更少、约 7nM 或更少、约 6nM 或更少、约 5nM 或更少、约 4nM 或更少、约 3nM 或更少、约 2nM 或更少或者约 1nM 或更少的重靶向内肽酶。在其它方面,构成确立细胞系的细胞能够摄取约 0.9nM 或更少、约 0.8nM 或更少、约 0.7nM 或更少、约 0.6nM 或更少、约 0.5nM 或更少、约 0.4nM 或更少、约 0.3nM 或更少、约 0.2nM 或更少或者约 0.1nM 或更少的重靶向内肽酶。

[0092] 本公开的方面部分包括来自确立细胞系的对本说明书中公开的重靶向内肽酶呈现选择性结合的细胞。当提到重靶向内肽酶时,本文中使用的术语“选择性结合”是指重靶向内肽酶与指定靶受体有差别地结合,以致重靶向内肽酶大致上不结合非靶受体。来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶呈现选择性结合的程度可通过这些细胞对不含重靶向内肽酶的靶向域的分子呈现非选择性摄取的程度来测量。评估对不含重靶向内肽酶的靶向域的分子的非选择性摄取的一种方式:测量 LH_N 片段的非选择性摄取。 LH_N 片段是包含梭菌毒素转位域和梭菌毒素酶域,但完全缺乏任何靶向域的片段。 LH_N 片段的非限制性实例包括 LH_N/A 片段、 LH_N/B 片段、 LH_N/C 片段、 LH_N/D 片段、 LH_N/E 片段、 LH_N/F 片段和 LH_N/G 片段。示例性 LH_N/A 片段为 SEQ ID NO:146,该序列由多核苷酸分子 SEQ ID NO:147 编码。

[0093] 因此,在一个实施方案中,来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶呈现选择性结合。在该实施方案的方面,来自确立细胞系的细胞对表现出活性例如活性是所测定的总活性的至少 75%、所测定的总活性的至少 80%、所测定的总活性的至少 85%、所测定总活性的至少 90% 或所测定的总活性的至少 95% 的重靶向内肽酶呈现选择性结合。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞对表现出活性例如所测定的总活性的约 75% 到约 100%、所测定的总活性的约 80% 到约 100%、所测定的总活性的约 85% 到约 100%、所测定的总活性的约 90% 到约 100% 的重靶向内肽酶呈现选择性结合。

[0094] 在另一实施方案中,来自确立细胞系的细胞呈现最少的对 LH_N 片段的非选择性摄取。在该实施方案的方面,来自确立细胞系的细胞呈现的对 LH_N 片段的非选择性摄取量例如所测量的总摄取量的最多 25%、所测量的总摄取量的最多 20%、所测量的总摄取量的最多 15%、所测量的总摄取量的最多 10% 或所测量的总摄取量的最多 5%。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞呈现的对 LH_N 片段的非选择性摄取量例如所测量的总摄取量的约 0% 到约 25%、所测量的总摄取量的约 0% 到约 20%、所测量的总摄取量的约 0% 到约 15%、所测量的总摄取量的约 0% 到约 10% 或所测量的总摄取量的约 0% 到约 5%。

[0095] 在另一实施方案中,来自确立细胞系的细胞呈现最少的对 LH_N/A 片段的非选择性摄取。在该实施方案的方面,来自确立细胞系的细胞呈现的对 LH_N/A 片段的非选择性摄取量例如所测量的总摄取量的最多 25%、所测量的总摄取量的最多 20%、所测量的总摄取量的最多 15%、所测量的总摄取量的最多 10% 或所测量的总摄取量的最多 5%。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞呈现的对 LH_N/A 片段的非选择性摄取量例如所测量的总摄取量的约 0% 到约 25%、所测量的总摄取量的约 0% 到约 20%、所测量的总摄取量的约 0% 到约 15%、所测量的总摄取量的约 0% 到约 10% 或所测量的总摄取量的约 0% 到约 5%。

[0096] 本公开的方面部分包括来自确立细胞系的细胞,这些细胞在质膜上呈现足量的受体结合位点,以赋予对重靶向内肽酶的敏感性和选择性结合。平衡饱和结合测定将测量各种浓度的配体的总的非特异性结合。针对配体的平衡解离常数 (K_d) 以及受体结合位点的最大数量 B_{max} 可以使用非线性回归分析由特异性结合计算得到。特异性结合是通过用观察到的总结合减去配体的非特异性结合计算。 K_d 为达到半数最大结合所需的配体浓度,并且是以摩尔浓度来度量。 B_{max} 为质膜上存在的结合位点的最大数量,并且是以 pmol/mg、pmol/细胞、fmol/细胞或位点/细胞来度量。

[0097] 因此,在一个实施方案中,来自确立细胞系的细胞在质膜上呈现足量的受体结合

位点,以赋予对重靶向内肽酶的敏感性和选择性结合。在该实施方案的方面,来自确立细胞系的细胞针对重靶向内肽酶的靶向配体呈现出的 B_{max} 值例如至少 0.1fmol/细胞 、至少 0.2fmol/细胞 、至少 0.3fmol/细胞 、至少 0.4fmol/细胞 、至少 0.5fmol/细胞 、至少 0.6fmol/细胞 、至少 0.7fmol/细胞 、至少 0.8fmol/细胞 、至少 0.9fmol/细胞 或至少 1.0fmol/细胞 。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞针对重靶向内肽酶的靶向配体呈现出的 B_{max} 值例如至少 1fmol/细胞 、至少 2fmol/细胞 、至少 3fmol/细胞 、至少 4fmol/细胞 、至少 5fmol/细胞 、至少 6fmol/细胞 、至少 7fmol/细胞 、至少 8fmol/细胞 、至少 9fmol/细胞 或至少 10fmol/细胞 。

[0098] 本公开的方面部分包括来自确立无性细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞,这些细胞比来自衍生无性细胞系的亲本细胞系的细胞稳定。本文中使用的术语“稳定的”是指来自确立无性细胞系的细胞经过特定传代数所呈现的针对重靶向内肽酶活性的相对 EC_{50} 、敏感性、功效、明确界定的上渐近线和 / 或明确界定的剂量 - 响应曲线类似于来自衍生无性细胞系的亲本细胞系的细胞经过相同或类似传代数所呈现的相对 EC_{50} 、敏感性、功效、明确界定的上渐近线和 / 或明确界定的剂量 - 响应曲线值,其中两种测定中使用相同的测定条件和相同的重靶向内肽酶。

[0099] 因此,在一个实施方案中,来自确立无性细胞系的细胞比来自衍生无性细胞系的亲本细胞系的细胞稳定。在该实施方案的一方面,来自确立无性细胞系的细胞比亲本 SK-N-DZ 细胞系稳定。在该实施方案的另一方面,来自确立无性细胞系的细胞比亲本 SK-N-DZ 细胞系 ATCC CRL-2149 稳定。在该实施方案的其它方面,来自确立无性细胞系的细胞经过例如至少 5 次以上传代、至少 10 次以上传代、至少 15 次以上传代、至少 20 次以上传代、至少 25 次以上传代或至少 30 次以上传代比来自获得无性细胞系的亲本细胞系的细胞稳定。在该实施方案的其它方面,来自确立无性细胞系的细胞经过例如至少 5 次以上传代、至少 10 次以上传代、至少 15 次以上传代、至少 20 次以上传代、至少 25 次以上传代或至少 30 次以上传代比来自衍生无性细胞系的亲本细胞系的细胞稳定。

[0100] 本公开的方面部分包括来自确立无性细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞,这些细胞经过多次细胞传代仍保持稳定。本文中使用的术语“稳定”是指来自确立无性细胞系的细胞经过特定传代数所呈现的针对重靶向内肽酶活性的相对 EC_{50} 、敏感性、功效、明确界定的上渐近线和 / 或明确界定的剂量 - 响应曲线类似于来自一次或多次传代前的同一种确立无性细胞系的细胞所呈现的相对 EC_{50} 、敏感性、功效、明确界定的上渐近线和 / 或明确界定的剂量 - 响应曲线值,其中,两种测定中使用相同的测定条件和相同的重靶向内肽酶。

[0101] 本说明书中公开的来自确立细胞系的细胞经过多次细胞传代可对重靶向内肽酶活性呈现一致的敏感性。本文中使用的术语“对重靶向内肽酶活性的敏感性”是指测定中能始终测量到高于由未处理的对照检测的信号或背景信号的最低剂量。

[0102] 因此,在一个实施方案中,经过任一指定传代数,来自确立无性细胞系的细胞对例如 100nM 或更少、约 80nM 或更少、约 70nM 或更少、约 60nM 或更少、约 50nM 或更少、约 40nM 或更少、约 30nM 或更少、约 20nM 或更少、约 10nM 或更少、约 1nM 或更少、约 0.9nM 或更少、约 0.8nM 或更少、约 0.7nM 或更少、约 0.6nM 或更少、约 0.5nM 或更少、约 0.4nM 或更少、约 0.3nM 或更少、约 0.2nM 或更少或者约 0.1nM 或更少的重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性呈现敏感性。在该实施方案的方面,经过任一指定传代数,来自确立无性细胞系的细胞对例如

约 0.01nM 到约 100nM、约 0.01nM 到约 75nM、约 0.01nM 到约 50nM、约 0.01nM 到约 25nM、约 0.01nM 到约 20nM、约 0.01nM 到约 15nM、约 0.01nM 到约 10nM、约 0.01nM 到约 5nM、约 0.001nM 到约 100nM、约 0.001nM 到约 75nM、约 0.001nM 到约 50nM、约 0.001nM 到约 25nM、约 0.001nM 到约 20nM、约 0.001nM 到约 15nM、约 0.001nM 到约 10nM 或者约 0.001nM 到约 5nM 的重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性呈现敏感性。

[0103] 在另一实施方案中,经过例如 5 次或多次细胞传代、10 次或多次细胞传代、15 次或多次细胞传代、20 次或多次细胞传代、25 次或多次细胞传代、30 次或多次细胞传代、35 次或多次细胞传代、40 次或多次细胞传代、45 次或多次细胞传代或者 50 次或多次细胞传代,来自确立无性细胞系的细胞对约 100nM 或更少、约 75nM 或更少、约 50nM 或更少、约 25nM 或更少、小于约 20nM 或更少、约 15nM 或更少、约 10nM 或更少或约 1nM 或更少的重靶向内肽酶活性呈现敏感性。在该实施方案的其它方面,经过例如约 15 到约 60 次传代、约 20 到约 60 次传代、约 25 到约 60 次传代、约 30 到约 60 次传代、约 35 到约 60 次传代、约 40 到约 60 次传代、约 45 到约 60 次传代、约 50 到约 60 次传代、约 15 到约 50 次传代、约 20 到约 50 次传代、约 25 到约 50 次传代、约 30 到约 50 次传代、约 35 到约 50 次传代、约 40 到约 50 次传代、约 15 到约 40 次传代、约 20 到约 40 次传代、约 25 到约 40 次传代或约 30 到约 40 次传代,来自确立无性细胞系的细胞对约 100nM 或更少、约 75nM 或更少、约 50nM 或更少、约 25nM 或更少、小于约 20nM 或更少、约 15nM 或更少、约 10nM 或更少或者约 1nM 或更少的重靶向内肽酶活性呈现敏感性。

[0104] 本说明书中公开的来自确立细胞系的细胞经过多次细胞传代可对重靶向内肽酶摄取或重靶向内肽酶活性呈现一致的相对功效。本文中使用的术语“相对功效”是指在执行本测定时检测到的重靶向内肽酶活性的上渐近线与在该测定中利用参照标准、参照分子或参照传代数检测到的重靶向内肽酶活性的上渐近线的对比程度。本文中使用的术语“上渐近线的信噪比”是指在测定中于检测上限检测到的信号与由未处理的对照检测的信号或背景信号的比率。检测上限是在信号出现饱和和前测定始终能测量到的最大剂量。

[0105] 因此,在一个实施方案中,本说明书中公开的来自确立细胞系的细胞经过多次细胞传代可呈现明确界定的上渐近线,并在测定中保持一致且适宜的信噪比。在该实施方案的方面,经过例如 5 次或多次细胞传代、10 次或多次细胞传代、15 次或多次细胞传代、20 次或多次细胞传代、25 次或多次细胞传代、30 次或多次细胞传代、35 次或多次细胞传代、40 次或多次细胞传代、45 次或多次细胞传代或者 50 次或多次细胞传代,本说明书中公开的来自确立细胞系的细胞针对重靶向内肽酶活性的上渐近线的明确界定的信噪比须为例如至少 3 : 1、至少 4 : 1、至少 5 : 1、至少 6 : 1、至少 7 : 1、至少 8 : 1、至少 9 : 1、至少 10 : 1、至少 15 : 1、至少 20 : 1、至少 25 : 1、至少 30 : 1、至少 35 : 1、至少 40 : 1、至少 45 : 1、至少 50 : 1、至少 60 : 1、至少 70 : 1、至少 80 : 1、至少 90 : 1 或至少 100 : 1、至少 150 : 1、至少 200 : 1、至少 250 : 1、至少 300 : 1、至少 350 : 1、至少 400 : 1、至少 450 : 1、至少 500 : 1、至少 550 : 1 或至少 600 : 1。在该实施方案的其它方面,经过例如约 15 到约 60 次传代、约 20 到约 60 次传代、约 25 到约 60 次传代、约 30 到约 60 次传代、约 35 到约 60 次传代、约 40 到约 60 次传代、约 45 到约 60 次传代、约 50 到约 60 次传代、约 15 到约 50 次传代、约 20 到约 50 次传代、约 25 到约 50 次传代、约 30 到约 50 次传代、约 35 到约 50 次传代、约 40 到约 50 次传代、约 15 到约 40 次传代、约 20 到约 40 次传代、约 25 到

约 40 次传代或约 30 到约 40 次传代,本说明书中公开的来自确立细胞系的细胞针对重靶向内肽酶活性的上渐近线的明确界定的信噪比须为例如至少 3 : 1、至少 4 : 1、至少 5 : 1、至少 6 : 1、至少 7 : 1、至少 8 : 1、至少 9 : 1、至少 10 : 1、至少 15 : 1、至少 20 : 1、至少 25 : 1、至少 30 : 1、至少 35 : 1、至少 40 : 1、至少 45 : 1、至少 50 : 1、至少 60 : 1、至少 70 : 1、至少 80 : 1、至少 90 : 1 或至少 100 : 1、至少 150 : 1、至少 200 : 1、至少 250 : 1、至少 300 : 1、至少 350 : 1、至少 400 : 1、至少 450 : 1、至少 500 : 1、至少 550 : 1 或至少 600 : 1。

[0106] 本说明书中公开的来自确立细胞系的细胞经过多次细胞传代可针对重靶向内肽酶活性呈现明确界定的剂量 - 响应曲线。本文中使用的术语“剂量 - 响应曲线”是指原始数据与所选用于本测定的统计模型的拟合程度。在非限制性实例中,利用四参数逻辑斯蒂拟合 (four parameter logistics fit) 得到的 S 形曲线是用于例如效力测定等酶促活性测定的剂量 - 响应曲线。在另一非限制性实例中,利用单位点饱和拟合 (one site saturation fit) 的配体结合是配体 / 抗体结合测定的剂量 - 响应曲线。

[0107] 因此,在一个实施方案中,本说明书中公开的来自确立细胞系的细胞经过多次细胞传代仍针对重靶向内肽酶活性呈现明确界定的剂量 - 响应曲线。在该实施方案的方面,经过例如 5 次或多次细胞传代、10 次或多次细胞传代、15 次或多次细胞传代、20 次或多次细胞传代、25 次或多次细胞传代、30 次或多次细胞传代、35 次或多次细胞传代、40 次或多次细胞传代、45 次或多次细胞传代或者 50 次或多次细胞传代,本说明书中公开的来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶活性仍呈现明确界定的剂量 - 响应曲线。在该实施方案的其它方面,经过例如约 15 到约 60 次传代、约 20 到约 60 次传代、约 25 到约 60 次传代、约 30 到约 60 次传代、约 35 到约 60 次传代、约 40 到约 60 次传代、约 45 到约 60 次传代、约 50 到约 60 次传代、约 15 到约 50 次传代、约 20 到约 50 次传代、约 25 到约 50 次传代、约 30 到约 50 次传代、约 35 到约 50 次传代、约 40 到约 50 次传代、约 15 到约 40 次传代、约 20 到约 40 次传代、约 25 到约 40 次传代或约 30 到约 40 次传代,本说明书中公开的来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶活性仍呈现明确界定的剂量 - 响应曲线。

[0108] 本说明书中公开的来自确立细胞系的细胞经过多次细胞传代可对重靶向内肽酶活性呈现一致的相对 EC_{50} 值。本文中使用的术语“相对 EC_{50} ”或“相对 EC_{50} 值”是指针对经过计算的本测定中所用的参照标准、参照分子或参照传代数的 EC_{50} 而归一化的重靶向内肽酶活性的 EC_{50} 值。

[0109] 因此,在一个实施方案中,来自确立无性细胞系的细胞经过多次细胞传代仍对重靶向内肽酶活性呈现一致的相对 EC_{50} 值。在该实施方案的方面,经过例如 5 次或多次细胞传代、10 次或多次细胞传代、15 次或多次细胞传代、20 次或多次细胞传代、25 次或多次细胞传代、30 次或多次细胞传代、35 次或多次细胞传代、40 次或多次细胞传代、45 次或多次细胞传代或者 50 次或多次细胞传代,来自确立无性细胞系的细胞对重靶向内肽酶活性呈现一致的相对 EC_{50} 值,即例如为针对重靶向内肽酶活性的相对 EC_{50} 值的约 $\pm 10\%$ 、约 $\pm 20\%$ 、约 $\pm 30\%$ 、约 $\pm 40\%$ 、约 $\pm 50\%$ 、约 $\pm 60\%$ 、约 $\pm 70\%$ 或约 $\pm 75\%$ 。在该实施方案的其它方面,经过例如 5 次或多次细胞传代、10 次或多次细胞传代、15 次或多次细胞传代、20 次或多次细胞传代、25 次或多次细胞传代、30 次或多次细胞传代、35 次或多次细胞传代、40 次或多次细胞传代、45 次或多次细胞传代或者 50 次或多次细胞传代,来自确立无性细胞系的细

胞对重靶向内肽酶活性呈现的相对EC₅₀值是针对重靶向内肽酶活性的相对EC₅₀值的例如约±10%到约75%、约±10%到约70%、约±10%到约60%、约±10%到约50%、约±10%到约40%、约±10%到约30%或者±10%到约20%。

[0110] 本发明的方面部分包括重靶向内肽酶。本文中使用的术语“重靶向内肽酶”与“靶向囊泡胞吐调节蛋白”或者“TVEMP”同义。重靶向内肽酶的非限制性实例公开于例如以下文献中:Keith A.Foster等, Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, 美国专利 5,989,545;Clifford C.Shone等, Recombinant Toxin Fragments, 美国专利 6,461,617;Conrad P.Quinn等, Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, 美国专利 6,632,440;Lance E.Steward等, Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, 美国专利 6,843,998;Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, 美国专利公布 2002/0037833;Keith A.Foster等, Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, 美国专利公布 2003/0180289;J.Oliver Dolly等, Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570;Keith A.Foster等, Re-targeted Toxin Conjugates, 国际专利公布 WO 2005/023309;Lance E.Steward等, Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, 美国专利申请第 11/376,696 号;Steward, L.E.等, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, 美国专利申请第 11/776,075 号;Dolly, J.O.等, Activatable Clostridial Toxins, 美国专利申请第 11/829,475 号;Foster, K.A.等, Fusion Proteins, 国际专利公布 WO 2006/059093;以及 Foster, K.A.等, Non-Cytotoxic Protein Conjugates, 国际专利公布 WO 2006/059105, 各专利的全部内容以引用的方式并入本文。重靶向内肽酶的非限制性实例包括 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:130 和 SEQ ID NO:131。

[0111] 因此,在一个实施方案中,所检测的重靶向内肽酶活性来自重靶向内肽酶。在该实施方案的方面,所检测的重靶向内肽酶活性是来自以下文献中公开的重靶向内肽酶:Keith A.Foster等, Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, 美国专利 5,989,545;Clifford C.Shone等, Recombinant Toxin Fragments, 美国专利 6,461,617;Conrad P.Quinn等, Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, 美国专利 6,632,440;Lance E.Steward等, Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, 美国专利 6,843,998;Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, 美国专利公布 2002/0037833;Keith A.Foster等, Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, 美国专利公布 2003/0180289;J.Oliver Dolly等, Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570;Keith A.Foster等, Re-targeted Toxin Conjugates, 国际专利公布 WO 2005/023309;Lance E.Steward等, Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, 美国专利申请第 11/376,696 号;Steward, L.E.等, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, 美国专利申

请第 11/776,075 号 ;Dolly, J. O. 等, Activatable Clostridial Toxins, 美国专利申请第 11/829,475 号 ;Foster, K. A. 等, Fusion Proteins, 国际专利公布 WO 2006/059093 ;以及 Foster, K. A. 等, Non-Cytotoxic Protein Conjugates, 国际专利公布 WO 2006/059105, 各专利的全部内容以引用的方式并入本文。在该实施方案的方面, 重靶向内肽酶为 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :130 或 SEQ ID NO :131。

[0112] 在另一实施方案中, 所检测的重靶向内肽酶活性来自与以下文献中公开的重靶向内肽酶具有例如至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 氨基酸同一性的重靶向内肽酶 :Keith A. Foster 等, Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, 美国专利 5,989,545 ;Clifford C. Shone 等, Recombinant Toxin Fragments, 美国专利 6,461,617 ;Conrad P. Quinn 等, Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, 美国专利 6,632,440 ;Lance E. Steward 等, Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, 美国专利 6,843,998 ;Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, 美国专利公布 2002/0037833 ;Keith A. Foster 等, Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, 美国专利公布 2003/0180289 ;J. Oliver Dolly 等, Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570 ;Keith A. Foster 等, Re-targeted Toxin Conjugates, 国际专利公布 WO 2005/023309 ;Lance E. Steward 等, Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, 美国专利申请第 11/376,696 号 ;Steward, L. E. 等, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, 美国专利申请第 11/776,075 号 ;Dolly, J. O. 等, Activatable Clostridial Toxins, 美国专利申请第 11/829,475 号 ;Foster, K. A. 等, Fusion Proteins, 国际专利公布 WO 2006/059093 ;以及 Foster, K. A. 等, Non-Cytotoxic Protein Conjugates, 国际专利公布 WO 2006/059105, 各专利的全部内容以引用的方式并入本文。在另一实施方案中, 所检测的重靶向内肽酶活性来自与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :130 或 SEQ ID NO :131 的重靶向内肽酶具有例如至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 氨基酸同一性的重靶向内肽酶。

[0113] 在该实施方案的其它方面, 所检测的重靶向内肽酶活性来自相对于以下文献中公开的重靶向内肽酶具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个非连续氨基酸取代、缺失或添加的重靶向内肽酶 :Keith A. Foster 等, Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, 美国专利 5,989,545 ;Clifford C. Shone 等, Recombinant Toxin Fragments, 美国专利 6,461,617 ;Conrad P. Quinn 等, Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, 美国专利 6,632,440 ;Lance E. Steward 等, Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, 美国专利 6,843,998 ;Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, 美国专利公布 2002/0037833 ;Keith A. Foster 等, Inhibition of

Secretion from Non-neural Cells, 美国专利公布 2003/0180289 ;J.Oliver Dolly 等, Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570 ;Keith A.Foster 等, Re-targeted Toxin Conjugates, 国际专利公布 WO 2005/023309 ;Lance E.Steward 等, Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, 美国专利申请第 11/376,696 号 ;Steward, L.E. 等, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, 美国专利申请第 11/776,075 号 ;Dolly, J.O. 等, Activatable Clostridial Toxins, 美国专利申请第 11/829,475 号 ;Foster, K.A. 等, Fusion Proteins, 国际专利公布 WO 2006/059093 ;以及 Foster, K.A. 等, Non-Cytotoxic Protein Conjugates, 国际专利公布 WO 2006/059105, 各专利的全部内容以引用的方式并入本文。在该实施方案的其它方面, 所检测的重靶向内肽酶活性来自相对于 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :130 或 SEQ ID NO :131 的重靶向内肽酶具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个非连续氨基酸取代、缺失或添加的重靶向内肽酶。

[0114] 在该实施方案的其它方面, 所检测的重靶向内肽酶活性来自相对于以下文献中公开的重靶向内肽酶具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然重靶向内肽酶变体 :Keith A.Foster 等, Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, 美国专利 5,989,545 ;Clifford C.Shone 等, Recombinant Toxin Fragments, 美国专利 6,461,617 ;Conrad P.Quinn 等, Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, 美国专利 6,632,440 ;Lance E.Steward 等, Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, 美国专利 6,843,998 ;Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, 美国专利公布 2002/0037833 ;Keith A.Foster 等, Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, 美国专利公布 2003/0180289 ;J.Oliver Dolly 等, Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570 ;Keith A.Foster 等, Re-targeted Toxin Conjugates, 国际专利公布 WO 2005/023309 ;Lance E.Steward 等, Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, 美国专利申请第 11/376,696 号 ;Steward, L.E. 等, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, 美国专利申请第 11/776,075 号 ;Dolly, J.O. 等, Activatable Clostridial Toxins, 美国专利申请第 11/829,475 号 ;Foster, K.A. 等, Fusion Proteins, 国际专利公布 WO 2006/059093 ;以及 Foster, K.A. 等, Non-Cytotoxic Protein Conjugates, 国际专利公布 WO 2006/059105, 各专利的全部内容以引用的方式并入本文。在该实施方案的其它方面, 所检测的重靶向内肽酶活性来自相对于 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :130 或 SEQ ID NO :131 的重靶向内肽酶具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7

个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然重靶向内肽酶变体。

[0115] 在另一实施方案中,所检测的重靶向内肽酶活性来自阿片重靶向内肽酶。阿片重靶向内肽酶或阿片-TVEMP 的非限制性实例描述于例如以下文献中:Keith A.Foster 等,Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions,美国专利 5,989,545;J.Oliver Dolly 等,Activatable Recombinant Neurotoxins,美国专利 7,132,259;Stephan Donovan,Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain,美国专利 7,244,437;Stephan Donovan,Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain,美国专利 7,413,742;Stephan Donovan,Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain,美国专利 7,415,338;Lance E.Steward 等,Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use,美国专利 7,514,088;Keith A.Foster,Fusion Proteins,美国专利公布 2008/0064092;Keith A.Foster,Fusion Proteins,美国专利公布 2009/0035822;Lance E.Steward 等,Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use,美国专利公布 2009/0048431;Keith A.Foster,Non-Cytotoxic Protein Conjugates,美国专利公布 2009/0162341;Keith A.Foster 等,Re-targeted Toxin Conjugates,国际专利公布 WO 2005/023309;以及 Lance E.Steward,Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells,国际专利公布 WO 2008/008805;各专利的全部内容以引用的方式并入本文。

[0116] 在另一实施方案中,所检测的重靶向内肽酶活性来自甘丙肽重靶向内肽酶。甘丙肽重靶向内肽酶或甘丙肽-TVEMP 的非限制性实例描述于例如以下文献中:Steward, L.E. 等,Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capability and Enhanced Targeting Activity,美国专利申请第 11/776,043 号(2007 年 7 月 11 日);Steward, L.E. 等,Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells,美国专利申请第 11/776,052 号(2007 年 7 月 11 日);以及 Steward, L.E. 等,Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells,美国专利申请第 11/776,075 号(2007 年 7 月 11 日),各专利的全部内容以引用的方式并入本文。

[0117] 本发明的方面部分包括 SNAP-25。本文中使用的术语“SNAP-25”是指优先被重靶向内肽酶裂解的天然 SNAP-25 或非天然 SNAP-25。本文中使用的术语“优先裂解”是指重靶向内肽酶裂解 SNAP-25 的速率比重靶向内肽酶裂解任何其它底物的速率高至少一个数量级。在该实施方案的方面,重靶向内肽酶裂解 SNAP-25 的速率比重靶向内肽酶裂解任何其它底物的速率高至少两个数量级、至少三个数量级、至少四个数量级或至少五个数量级。

[0118] 本文中使用的术语“天然 SNAP-25”是指由天然过程产生的任何 SNAP-25,包括但不限于由翻译后修饰、替代剪接的转录物或自发突变产生的 SNAP-25 同种型以及 SNAP-25 亚型。天然 SNAP-25 包括但不限于 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:

14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24, 或者 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 中取代、缺失或添加例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个氨基酸得到的 SNAP-25。

[0119] 本文中使用的术语“非天然 SNAP-25”是指结构借助于人类操作进行修饰的任何 SNAP-25, 包括但不限于通过使用随机诱变或合理设计进行遗传工程改造而产生的 SNAP-25, 以及通过体外化学合成而产生的 SNAP-25。非天然 SNAP-25 的非限制性实例描述于以下文献中: 例如 Steward, L. E. 等, FRET Protease Assays for Clostridial Toxins, 美国专利 7,332,567; Fernandez-Salas 等, Lipophilic Dye-based FRET Assays for Clostridial Toxin Activity, 美国专利公布 2008/0160561, 各专利的全部内容以引用的方式并入本文。非天然 SNAP-25 可由 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 取代、缺失或添加例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个氨基酸。

[0120] 因此, 在一个实施方案中, SNAP-25 是天然 SNAP-25。在该实施方案的方面, SNAP-25 是 SNAP-25 同种型或 SNAP-25 亚型。在该实施方案的方面, 天然 SNAP-25 是 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 的天然 SNAP-25。在该实施方案的其它方面, SNAP-25 是与 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 具有例如至少 70% 氨基酸同一性、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 氨基酸同一性的天然 SNAP-25。

[0121] 在另一实施方案中, SNAP-25 是非天然 SNAP-25。在该实施方案的其它方面, SNAP-25 是与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3 或 SEQ ID NO :4 具有例如至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 氨基酸同一性的非天然 SNAP-25。在该实施方案的其它方面, SNAP-25 是相对于 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 具有例

如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个非连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然 SNAP-25。在该实施方案的其它方面, SNAP-25 是相对于 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然 SNAP-25。

[0122] SNAP-25 可以是内源性 SNAP-25 或外源性 SNAP-25。本文中使用的术语“内源性 SNAP-25”是指因为在细胞基因组内被自然编码而天然地存在于细胞中的 SNAP-25,使得细胞固有地表达 SNAP-25,无需外部来源的 SNAP-25 或外部来源的编码 SNAP-25 的遗传物质。内源性 SNAP-25 的表达可以利用或不利用环境刺激,例如细胞分化。根据定义,内源性 SNAP-25 只能是天然 SNAP-25 或其变体。例如,以下各确立细胞系将表达内源性 SNAP-25 : BE (2) -M17、Kelly、LA1-55n、N1E-115、N4TG3、N18、Neuro-2a、NG108-15、PC12、SH-SY5Y、SiMa、SK-N-DZ 和 SK-N-BE (2) -C。

[0123] 本文中使用的术语“外源性 SNAP-25”是指通过人类操作引入外部来源的 SNAP-25 或外部来源的编码 SNAP-25 的遗传物质而在细胞中表达的 SNAP-25。外源性 SNAP-25 的表达可以利用或不利用环境刺激,例如细胞分化。在非限制性实例中,来自确立细胞系的细胞可通过 SNAP-25 的瞬时转染或稳定转染来表达外源性 SNAP-25。作为另一非限制性实例中,来自确立细胞系的细胞可通过 SNAP-25 的蛋白质转染来表达外源性 SNAP-25。外源性 SNAP-25 可以是天然 SNAP-25 或其变体,或是非天然 SNAP-25 或其变体。

[0124] 因此,在一个实施方案中,来自确立细胞系的细胞表达内源性 SNAP-25。在该实施方案的方面,由来自确立细胞系的细胞表达的内源性 SNAP-25 是天然 SNAP-25。在该实施方案的其它方面,由来自确立细胞系的细胞表达的内源性 SNAP-25 是 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24。在该实施方案的其它方面,由来自确立细胞系的细胞表达的内源性 SNAP-25 是天然 SNAP-25,例如 SNAP-25 同种型或 SNAP-25 亚型。在该实施方案的其它方面,由来自确立细胞系的细胞表达的内源性 SNAP-25 是与 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 具有例如至少 70%氨基酸同一性、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%氨基酸同一性的天然 SNAP-25。

[0125] 在另一实施方案中,来自确立细胞系的细胞被瞬时地或稳定地工程改造成表达外源性 SNAP-25。在该实施方案的一方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时地或稳定地工程改造

成表达天然 SNAP-25。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时地或稳定地工程改造成表达 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 的天然 SNAP-25。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时地或稳定地工程改造成表达天然 SNAP-25,例如 SNAP-25 同种型或 SNAP-25 亚型。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时地或稳定地工程改造成表达与 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 具有例如至少 70% 氨基酸同一性、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 氨基酸同一性的天然 SNAP-25。

[0126] 在该实施方案另一方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达非天然 SNAP-25。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达与 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 具有例如至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 氨基酸同一性的非天然 SNAP-25。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达相对于 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个非连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然 SNAP-25。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达相对于 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23 或 SEQ ID NO :24 具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然 SNAP-25。

[0127] 可以使用检测 SNAP-25 在暴露于重靶向内肽酶之后的裂解情况的测定来评估细胞是表达内源性 SNAP-25 还是外源性 SNAP-25。在这些测定中,经过重靶向内肽酶处理之后,在表达 SNAP-25 的细胞中将检测到 SNAP-25 裂解产物的产生。特定蛋白印迹分析 (Western blot analysis) 的非限制性实例以及充分表征的试剂、条件和方案易于从供

应商获得,这些供应商包括但不限于:Amersham Biosciences, Piscataway, NJ ;Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA ;Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL ;Promega Corporation, Madison, WI,和 Stratagene, Inc., La Jolla, CA。应了解,这些以及类似的针对 SNAP-25 裂解的测定都可用于鉴别表达内源性 SNAP-25 或外源性 SNAP-25 的细胞。

[0128] 在非限制性实例中,可以使用蛋白印迹分析来测定重靶向内肽酶的摄取,该分析方法是使用可识别 SNAP-25 裂解产物或者裂解和未裂解形式的 SNAP-25 的抗体进行。适用于这些测定的 α -SNAP-25 抗体的实例包括但不限于 α -SNAP-25 小鼠单克隆抗体 SMI-81(Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD)、小鼠 α -SNAP-25 单克隆抗体 CI 71.1(Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、 α -SNAP-25 小鼠单克隆抗体 CI 71.2(Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、 α -SNAP-25 小鼠单克隆抗体 SP12(Abcam, Cambridge, MA)、 α -SNAP-25 兔多克隆抗血清 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、 α -SNAP-25 兔多克隆抗血清 (Abcam, Cambridge, MA) 和 α -SNAP-25 兔多克隆抗血清 S9684(Sigma, St Louis, MO)。

[0129] 本公开的方面部分包括重靶向内肽酶受体。本文中使用的术语“重靶向内肽酶受体”是指以引起重靶向内肽酶活性响应的方式优先与重靶向内肽酶按相互作用的天然重靶向内肽酶受体或非天然重靶向内肽酶受体。本文中使用的术语“优先相互作用”是指重靶向内肽酶对重靶向内肽酶受体的平衡解离常数 (KD) 比重靶向内肽酶对细胞表面上的任何其它受体的 KD 低至少一个数量级。平衡解离常数,一种度量重靶向内肽酶重靶向的内肽酶受体复合物可逆分离(解离)成其组分分子(即重靶向内肽酶和重靶向内肽酶受体)的倾向的特定类型的平衡常数,定义为平衡时 $KD = K_a/K_d$ 。缔合常数 (K_a) 定义为 $K_a = [C]/[L][R]$,且解离常数 (K_d) 定义为 $K_d = [L][R]/[C]$,其中 $[L]$ 等于重靶向内肽酶的摩尔浓度, $[R]$ 是重靶向内肽酶受体的摩尔浓度,且 $[C]$ 是内肽酶-受体复合物的摩尔浓度,且其中所有这些浓度都是当系统达到平衡时这些组分的浓度。解离常数越小,则重靶向内肽酶与其受体结合得越紧密,或者重靶向内肽酶与重靶向内肽酶受体之间的结合亲和力越高。在该实施方案的方面,重靶向内肽酶对其受体的解离常数比重靶向内肽酶对任何其它受体的解离常数低至少两个数量级、至少三个数量级、至少四个数量级或至少五个数量级。在该实施方案的其它方面,重靶向内肽酶优先与其受体相互作用的结合亲和力的平衡解离常数 (KD) 可以是例如 500nM 或更少、400nM 或更少、300nM 或更少、200nM 或更少、100nM 或更少。在该实施方案的其它方面,重靶向内肽酶优先与其受体相互作用的结合亲和力的平衡解离常数 (KD) 可以是例如 90nM 或更少、80nM 或更少、70nM 或更少、60nM、50nM 或更少、40nM 或更少、30nM 或更少、20nM 或更少、10nM 或更少。本文中使用的术语“引起重靶向内肽酶活性响应”是指重靶向内肽酶受体与重靶向内肽酶相互作用形成内肽酶/受体复合物且随后该复合物内化到细胞的细胞质中的能力。

[0130] 本文中使用的术语“天然重靶向内肽酶受体”是指由天然过程产生的任何重靶向内肽酶受体,包括但不限于由翻译后修饰、替代性剪接的转录物或自发突变产生的重靶向内肽酶受体同种型,以及重靶向内肽酶受体亚型。天然重靶向内肽酶受体包括但不限于:天然阿片受体,如阿片样受体 (opiate-like receptor 1, ORL1)、 δ -阿片受体 (DOR)、 κ -阿片受体 (KOR) 和 μ -阿片受体 (MOR),例如以下文献中描述的阿片受体:Christopher Evans 等, Opioid Receptor Genes, 美国专利 6, 265, 563 ;Christopher

Evans 等, Methods of Screening Modulators of Opioid Receptor Activity, 美国专利 6,432,652; Christopher Evans 等, Opioid Receptors and Methods of Use, 美国专利 7,282,563; 以及 Christopher Evans 等, Delta Opioid Receptor Proteins, 美国专利公布 2008/0219925, 各专利的全部内容据此以引用的方式并入本文。天然重靶向内肽酶受体的其它实例包括但不限于: 甘丙肽受体 1、甘丙肽受体 2 和甘丙肽受体 3。本领域中已知来自其它脊椎动物物种, 例如来自灵长类动物、母牛、狗、小鼠、大鼠、鸡和鱼等的天然阿片受体, 并且其可用于本说明书的各方面。

[0131] 天然 ORL1 包括但不限于: SEQ ID NO:25 和 SEQ ID NO:26, 或在 SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:26 中取代、缺失或添加例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个氨基酸得到的天然 ORL1。天然 DOR 包括但不限于: SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28, 或在 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 中取代、缺失或添加例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个氨基酸得到的天然 DOR。天然 KOR 包括但不限于: SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:30, 或在 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:30 中取代、缺失或添加例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个氨基酸得到的天然 KOR。天然 MOR 包括但不限于: SEQ ID NO:31, 或在 SEQ ID NO:31 中取代、缺失或添加例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个氨基酸得到的天然 MOR。

[0132] 天然甘丙肽受体 1 包括但不限于: SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137 和 SEQ ID NO:138, 或在 SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137 或 SEQ ID NO:138 中取代、缺失或添加例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个氨基酸得到的天然甘丙肽受体 1。天然甘丙肽受体 2 包括但不限于: SEQ ID NO:139, 或在 SEQ ID NO:139 中取代、缺失或添加例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个氨基酸得到的天然甘丙肽受体 2。天然甘丙肽受体 3 包括但不限于: SEQ ID NO:140, 或在 SEQ ID NO:140 中取代、缺失或添加例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个氨基酸得到的天然甘丙肽受体 3。

[0133] 本文中使用的术语“非天然靶向内肽酶受体变体”是指借助于人类操作或设计产生的任何重靶向内肽酶受体, 包括但不限于: 通过使用随机诱变或合理设计进行基因工程改造而产生的重靶向内肽酶受体, 以及通过化学合成而产生的重靶向内肽酶受体。非天然重靶向内肽酶受体变体的非限制性实例包括例如保守重靶向内肽酶受体变体、非保守重靶向内肽酶受体变体、重靶向内肽酶受体嵌合变体和活性重靶向内肽酶受体片段。

[0134] 本文中使用的术语“非天然重靶向内肽酶受体”是指结构借助于人类操作进行修饰的任何重靶向内肽酶受体,包括但不限于:通过使用随机诱变或合理设计通过基因工程改造而产生的重靶向内肽酶受体,以及通过体外化学合成而产生的重靶向内肽酶受体。非天然重靶向内肽酶受体可在 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139 或 SEQ ID NO:140 中取代、缺失或添加例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个氨基酸。

[0135] 因此,在一个实施方案中,重靶向内肽酶受体是天然重靶向内肽酶受体,例如 ORL1、DOR、KOR 或 MOR。在该实施方案的方面,重靶向内肽酶受体是重靶向内肽酶受体同种型或重靶向内肽酶受体亚型。在该实施方案的方面,天然重靶向内肽酶受体是 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 的天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,重靶向内肽酶受体是与 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 具有例如至少 70%氨基酸同一性、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%氨基酸同一性的天然重靶向内肽酶受体。

[0136] 在另一实施方案中,重靶向内肽酶受体是非天然重靶向内肽酶受体,例如经过基因工程改造的 ORL1、经过遗传工程改造的 DOR、经过遗传工程改造的 KOR 或经过遗传工程改造的 MOR。在该实施方案的其它方面,重靶向内肽酶受体是与 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 具有例如至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%氨基酸同一性的非天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,重靶向内肽酶受体是相对于 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个非连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,重靶向内肽酶受体是相对于 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然重靶向内肽酶受体。

[0137] 在另一实施方案中,重靶向内肽酶受体是天然重靶向内肽酶受体,例如甘丙肽受体 1、甘丙肽受体 2 或甘丙肽受体 3。在该实施方案的方面,重靶向内肽酶受体是重靶向内肽酶受体同种型或重靶向内肽酶受体亚型。在该实施方案的方面,天然重靶向内肽酶受体是 SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139 或 SEQ ID NO:140 的天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,重靶向内肽酶受体是与 SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139 或 SEQ ID NO:140 具有例如至少 70%氨基酸同一性、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%氨基酸同一性的天然重靶向内肽酶受体。

[0138] 在另一实施方案中,重靶向内肽酶受体是非天然重靶向内肽酶受体,例如经过遗传工程改造的甘丙肽受体 1、经过遗传工程改造的甘丙肽受体 2 或经过遗传工程改造的甘丙肽受体 3。在该实施方案的其它方面,重靶向内肽酶受体是与 SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139 或 SEQ ID NO:140 具有例如至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%氨基酸同一性的非天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,重靶向内肽酶受体是相对于 SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139 或 SEQ ID NO:140 具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个非连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,重靶向内肽酶受体是相对于 SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139 或 SEQ ID NO:140 具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然重靶向内肽酶受体。

[0139] 重靶向内肽酶受体可以是内源性重靶向内肽酶受体或外源性重靶向内肽酶受体。本文中使用的术语“内源性重靶向内肽酶受体”是指因为在细胞基因组中被天然编码而存在于细胞中的天然重靶向内肽酶受体,使得细胞固有地表达重靶向内肽酶受体,而无需外部来源的重靶向内肽酶受体或外部来源的编码重靶向内肽酶受体的遗传物质。内源性重靶向内肽酶受体的表达可以利用或不利用环境刺激,例如细胞分化或启动子活化。例如,以下确立细胞系将表达至少一种内源性重靶向内肽酶受体:AGN P33、Neuro-2a、SiMa 和 SK-N-DZ。内源性重靶向内肽酶受体只能是天然重靶向内肽酶受体或其天然变体。

[0140] 本文中使用的术语“外源性重靶向内肽酶受体”是指利用人类操作通过引入外部来源的重靶向内肽酶受体或外部来源的编码重靶向内肽酶受体的遗传物质而在细胞中表达的重靶向内肽酶受体。外源性重靶向内肽酶受体的表达可以利用或不利用环境刺激,例如细胞分化或启动子活化。在非限制性实例中,来自确立细胞系的细胞可通过编码例如 ORL1、DOR、KOR、MOR、甘丙肽受体 1、甘丙肽受体 2 或甘丙肽受体 3 等重靶向内肽酶受体的多核苷酸分子的瞬时或稳定转染来表达一种或多种外源性重靶向内肽酶受体。在另一非限制性实例中,来自确立细胞系的细胞可通过例如 ORL1、DOR、KOR、MOR、甘丙肽受体 1、甘丙肽受体 2 或甘丙肽受体 3 等重靶向内肽酶受体的蛋白质转染来表达一种或多种外源性重靶向内肽酶受体。外源性重靶向内肽酶受体可以是天然重靶向内肽酶受体或其天然变体,或者非天然重靶向内肽酶受体或其非天然变体。

[0141] 因此,在一个实施方案中,来自确立细胞系的细胞表达内源性重靶向内肽酶受体。在该实施方案的方面,由来自确立细胞系的细胞表达的内源性重靶向内肽酶受体是天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,由来自确立细胞系的细胞表达的内源性重靶向内肽酶受体是 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139 或 SEQ ID NO:140。在该实施方案的其它方面,由来自确立细胞系的细胞表达的内源性重靶向内肽酶受体是天然重靶向内肽酶受体,例如重靶向内肽酶受体同种型或重靶向内肽酶受体亚型。在该实施方案的其它方面,由来自确立细胞系的细胞表达的内源性重

靶向内肽酶受体是与 SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :136、SEQ ID NO :137、SEQ ID NO :138、SEQ ID NO :139 或 SEQ ID NO :140 具有例如至少 70% 氨基酸同一性、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 氨基酸同一性的天然重靶向内肽酶受体。

[0142] 在另一实施方案中,来自确立细胞系的细胞被瞬时地或稳定地工程改造成表达外源性重靶向内肽酶受体。在该实施方案的一方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时地或稳定地工程改造成表达天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时地或稳定地工程改造成表达 SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :136、SEQ ID NO :137、SEQ ID NO :138、SEQ ID NO :139 或 SEQ ID NO :140 的天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时地或稳定地工程改造成表达天然重靶向内肽酶受体,例如重靶向内肽酶受体同种型或重靶向内肽酶受体亚型。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时地或稳定地工程改造成表达与 SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :136、SEQ ID NO :137、SEQ ID NO :138、SEQ ID NO :139 或 SEQ ID NO :140 具有例如至少 70% 氨基酸同一性、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 氨基酸同一性的天然重靶向内肽酶受体。

[0143] 在该实施方案另一方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达非天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达与 SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :136、SEQ ID NO :137、SEQ ID NO :138、SEQ ID NO :139 或 SEQ ID NO :140 具有例如至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 氨基酸同一性的非天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达相对于 SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :136、SEQ ID NO :137、SEQ ID NO :138、SEQ ID NO :139 或 SEQ ID NO :140 具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个非连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然重靶向内肽酶受体。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达相对于 SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :136、SEQ ID NO :137、SEQ ID NO :138、SEQ ID NO :139 或 SEQ ID NO :140 具有例如 1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或多个、20 个或多个、30 个或多个、40 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个连续氨基酸取代、缺失或添加的非天然重靶向内肽酶受体。

[0144] 在另一实施方案中,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达外源性 ORL1、外源性 DOR、外源性 KOR、外源性 MOR 或其任何组合。在该实施方案的方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达天然 ORL1、天然 DOR、天然 KOR、天然 MOR 或其任何组合。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造

成表达非天然 ORL1、非天然 DOR、非天然 KOR、非天然 MOR 或其任何组合。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达天然 ORL1 或非天然 ORL1、天然 DOR 或非天然 DOR、天然 KOR 或非天然 KOR、天然 MOR 或非天然 MOR,或其任何组合。

[0145] 在另一实施方案中,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达外源性甘丙肽受体 1、外源性甘丙肽受体 2、外源性甘丙肽受体 3 或其任何组合。在该实施方案的方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达天然甘丙肽受体 1、天然甘丙肽受体 2、天然甘丙肽受体 3 或其任何组合。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达非天然甘丙肽受体 1、非天然甘丙肽受体 2、非天然甘丙肽受体 3 或其任何组合。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的细胞被瞬时或稳定地工程改造成表达天然甘丙肽受体 1 或非天然甘丙肽受体 1、天然甘丙肽受体 2 或非天然甘丙肽受体 2、天然甘丙肽受体 3 或非天然甘丙肽受体 3 或其任何组合。

[0146] 表达一种或多种内源性重靶向内肽酶受体或外源性重靶向内肽酶受体的细胞可以借助常规方法来鉴别,所述常规方法包括针对重靶向内肽酶摄取的直接测定和间接测定。可以使用测定重靶向内肽酶的结合或摄取特性的测定来评估细胞是否表达重靶向内肽酶受体。这些测定包括但不限于:使用例如 [125I] 重靶向内肽酶等标记重靶向内肽酶进行的交联测定,参见例如, Noriko Yokosawa 等, Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines, 57(1) Infect. Immun. 272-277(1989); Noriko Yokosawa 等, Binding of botulinum type C1, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes, 29(2) Toxicon 261-264(1991); 以及 Tei-ichi Nishiki 等, Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes, 269(14) J. Biol. Chem. 10498-10503(1994)。其它非限制性测定包括免疫细胞化学测定,其使用经过标记或未标记过的抗体来检测重靶向内肽酶的结合,参见例如, Atsushi Nishikawa 等, The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells, 319(2) Biochem. Biophys. Res. Commun. 327-333(2004); 以及免疫沉淀测定,参见例如, Yukako Fujinaga 等, Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes, 150(Pt 5) Microbiology 1529-1538(2004), 其使用经过标记或未标记过的抗体来检测结合的重靶向内肽酶。适用于这些测定的抗体包括但不限于:针对重靶向内肽酶选择的抗体和/或针对重靶向内肽酶受体选择的抗体,例如 ORL1、DOR、KOR、MOR、甘丙肽受体 1、甘丙肽受体 2 或甘丙肽受体 3。如果抗体经过标记,那么可采用本领域技术人员众所周知的技术,通过各种方式来检测分子的结合,包括蛋白印迹分析、抗体细胞定位的直接显微镜观察、洗涤步骤后细胞或底物结合的抗体的测量、流式细胞计量术、电泳或毛细管电泳。如果抗体未标记过,那么可以采用标记二抗间接检测结合的分子,而且该检测可以参照标记抗体的方式进行。应了解,这些和类似的测定重靶向内肽酶摄取特性或特征的测定可用于鉴别表达内源性重靶向内肽酶受体或外源性重靶向内肽酶受体的细胞。

[0147] 还可以使用监测暴露于重靶向内肽酶之后的分子释放情况的测定来评估细胞是否表达一种或多种内源性重靶向内肽酶受体或外源性重靶向内肽酶受体。在这些测定中,

在重靶向内肽酶处理之后,表达重靶向内肽酶受体的细胞中分子的释放将受到抑制。众所周知的测定包括测量神经元中放射标记的儿茶酚胺释放(例如 [3H] 去甲肾上腺素或 [3H] 多巴胺释放)的抑制的方法,参见例如, A Fassio 等, Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F, 90(3) Neuroscience 893-902(1999); 和 Sara Stigliani 等, The sensitivity of catecholamine release to botulinum toxin C1 and E suggests selective targeting of vesicles set into the readily releasable pool, 85(2) J. Neurochem. 409-421(2003); 或使用荧光测定程序测量儿茶酚胺释放的方法, 参见例如, Anton de Paiva 等, A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly, 268(28) J. Biol. Chem. 20838-20844 (1993); Gary W. Lawrence 等, Distinct exocytotic responses of intact and permeabilised chromaffin cells after cleavage of the 25-kDa synaptosomal-associated protein(SNAP-25) or synaptobrevin by botulinum toxin A or B, 236(3) Eur. J. Biochem. 877-886(1996); 和 Patrick Foran 等, Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release, 35(8) Biochemistry 2630-2636(1996)。其它非限制性实例包括测量如垂体前叶细胞或卵巢细胞等内分泌细胞中激素释放的抑制的测定。应了解, 这些和类似的针对分子释放的测定都可用于鉴别表达内源性重靶向内肽酶受体或外源性重靶向内肽酶受体或重靶向内肽酶受体的细胞。

[0148] 也可以使用检测 SNAP-25 底物暴露于重靶向内肽酶之后的裂解情况的测定来评估细胞是否表达一种或多种内源性重靶向内肽酶受体或外源性重靶向内肽酶受体。在这些测定中, 经过重靶向内肽酶处理后, 在表达重靶向内肽酶受体的细胞中将检测到 SNAP-25 裂解产物的产生或完整 SNAP-25 的消失。特定蛋白印迹分析的非限制性实例以及充分表征的试剂、条件和方案易于从供应商获得, 包括但不限于: Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI; 和 Stratagene, Inc., La Jolla, CA。应了解, 这些和类似的针对 SNAP-25 裂解的测定都可用于鉴别表达内源性重靶向内肽酶受体或外源性重靶向内肽酶受体的细胞。

[0149] 在非限制性实例中, 可以使用蛋白印迹分析来测定重靶向内肽酶的摄取, 该分析方法是使用可识别 SNAP-25 裂解产物或者 SNAP-25 的裂解和未裂解形式的抗体进行。适用于这些测定的 α -SNAP-25 抗体的实例包括但不限于: SMI-81 α -SNAP-25 小鼠单克隆抗体 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD)、CI 71.1 小鼠 α -SNAP-25 单克隆抗体 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、CI 71.2 α -SNAP-25 小鼠单克隆抗体 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、SP12 α -SNAP-25 小鼠单克隆抗体 (Abcam, Cambridge, MA)、 α -SNAP-25 兔多克隆抗血清 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、 α -SNAP-25 兔多克隆抗血清 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) 和 α -SNAP-25 兔多克隆抗血清 (Abcam, Cambridge, MA)。

[0150] 本公开的方面提供通过遗传操作或重组工程改造而表达外源性 SNAP-25 和 / 或一种或多种外源性重靶向内肽酶受体的细胞。适用于通过遗传操作或重组工程改造而表达外源性 SNAP-25 和 / 或一种或多种外源性重靶向内肽酶受体的细胞包括可能表达或不表达内源性 SNAP-25 和 / 或一种或多种内源性重靶向内肽酶受体的神经元细胞和非神经元细胞。还应了解, 这些经过基因操作或重组工程改造的细胞可以在构成性、组织特异性、细胞特异性或可诱导的启动子元件、增强子元件或二者的控制下表达外源性 SNAP-25 以及一种或多种外源性重靶向内肽酶受体。应了解, 任何细胞都可以使用, 只要细胞经过遗传操作或重组工程改造, 能够表达外源性 SNAP-25 和 / 或一种或多种外源性重靶向内肽酶受体, 并且能够经受重靶向内肽酶活性。

[0151] 适用于将某种外源性多核苷酸分子引入细胞中的方法包括但不限于: 化学物质介导的递送方法, 例如磷酸钙介导的递送方法、二乙基氨乙基 (DEAE) 葡聚糖介导的递送方法、脂质介导的递送方法、聚乙烯亚胺 (PEI) 介导的递送方法、聚赖氨酸介导的递送方法和聚凝胺介导的递送方法; 物理方式介导的递送方法, 例如基因枪递送、显微注射、原生质体融合和电穿孔; 和病毒介导的递送方法, 例如逆转录病毒介导的转染, 参见例如, *Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells*, 第 16.1-16.62 页 (Sambrook 和 Russell 编, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 第 3 卷, 第 3 版, 2001 年); Alessia Colosimo 等, *Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells*, 29(2) *Biotechniques* 314-318, 320-322, 324 (2000); Philip Washbourne 和 A. Kimberley McAllister, *Techniques for Gene Transfer into Neurons*, 12(5) *Curr. Opin. Neurobiol.* 566-573 (2002); 和 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, pp 9.16.4-9.16.11 页 (2000), 各文献的全部内容以引用的方式并入本文; 本方法中的外源性多核苷酸分子将编码使细胞经历整个细胞机制, 由此使重靶向内肽酶蛋白水解裂解如 SNAP-25、ORL1、DOR、KOR 或 MOR 等 SNAP-25 底物所需的组分。本领域的技术人员应了解, 将多核苷酸分子引入细胞中特定方法的选择将部分取决于细胞是暂时还是稳定地含有使细胞经历整个细胞机制, 由此使重靶向内肽酶通过蛋白水解裂解 SNAP-25 底物所需的组分。编码使细胞经历整个细胞机制, 由此使重靶向内肽酶通过酶蛋白水解裂解 SNAP-25 底物所需的组分的多核苷酸分子的非限制性实例如下: ORL1 多核苷酸分子 SEQ ID NO:61 或 SEQ ID NO:62; DOR 多核苷酸分子 SEQ ID NO:63 或 SEQ ID NO:64; KOR 多核苷酸分子 SEQ ID NO:65 或 SEQ ID NO:66; MOR 多核苷酸分子 SEQ ID NO:67; 甘丙肽受体 1 多核苷酸分子 SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142 或 SEQ ID NO:143; 甘丙肽受体 2 多核苷酸分子 SEQ ID NO:144 或甘丙肽受体 3 多核苷酸分子 SEQ ID NO:145; 以及 SNAP-25 多核苷酸分子 SEQ ID NO:68 或 SEQ ID NO:69。

[0152] 本领域技术人员众所周知化学物质介导的递送方法, 且这些方法描述于例如 Martin Jordan 和 Florian Worm, *Transfection of Adherent and Suspended Cells by Calcium Phosphate*, 33(2) *Methods* 136-143 (2004); Chun Zhang 等, *Polyethylenimine Strategies for Plasmid Delivery to Brain-Derived Cells*, 33(2) *Methods* 144-150 (2004), 各文献的全部内容据此以引用的方式并入本文。这些化学物质介导的递送方法可通过标准程序制备, 并且可以商购获得, 参见例如, CellPfect 转染试剂盒 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); 哺乳动物转染试剂盒、磷酸钙和 DEAE 葡聚

糖 (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) ;Lipofectamine™ 转染试剂 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) ;ExGen 500 转染试剂盒 (Fermentas, Inc., Hanover, MD) ;和 SuperFect 和 Effectene 转染试剂盒 (Qiagen, Inc., Valencia, CA)。

[0153] 本领域的普通技术人员众所周知物理方式介导的递送方法,且这些方法描述于例如 Jeike E.Biewenga 等, Plasmid-Mediated Gene Transfer in Neurons using the Biolistics Technique, 71(1) J. Neurosci. Methods. 67-75(1997) ;John O'Brien 和 Sarah C.R. Lummis, Biolistic and Diolistic Transfection: Using the Gene Gun to Deliver DNA and Lipophilic Dyes into Mammalian Cells, 33(2) Methods 121-125(2004) ; M.Golzio 等, In Vitro and In Vivo Electric Field-Mediated Permeabilization, Gene Transfer, and Expression, 33(2) Methods, 126-135(2004) ; 和 Oliver Gresch 等, New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells, 33(2) Methods, 151-163(2004), 各文献的全部内容据此以引用的方式并入本文。

[0154] 本领域的普通技术人员众所周知病毒介导的递送方法,且这些方法描述于例如 Chooi M.Lai 等, Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors, 21(12) DNA Cell Biol. 895-913(2002) ;Ilya Frolov 等, Alphavirus-Based Expression Vectors: Strategies and Applications, 93(21) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 11371-11377(1996) ; Roland Wolkowicz 等, Lentiviral Vectors for the Delivery of DNA into Mammalian Cells, 246, Methods Mol. Biol. 391-411(2004) ;A.Huser 和 C.Hofmann, Baculovirus Vectors: Novel Mammalian Cell Gene-Delivery Vehicles and Their Applications, 3(1) Am. J. Pharmacogenomics 53-63(2003) ;Tiziana Tonini 等, Transient Production of Retroviral-and Lentiviral-Based Vectors for the Transduction of Mammalian Cells, 285, Methods Mol. Biol. 141-148(2004) ;Manfred Gossen 和 Hermann Bujard, Tight Control of Gene Expression in Eukaryotic Cells by Tetracycline-Responsive Promoters, 美国专利第 5,464,758 号 ;Hermann Bujard 和 Manfred Gossen, Methods for Regulating Gene Expression, 美国专利第 5,814,618 号 ;David S.Hogness, Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same, 美国专利第 5,514,578 号 ;David S.Hogness, Polynucleotides Encoding Insect Ecdysone Receptor, 美国专利 6,245,531 ;Elisabetta Vegeto 等, Progesterone Receptor Having C-Terminal Hormone Binding Domain Truncations, 美国专利第 5,364,791 号 ;Elisabetta Vegeto 等, Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy, 美国专利第 5,874,534 号, 各专利文献的全部内容据此以引用的方式并入本文。这些病毒介导的递送方法可通过标准程序制备,并且可以商购获得,参见例如 ViraPower™ 腺病毒表达系统 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) 和 ViraPower™ 腺病毒表达系统使用说明 25-0543 A 版, Invitrogen Inc., (2002 年 7 月 15 日) ;以及 AdEasy™ 腺病毒载体系统 (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) 和 AdEasy™ 腺病毒载体系统使用说明 064004f, Stratagene, Inc. 此外,这些病毒递送系统也可以通过标准方法制备,并且可以商购获得,参见例如, BD™ Tet-Off 和 Tet-On 基因表达系统 (BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA) 和 BD™ Tet-Off 和 Tet-On 基因表达系统使用说明 PT3001-1, BD Biosciences Clontech(2003 年 3 月 14 日)、GeneSwitch™

系统 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) 和 GeneSwitch™ 系统 A 米非司酮调控的哺乳动物细胞表达系统 D 版, 25-0313, Invitrogen Inc., (2002 年 11 月 4 日); ViraPower™ 慢病毒表达系统 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) 和 ViraPower™ 慢病毒表达系统使用说明 25-0501E 版, Invitrogen Inc., (2003 年 12 月 8 日); 以及 Complete Control ® 逆转录病毒诱导哺乳动物表达系统 (Stratagene, La Jolla, CA) 和 Complete Control ® 逆转录病毒诱导哺乳动物表达系统使用说明, 064005e。

[0155] 因此, 在一个实施方案中, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞暂时含有编码使细胞经历整个细胞机制, 由此使重靶向内肽酶蛋白水解裂解 SNAP-25 底物所需的组分的多核苷酸分子。在另一实施方案中, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞暂时含有编码使细胞经历整个细胞机制, 由此使重靶向内肽酶蛋白水解裂解 SNAP-25 底物所需的多个组分的多核苷酸分子。在该实施方案的方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞暂时含有编码 ORL1、DOR、KOR、MOR 或 SNAP-25 的多核苷酸分子。在该实施方案的方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞暂时含有编码 ORL1 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :61 或 SEQ ID NO :62。在该实施方案的其它方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞暂时含有编码 DOR 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :63 或 SEQ ID NO :64。在该实施方案的其它方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞暂时含有编码 KOR 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :65 或 SEQ ID NO :66。在该实施方案的其它方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞暂时含有编码 MOR 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :67。

[0156] 在该实施方案的其它方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞暂时含有编码甘丙肽受体 1 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :141、SEQ ID NO :142 或 SEQ ID NO :143。在该实施方案的其它方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞暂时含有编码甘丙肽受体 2 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :144。在该实施方案的其它方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞暂时含有编码甘丙肽受体 3 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :145。在该实施方案的其它方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞暂时含有编码 SNAP-25 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :68 或 SEQ ID NO :69。

[0157] 在另一实施方案中, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞稳定含有编码使细胞经历整个细胞机制, 由此使重靶向内肽酶蛋白水解裂解 SNAP-25 底物所需的组分的多核苷酸分子。在另一实施方案中, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞稳定含有编码使细胞经历整个细胞机制, 由此使重靶向内肽酶蛋白水解裂解 SNAP-25 底物所需的多个组分的多核苷酸分子。在该实施方案的方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞稳定含有编码 ORL1、DOR、KOR、MOR 或 SNAP-25 的多核苷酸分子。在该实施方案的方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞稳定含有编码 ORL1 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :61 或 SEQ ID NO :62。在该实施方案的其它方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞稳定含有编码 DOR 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :63 或 SEQ ID NO :64。在该实施方案的其它方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞稳定含有编码 KOR 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :65 或 SEQ ID NO :66。在该实施方案的其它方面, 来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞稳定含有编码 MOR 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :67。

[0158] 在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞稳定含有编码甘丙肽受体 1 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :141、SEQ ID NO :142 或 SEQ ID NO :143。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞稳定含有编码甘丙肽受体 2 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :144。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞稳定含有编码甘丙肽受体 3 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :145。在该实施方案的其它方面,来自确立细胞系的对重靶向内肽酶活性敏感的细胞稳定含有编码 SNAP-25 的多核苷酸分子 SEQ ID NO :68 或 SEQ ID NO :69。

[0159] 如上文所提到的,可以在细胞中引入本说明书中公开的使细胞经历整个细胞机制,由此使重靶向内肽酶通过蛋白水解裂解如 SNAP-25、ORL1、DOR、KOR、MOR、甘丙肽受体 1、甘丙肽受体 2 或甘丙肽受体 3 等 SNAP-25 底物所需的外源性组分。可以使用任何和所有用于利用递送剂将此类外源性组分引入细胞群的方法,前提条件是此方法可暂时将本说明书中公开的外源性组分引入给定细胞群内至少 50% 的细胞中。因此,该实施方案的方面可包括细胞群,其中给定细胞群中例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80% 或至少 90% 暂时含有本说明书中公开的使细胞经历整个细胞机制,由此使重靶向内肽酶通过蛋白水解裂解如 SNAP-25、ORL1、DOR、KOR、MOR、甘丙肽受体 1、甘丙肽受体 2 或甘丙肽受体 3 等 SNAP-25 底物所需的外源性组分。本文中使用的术语“递送剂”是指使共价连接、非共价连接或以任何其它方式缔合的多肽内化到细胞中能够实现或增加的任何分子。因此,术语“递送剂”涵盖但不限于,(不限于)将共价或非共价连接的分子运输到细胞膜、细胞质或细胞核的蛋白质、肽、拟肽、小分子、多核苷酸分子、脂质体、脂质、病毒、逆转录病毒和细胞。还应了解,术语“递送剂”涵盖通过任何机制内化的分子,包括通过受体介导的胞吞作用起效的递送剂,以及不依靠受体介导的胞吞作用的递送剂。

[0160] 递送剂还可以是例如通过化学缀合或通过基因方法产生的融合蛋白,使如 SNAP-25、ORL1、DOR、KOR、MOR、甘丙肽受体 1、甘丙肽受体 2 或甘丙肽受体 3 等共价连接的组分的细胞摄取能够实现或增加的试剂。共价连接递送剂的方法和这些试剂的使用方法描述于例如以下专利文献中:Steven F. Dowdy, Protein Transduction System and Methods of Use Thereof, 国际公布第 WO 00/34308 号;Gérard Chassaing 和 Alain Prochiantz, Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules, 美国专利第 6,080,724 号;Alan Frankel 等, Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiety, 美国专利第 5,674,980 号;Alan Frankel 等, TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates, 美国专利第 5,747,641 号;Alan Frankel 等, TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins, 美国专利第 5,804,604 号;Peter F. J. O'Hare 等, Use of Transport Proteins, 美国专利第 6,734,167 号;Yao-Zhong Lin 和 Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, 美国专利第 5,807,746 号;Yao-Zhong Lin 和 Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, 美国专利第 6,043,339 号;Yao-Zhong Lin 等, Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, 美国专利第 6,248,558 号;Yao-Zhong Lin 等, Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, 美国专利第 6,432,680 号;Jack J. Hawiger 等, Method for Importing

Biologically Active Molecules into Cells, 美国专利第 6,495,518 号; Yao-Zhong Lin 等, Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, 美国专利第 6,780,843 号; Jonathan B. Rothbard 和 Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes, 美国专利第 6,306,993 号; Jonathan B. Rothbard 和 Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes, 美国专利第 6,495,663 号; 以及 Pamela B. Davis 等, Fusion Proteins for Protein Delivery, 美国专利第 6,287,817 号, 各专利的全部内容以引用的方式并入本文。

[0161] 递送剂也可以是使如 SNAP-25、ORL1、DOR、KOR、MOR、甘丙肽受体 1、甘丙肽受体 2 或甘丙肽受体 3 等非共价缩合的组分的细胞摄取能够实现或增加的试剂。在不存在共价键的情况下起作用的方法以及这些试剂的使用方法描述于例如以下文献中: Gilles Divita 等, Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use, 美国专利第 6,841,535 号; Philip L Felgner 和 Olivier Zelphati, Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use, 美国专利公布第 2003/0008813 号; 以及 Michael Karas, Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids, 美国专利公布 2004/0209797, 各专利的全部内容以引用的方式并入本文。这些肽递送剂可以通过标准方法制备和使用, 并且可商购获得, 参见例如 CHARIOT™ 试剂 (Active Motif, Carlsbad, CA); BIO-PORTER® 试剂 (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA)、BIO TREK™ 蛋白质递送剂 (Stratagene, La Jolla, CA) 和 PRO-JECT™ 蛋白质转染剂 (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL)。

[0162] 本发明的方面部分包括含重靶向内肽酶的样本。本文中使用的术语“含重靶向内肽酶的样本”是指含有或可能含有活性重靶向内肽酶的任何生物物质。根据本说明书中公开的方法, 可以测定多种样本, 包括但不限于: 纯化、部分纯化或未纯化的重靶向内肽酶; 具有天然或非天然序列的重组单链或双链重靶向内肽酶; 具有经修改的蛋白酶特异性的重组重靶向内肽酶; 具有变化的细胞特异性的重组重靶向内肽酶; 大量重靶向内肽酶; 经过配制的重靶向内肽酶产物; 以及例如细菌、酵母、昆虫或哺乳动物来源的细胞或粗制的、分级分离的或部分纯化的细胞裂解物; 血液、血浆或血清; 生食、半熟食、熟食或加工过的食物; 饮料; 动物饲料; 土壤样本; 水样本; 塘底泥; 洗剂; 化妆品; 和临床制剂。应了解, 术语样本涵盖组织样本, 包括但不限于: 哺乳动物组织样本、家畜组织样本, 例如绵羊、奶牛和猪的组织样本; 灵长类动物的组织样本; 和人类的组织样本。这些样本涵盖但不限于: 肠样本, 例如婴儿肠样本, 以及从创口获得的组织样本。在非限制性实例中, 可以使用检测皮摩尔量的重靶向内肽酶活性的方法来确定食物或饮料样本中重靶向内肽酶的存在或活性, 测定例如暴露于重靶向内肽酶或出现一种或多种肉毒中毒症状的人或动物的样本, 在大量重靶向内肽酶生产和纯化期间跟踪活性, 测定医药或化妆品应用中使用的经过配制的重靶向内肽酶产物, 或测定受试者血清中中和 α -重靶向内肽酶抗体的存在与否。

[0163] 因此, 在一个实施方案中, 含重靶向内肽酶的样本是包含任何量的重靶向内肽酶的样本。在该实施方案的方面, 含重靶向内肽酶的样本包含约 100ng 或更少、约 10ng 或更少、约 1ng 或更少、约 100pg 或更少、约 10pg 或更少或约 1pg 或更少的重靶向内肽酶。在该实施方案的其它方面, 含重靶向内肽酶的样本包含约 1 μ M 或更少、约 100nM 或更少、约 10nM

或更少、约 1nM 或更少、约 100nM 或更少、约 10nM 或更少、约 1nM 或更少的重靶向内肽酶。

[0164] 本发明的方面部分包括从经过处理的细胞中分离出包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 SNAP-25 组分。本文中使用的术语“包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 SNAP-25 组分”是指含有 SNAP-25 裂解产物的细胞组分。预期适于富集或分离 SNAP-25 组分的任何方法都可以使用，包括但不限于：细胞裂解方案、旋转柱纯化方案、免疫沉淀法、亲和纯化法和蛋白质色谱法。

[0165] 本公开的方面部分包括连接到固相载体的 α -SNAP-25 抗体。本文中使用的术语“固相载体”与“固相”同义，意思指可用于固定本说明书中公开的 α -SNAP-25 抗体的任何基质。固相载体的非限制性实例包括例如：试管；板；柱；针或“测验片 (dipstick)”；磁性粒子、珠粒或者其它球形或纤维性色谱分离介质，例如琼脂糖、琼脂糖凝胶、二氧化硅和塑料；以及薄片或膜，例如硝基纤维素和聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF)。可以使用如玻璃、碳、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙 (nylon)、重氮纤维素或淀粉等多种材料构造固相载体。所选固相载体的物理特性应使其易于与可溶性或未结合材料分开，且一般应使如过量试剂、反应副产物或溶剂等未结合材料能与结合固相载体的测定组分分开或以其它方式移除（例如通过洗涤、过滤、离心等）。制备和使用固相载体的方法的非限制性实例描述于例如：Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 同上文，(2001)；和 Current Protocols in Molecular Biology, 同上文，(2004) 中，各文献的全部内容据此以引用的方式并入本文。

[0166] 本发明的方面部分包括检测抗体-抗原复合物的存在，这种抗体-抗原复合物包含选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体和在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物。预期任何检测系统都可以用来实行该公开的基于免疫的方法的方面，前提是信噪比可达到使来自抗体-抗原复合物的信号与背景信号相区分的统计上显著程度。基于免疫的检测系统的非限制性实例包括免疫分析法，如蛋白印迹和斑点印迹法 (dot-blotting)、免疫沉淀分析法、酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 和夹心 ELISA。可以使用结合成像或光成像的放射自显影法 (AU)、化学发光 (chemiluminescence, CL)、电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL)、生物发光 (bioluminescence, BL)、荧光、共振能量转移、平面极化、比色或流式细胞计量术 (flow cytometry, FC) 实现信号的检测。基于免疫的检测系统的描述公开于例如以下文献中：Michael M. Rauhut, Chemiluminescence, Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Grayson 编，第 3 版，John Wiley and Sons, 1985)；A. W. Knight, A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenenerated Chemiluminescence, Trends Anal. Chem. 18(1)：47-62(1999)；K. A. Fahrnich, 等, Recent Applications of Electrogenenerated Chemiluminescence in Chemical Analysis, Talanta 54(4)：531-559(2001)；Commonly Used Techniques in Molecular Cloning, 第 A8.1-A8-55 页 (Sambrook 和 Russell 编, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第 3 卷, 第 3 版, 2001)；Detection Systems, 第 A9.1-A9-49 页 (Sambrook 和 Russell 编, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第 3 卷, 第 3 版, 2001)；Electrogenenerated Chemiluminescence (Allen J. Bard 编, Marcel Dekker Inc., 2004)，各文献的全部内容据此以引用的方式并入本文。

[0167] 夹心 ELISA (或夹心免疫测定) 是一种基于两种抗体的方法, 这两种抗体将结合抗原上的不同表位。对相关抗原具有高结合特异性的捕捉抗体结合于固体表面。然后加入抗原, 随后加入称为检测抗体的第二抗体。检测抗体结合抗原上与捕捉抗体所结合不同的表位。抗原因此“被夹在”两种抗体之间。抗体对抗原的结合亲和力通常是免疫测定灵敏度的主要决定因素。随着抗原浓度增加, 检测抗体的量也增加, 由此产生较高的测量响应。为定量结合程度, 可以使用不同报告系统, 例如连接第二抗体的酶, 和在酶促响应中形成被视为检测信号的读数的报告子底物。产生的信号与样本中存在的靶抗原的量成比例。用于测量结合事件的报告子底物将决定检测模式。测量光谱光度的读板器用于比色检测。已经开发出了化学发光和电化学发光底物, 其进一步扩大了信号, 并且可以在发光读取器上读出。报告子还可以是荧光读出器, 其中该测定的酶步骤被替换为荧光团, 且随后使用荧光读取器测量读出信号。进行 ECL 夹心 ELISA 所需的试剂和方案可商购获得, 包括但不限于: MSD 夹心 ELISA-ECL 检测平台 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)。

[0168] 因此, 在一个实施方案中, 可以使用免疫印迹分析法、免疫沉淀分析法、ELISA 或夹心 ELISA 来检测抗体-抗原复合物的存在, 这种抗体-抗原复合物包含选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 抗体, 以及在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物。在该实施方案的方面, 该检测是使用 AU、CL、ECL 或 BL 免疫印迹分析法; AU、CL、ECL、BL 或 FC 免疫沉淀分析法; AU、CL、ECL、BL 或 FC ELISA; 或者 AU、CL、ECL、BL 或 FC 夹心 ELISA 进行的。

[0169] 本公开的方面可以按单重或多重方式实行。按单重方式实行的用于检测重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法是一种只能检测包含 α -SNAP-25 抗体和在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物的抗体-抗原复合物的存在的方法。按多重方式实行的用于检测重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法是一种同时检测两种或两种以上抗体-抗原复合物的存在的方法; 其中一种抗体-抗原复合物是包含 α -SNAP-25 抗体和在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物的抗体-抗原复合物; 而另一种 (其它) 抗体-抗原复合物是针对第二、第三、第四等不同蛋白质的抗体-抗原复合物。第二蛋白质可以例如作为内对照, 以通过针对所检测的针对第二种蛋白质的抗体-抗原复合物的量将所检测的 α -SNAP-25/SNAP-25 抗体-抗原复合物的量归一化, 来使样本间的变化减到最少。因此, 第二蛋白质通常是始终由细胞表达的蛋白质, 例如管家蛋白 (house-keeping protein)。适用的第二蛋白质的非限制性实例包括例如 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH)、突触融合蛋白、细胞因子。按多重方式进行基于免疫的测定的方法描述于例如以下文献中: U. B. Nielsen 和 B. H. Geierstanger, Multiplexed Sandwich Assays in Microarray Format, J. Immunol. Methods. 290(1-2):107-120 (2004); R. Barry 和 M. Soloviev, Quantitative Protein Profiling using Antibody Arrays, Proteomics, 4(12):3717-3726 (2004); M. M. Ling 等, Multiplexing Molecular Diagnostics and Immunoassays using Emerging Microarray Technologies, Expert Rev Mol Diagn. 7(1):87-98 (2007); S. X. Leng 等, ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research, J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63(8):879-884 (2008), 各文献的全部内容据此以引用的方式并入本文。

[0170] 因此, 在一个实施方案中, 按单重方式实行的用于检测重靶向内肽酶活性的基于

免疫的方法只检测包含 α -SNAP-25 抗体和在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物的抗体-抗原复合物的存在。在另一实施方案中,按多重方式实行的用于检测重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法同时检测包含 α -SNAP-25 抗体和在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物以及至少一种针对除 SNAP-25 外的蛋白质(例如 GAPDH 或突触融合蛋白)的其它抗体-抗原复合物的抗体-抗原复合物存在。

[0171] 本公开的方面部分提供用于测定重靶向内肽酶免疫抗性的方法。本文中使用的术语“重靶向内肽酶免疫抗性”是指由于哺乳动物的免疫响应直接或间接降低了重靶向内肽酶疗法的功效,使得这种哺乳动物不对重靶向内肽酶疗法充分起反应,或显示出降低的重靶向内肽酶疗法的有益作用。功效降低的非限制性实例将出现在具有至少一种中和 α -重靶向内肽酶抗体的哺乳动物中,这种抗体以降低或阻止重靶向内肽酶的特异性或活性的方式结合重靶向内肽酶。本文中使用的术语“重靶向内肽酶疗法”是指以治疗、改善、治愈、愈合、康复或任何其它方式对抗需要使用重靶向内肽酶进行的神经调节的哺乳动物发生的不合需要的事件,或者对哺乳动物施用一种或多种控制剂量的具有医疗、治疗、治愈、化妆、补救和任何其它有益作用的重靶向内肽酶的药物、制剂或混合物。重靶向内肽酶疗法涵盖但不限于:使用其任何天然存在或经过修饰的片段组合任何载体或活性成分的任何制剂,并通过任何施用途施用。

[0172] 本公开的方面部分提供从哺乳动物中获得的用于测试 α -重靶向内肽酶中和抗体的存在与否的测试样本。本文中使用的术语“测试样本”是指含有或可能含有至少一种 α -重靶向内肽酶抗体的任何生物物质。 α -重靶向内肽酶抗体可以是中和 α -重靶向内肽酶抗体或非中和 α -重靶向内肽酶抗体。本文中使用的术语“中和 α -重靶向内肽酶抗体”是指在生理条件下将以一定方式结合重靶向内肽酶某一区域,从而降低或阻止重靶向内肽酶发挥其在重靶向内肽酶疗法中的作用的任何 α -重靶向内肽酶抗体。本文中使用的术语“非中和 α -重靶向内肽酶抗体”是指在生理条件下将结合重靶向内肽酶某一区域,但不阻止重靶向内肽酶发挥其在重靶向内肽酶疗法中的作用的任何 α -重靶向内肽酶抗体。预期可含有 α -重靶向内肽酶抗体的任何和所有样本都可以用于本方法中,包括但不限于:血液、血浆、血清和淋巴液。此外,能够产生针对重靶向内肽酶的 α -重靶向内肽酶抗体的任何和所有生物体都可用作样本来源,包括但不限于:鸟类和哺乳动物类,包括小鼠、大鼠、山羊、绵羊、马、驴、奶牛、灵长类动物和人类。有关血液采集和血清制备的具体方案的非限制性实例描述于例如以下文献中:Marjorie Schaub Di Lorenzo 和 Susan King Strasinger, Blood Collection in Healthcare (F. A. Davis Company, 2001); 以及 Diana Garza 和 Kathleen Becan-McBride, Phlebotomy Handbook: Blood Collection Essentials (Prentice Hall, 第 6 版, 2002)。这些方案属于本领域技术人员技能范围且是本文中教导的常规程序。测试样本可以在生物体暴露于重靶向内肽酶之前、单次重靶向内肽酶治疗后、多次重靶向内肽酶治疗后、重靶向内肽酶疗法抗性发生前或重靶向内肽酶疗法抗性发生后获得。

[0173] 本公开的方面部分提供对照样本。本文中使用的术语“对照样本”是指已知存在或不存在测试样本的任何样本,并且包括阴性对照样本和阳性对照样本。对于中和 α -重靶向内肽酶抗体,阴性对照样本可以从未曾暴露于重靶向内肽酶的个体获得,且可包括但

不限于：在经历重靶向内肽酶治疗前从提供测试样本的同一个体取得的样本；从未曾暴露于重靶向内肽酶的不同个体取得的样本；从未曾暴露于 BoNT/A 的多个不同个体取得的合并样本。对于中和 α -重靶向内肽酶抗体，阳性对照样本可以从表现重靶向内肽酶免疫抗性的个体获得，且包括但不限于：在基于患者的测试测定中测试呈阳性的个体；在体内生物测定中测试呈阳性的个体；和显示高免疫性的个体，例如接种过重靶向内肽酶的个体。

[0174] 还预期 α -重靶向内肽酶抗体可以由样本纯化得到。 α -重靶向内肽酶抗体可以使用多种程序由样本纯化得到，这些程序包括但不限于：蛋白质 A/G 色谱法和亲和色谱法。用于纯化样本中的抗体的具体方案的非限制性实例描述于例如以下文献中：ANTIBODIES :A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow 和 David Lane 编, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版, 1998) ;USING ANTIBODIES :A LABORATORY MANUAL :PORTABLE PROTOCOL No. I (Edward Harlow 和 David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998) ;和 MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 同上文, (2001), 这些文献据此以引用的方式并入本文。此外，抗体纯化方法以及充分表征的试剂、条件和方案的非限制性实例易于从供应商获得，包括但不限于：Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) ;和 Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA。这些方案是本领域技术人员技能范围内的常规程序。

[0175] 因此，在一个实施方案中，样本包含血液。在该实施方案的一方面，样本包含小鼠血、大鼠血、山羊血、绵羊血、马血、驴血、奶牛血、灵长类动物血或人血。在另一实施方案中，样本包含血浆。在该实施方案的一方面，测试样本包含小鼠血浆、大鼠血浆、山羊血浆、绵羊血浆、马血浆、驴血浆、奶牛血浆、灵长类动物血浆或人血浆。在另一实施方案中，样本包含血清。在该实施方案的一方面，样本包含小鼠血清、大鼠血清、山羊血清、绵羊血清、马血清、驴血清、奶牛血清、灵长类动物血清或人血清。在另一实施方案中，样本包含淋巴液。在该实施方案的一方面，样本包含小鼠淋巴液、大鼠淋巴液、山羊淋巴液、绵羊淋巴液、马淋巴液、驴淋巴液、奶牛淋巴液、灵长类动物淋巴液或人淋巴液。在另一实施方案中，样本为测试样本。在另一实施方案中，样本为对照样本。在该实施方案的方面，对照样本为阴性对照样本或阳性对照样本，

[0176] 本发明的方面部分提供在步骤 (d) 中检测到的在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的量与在步骤 (e) 中检测到的在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的量的比较。在一个实施方案中，测试样本中 SNAP-25 裂解产物的量高于对照样本中 SNAP-25 裂解产物的量。在该实施方案的一方面，测试样本中 SNAP-25 裂解产物的量高于阳性对照样本表明，哺乳动物具有较低重靶向内肽酶免疫抗性或缺乏重靶向内肽酶免疫抗性。在该实施方案的另一方面，测试样本中 SNAP-25 裂解产物的量与阴性对照样本相当表明，哺乳动物具有较低重靶向内肽酶免疫抗性或缺乏重靶向内肽酶免疫抗性。在另一实施方案中，测试样本中 SNAP-25 裂解产物的量低于对照样本中 SNAP-25 裂解产物的量。在该实施方案的一方面，测试样本中 SNAP-25 裂解产物的量比阳性对照样本低或与之相当将表明，哺乳动物具有增加的重靶向内肽酶免疫抗性或存在重靶向内肽酶免疫抗性。在该实施方案的另一方面，测试样本中 SNAP-25 裂解产物的量低于阴性对照样本表明，哺乳动物具有较高重靶向内肽酶免疫抗性或存在重靶向内肽酶免疫抗性。

[0177] 预期适于检测样本中中和 α -重靶向内肽酶抗体的存在的任何和所有测定条件都可用于本说明书中公开的方法,例如线性测定条件和非线性测定条件。在一个实施方案中,这些分析测定呈线性。在该实施方案的一方面,重靶向内肽酶的测定量是过量的。在该实施方案的另一方面,重靶向内肽酶的测定量是限速的。在该实施方案的另一方面,测试样本的测定量是限速的。

[0178] 本公开的方面也可描述如下:

[0179] 1. 一种用于检测重靶向内肽酶活性的方法,所述方法包括以下步骤:a) 用包含重靶向内肽酶的样本处理来自确立细胞系的细胞,其中来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感;b) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分,所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;c) 使 SNAP-25 组分与 α -SNAP-25 抗体接触,其中 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位;和 d) 检测抗体-抗原复合物的存在,所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物;其中抗体-抗原复合物的检测将指示重靶向内肽酶活性。

[0180] 2. 一种用于检测重靶向内肽酶活性的方法,所述方法包括以下步骤:a) 用包含重靶向内肽酶的样本处理来自确立细胞系的细胞,其中来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感;b) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分,所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;c) 使 SNAP-25 组分与连接到固相载体的 α -SNAP-25 抗体接触,其中 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位;和 d) 检测抗体-抗原复合物的存在,所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物;其中抗体-抗原复合物的检测将指示重靶向内肽酶活性。

[0181] 3. 一种用于检测重靶向内肽酶活性的方法,所述方法包括以下步骤:a) 用包含重靶向内肽酶的样本处理来自确立细胞系的细胞,其中来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感;b) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分,所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;c) 将 SNAP-25 组分固定于固相载体;d) 使 SNAP-25 组分与 α -SNAP-25 抗体接触,其中 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位;和 e) 检测抗体-抗原复合物的存在,所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物;其中抗体-抗原复合物的检测将指示重靶向内肽酶活性。

[0182] 4. 一种用于检测重靶向内肽酶活性的方法,所述方法包括以下步骤:a) 用包含重靶向内肽酶的样本处理来自确立细胞系的细胞,其中来自确立细胞系的细胞可摄取重靶向内肽酶;b) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分,所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;c) 使 SNAP-25 组分与 α -SNAP-25 抗体接触,其中 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位;和 d) 检测抗体-抗原复合物的存在,所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物;其中抗体-抗原复合物的检测将指示重靶向内肽酶活性。

[0183] 5. 一种用于检测重靶向内肽酶活性的方法,所述方法包括以下步骤:a) 用包含重靶向内肽酶的样本处理来自确立细胞系的细胞,其中来自确立细胞系的细胞可摄取重靶向内肽酶;b) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分,所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;c) 使 SNAP-25 组分与连接到固相载体的 α -SNAP-25 抗体接触,其中 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位;和 d) 检测抗体-抗原复合物的存在,所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物;其中抗体-抗原复合物的检测将指示重靶向内肽酶活性。

[0184] 6. 一种用于检测重靶向内肽酶活性的方法,所述方法包括以下步骤:a) 用包含重靶向内肽酶的样本处理来自确立细胞系的细胞,其中来自确立细胞系的细胞可摄取重靶向内肽酶;b) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分,所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;c) 将 SNAP-25 组分固定于固相载体;d) 使 SNAP-25 组分与 α -SNAP-25 抗体接触,其中 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位;和 e) 检测抗体-抗原复合物的存在,所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物;其中抗体-抗原复合物的检测将指示重靶向内肽酶活性。

[0185] 7. 一种用于测定哺乳动物的重靶向内肽酶免疫抗性的方法,其包括以下步骤:a) 将重靶向内肽酶加入从哺乳动物中获得的用于测试 α -重靶向内肽酶中和抗体的存在与否的测试样本中;b) 用测试样本处理来自确立细胞系的细胞,其中来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶活性敏感;c) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分,所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;d) 使 SNAP-25 组分与 α -SNAP-25 抗体接触,其中所述 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位;e) 检测抗体-抗原复合物的存在,所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物;f) 用阴性对照样本代替测试样本,重复步骤 b-e,阴性对照样本包含重靶向内肽酶以及已知不含 α -重靶向内肽酶中和抗体的血清;和 g) 将步骤 e 中检测到的抗体-抗原复合物的量与步骤 f 中检测到的抗体-抗原复合物的量相比较,其中检测出步骤 e 中检测到的抗体-抗原复合物的量少于步骤 f 中检测到的抗体-抗原复合物的量,就指示存在 α -重靶向内肽酶中和抗体。

[0186] 8. 一种用于测定哺乳动物的重靶向内肽酶免疫抗性的方法,其包括以下步骤:a) 将重靶向内肽酶加入从哺乳动物中获得的用于测试 α -重靶向内肽酶中和抗体的存在与否的测试样本中;b) 用测试样本处理来自确立细胞系的细胞,其中来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶活性敏感;c) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分,所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;d) 使 SNAP-25 组分与连接到固相载体的 α -SNAP-25 抗体接触,其中所述 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位;e) 检测抗体-抗原复合物的存在,所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物;f) 用阴性对照样本代替测试样本,重复步骤 b-e,阴性对照样本包含重靶向内肽酶以及已知不含 α -重靶向内肽酶中和抗体的血清;和 g) 将步骤 e 中检测到的抗体-抗原复合

物的量与步骤 f 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量相比较, 其中检测出步骤 e 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量少于步骤 f 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量, 就指示存在 α - 重靶向内肽酶中和抗体。

[0187] 9. 一种用于测定哺乳动物的重靶向内肽酶免疫抗性的方法, 其包括以下步骤: a) 将重靶向内肽酶加入从哺乳动物中获得的用于测试 α - 重靶向内肽酶中和抗体的存在与否的测试样本中; b) 用测试样本处理来自确立细胞系的细胞, 其中来自确立细胞系的细胞对重靶向内肽酶活性敏感; c) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分, 所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物; d) 将 SNAP-25 组分固定于固相载体; e) 使 SNAP-25 组分与 α - SNAP-25 抗体接触, 其中所述 α - SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位; f) 检测抗体 - 抗原复合物的存在, 所述抗体 - 抗原复合物包含 α - SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物; g) 用阴性对照样本代替测试样本, 重复步骤 b-f, 阴性对照样本包含重靶向内肽酶以及已知不含 α - 重靶向内肽酶中和抗体的血清; 和 h) 将步骤 f 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量与步骤 g 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量相比较, 其中检测出步骤 f 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量少于步骤 g 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量, 就指示存在 α - 重靶向内肽酶中和抗体。

[0188] 10. 一种用于测定哺乳动物的重靶向内肽酶免疫抗性的方法, 其包括以下步骤: a) 将重靶向内肽酶加入从哺乳动物中获得的用于测试 α - 重靶向内肽酶中和抗体的存在与否的测试样本中; b) 用测试样本处理来自确立细胞系的细胞, 其中来自确立细胞系的细胞可摄取重靶向内肽酶; c) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分, 所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物; d) 使 SNAP-25 组分与 α - SNAP-25 抗体接触, 其中所述 α - SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位; e) 检测抗体 - 抗原复合物的存在, 所述抗体 - 抗原复合物包含 α - SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物; f) 用阴性对照样本代替测试样本, 重复步骤 b-e, 阴性对照样本包含重靶向内肽酶以及已知不含 α - 重靶向内肽酶中和抗体的血清; 和 g) 将步骤 e 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量与步骤 f 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量相比较, 其中检测出步骤 e 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量少于步骤 f 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量, 就指示存在 α - 重靶向内肽酶中和抗体。

[0189] 11. 一种用于测定哺乳动物的重靶向内肽酶免疫抗性的方法, 其包括以下步骤: a) 将重靶向内肽酶加入从哺乳动物中获得的用于测试 α - 重靶向内肽酶中和抗体的存在与否的测试样本中; b) 用测试样本处理来自确立细胞系的细胞, 其中来自确立细胞系的细胞可摄取重靶向内肽酶; c) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分, 所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物; d) 使 SNAP-25 组分与连接到固相载体的 α - SNAP-25 抗体接触, 其中所述 α - SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位; e) 检测抗体 - 抗原复合物的存在, 所述抗体 - 抗原复合物包含 α - SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物; f) 用阴性对照样本代替测试样本, 重复步骤 b-e, 阴性对照样本包含重靶向内肽酶以及已知不含 α - 重靶向内肽酶中和抗体的血清; 和 g) 将步骤 e 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量与步骤 f 中检测到的抗体 - 抗原复合物的量相比较, 其中检测出步骤 e 中检测到的

抗体-抗原复合物的量少于步骤 f 中检测到的抗体-抗原复合物的量,就指示存在 α -重靶向内肽酶中和抗体。

[0190] 12. 一种用于测定哺乳动物的重靶向内肽酶免疫抗性的方法,其包括以下步骤:
a) 将重靶向内肽酶加入从哺乳动物获得的用于测试 α -重靶向内肽酶中和抗体的存在与否的测试样本中;b) 用测试样本处理来自确立细胞系的细胞,其中来自确立细胞系的细胞可摄取重靶向内肽酶;c) 从经过处理的细胞中分离出 SNAP-25 组分,所述 SNAP-25 组分包含在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物;d) 将 SNAP-25 组分固定于固相载体;e) 使 SNAP-25 组分与 α -SNAP-25 抗体接触,其中所述 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处包含羧基末端的表位;f) 检测抗体-抗原复合物的存在,所述抗体-抗原复合物包含 α -SNAP-25 抗体和 SNAP-25 裂解产物;g) 用阴性对照样本代替测试样本,重复步骤 b-f,阴性对照样本包含重靶向内肽酶以及已知不含 α -重靶向内肽酶中和抗体的血清;和 h) 将步骤 f 中检测到的抗体-抗原复合物的量与步骤 g 中检测到的抗体-抗原复合物的量相比较,其中检测出步骤 f 中检测到的抗体-抗原复合物的量少于步骤 g 中检测到的抗体-抗原复合物的量,就指示存在 α -重靶向内肽酶中和抗体。

[0191] 13. 根据 1 至 3 和 7 至 9 所述的方法,其中所述细胞对约 500nM 或更少、约 400nM 或更少、约 300nM 或更少、约 200nM 或更少、约 100nM 或更少的重靶向内肽酶的重靶向内肽酶活性敏感。

[0192] 14. 根据 4 至 6 和 10 至 12 所述的方法,其中所述细胞可摄取约 500nM 或更少、约 400nM 或更少、约 300nM 或更少、约 200nM 或更少、约 100nM 或更少的重靶向内肽酶。

[0193] 15. 根据 1 至 6 所述的方法,其中所述样本包含约 100ng 或更少、约 10ng 或更少、约 1ng 或更少、100fg 或更少、10fg 或更少或者 1fg 或更少的重靶向内肽酶。

[0194] 16. 根据 1 至 6 所述的方法,其中所述样本包含约 100nM 或更少、约 10nM 或更少、约 1nM 或更少、约 100nM 或更少、约 10nM 或更少、约 1nM 或更少、约 0.5nM 或更少或者约 0.1nM 或更少的重靶向内肽酶。

[0195] 17. 根据 1 至 12 所述的方法,其中所述抗体-抗原复合物的存在是通过免疫印迹分析法、免疫沉淀分析法、ELISA 或夹心 ELISA 检测。

[0196] 18. 根据 1 至 12 所述的方法,其中所述方法在下渐近线的信噪比为至少 3 : 1、至少 5 : 1、至少 10 : 1、至少 20 : 1、至少 50 : 1 或至少 100 : 1。

[0197] 19. 根据 1 至 12 所述的方法,其中所述方法在上渐近线的信噪比为至少 10 : 1、至少 20 : 1、至少 50 : 1、至少 100 : 1、至少 200 : 1、至少 300 : 1、至少 400 : 1、至少 500 : 1 或至少 600 : 1。

[0198] 20. 根据 1 至 12 所述的方法,其中所述方法可检测例如至少 100ng、至少 50ng、至少 10ng、至少 5ng、至少 100pg、至少 50pg、至少 10pg、至少 5pg、至少 100fg、至少 50fg、至少 10fg 或至少 5fg 的重靶向内肽酶的 EC_{50} 活性。

[0199] 21. 根据 1 至 12 所述的方法,其中所述方法可检测例如至少 10nM、至少 5nM、至少 100nM、至少 50nM、至少 10nM、至少 5nM、至少 1nM、至少 0.5nM 或至少 0.1nM 的重靶向内肽酶的 EC_{50} 活性。

[0200] 22. 根据 1 至 12 所述的方法,其中所述方法的 LOD 为例如 10pg 或更少、9pg 或更

少、8pg 或更少、7pg 或更少、6pg 或更少、5pg 或更少、4pg 或更少、3pg 或更少、2pg 或更少、1pg 或更少的重靶向内肽酶。

[0201] 23. 根据 1 至 12 所述的方法,其中所述方法的 LOD 为例如 100nM 或更少、90nM 或更少、80nM 或更少、70nM 或更少、60nM 或更少、50nM 或更少、40nM 或更少、30nM 或更少、20nM 或更少或者 10nM 或更少的重靶向内肽酶。

[0202] 24. 根据 1 至 12 所述的方法,其中所述方法的 LOQ 为例如 10pg 或更少、9pg 或更少、8pg 或更少、7pg 或更少、6pg 或更少、5pg 或更少、4pg 或更少、3pg 或更少、2pg 或更少、1pg 或更少的重靶向内肽酶。

[0203] 25. 根据 1 至 12 所述的方法,其中所述方法的 LOQ 为例如 100nM 或更少、90nM 或更少、80nM 或更少、70nM 或更少、60nM 或更少、50nM 或更少、40nM 或更少、30nM 或更少、20nM 或更少或者 10nM 或更少的重靶向内肽酶。

[0204] 26. 根据 1 至 12 所述的方法,其中所述方法可将具有完全活性的重靶向内肽酶与活性是具有完全活性的重靶向内肽酶 A 的 70%或更少、60%或更少、50%或更少、40%或更少、30%或更少、20%或更少或者 10%或更少的具有部分活性的重靶向内肽酶区分开来。

[0205] 27. 根据 1 至 12 所述的方法,其中所述 α -SNAP-25 抗体结合 SNAP-25 裂解产物中在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处包含羧基末端的表位。

[0206] 28. 根据 27 所述的方法,其中所述 α -SNAP-25 抗体对 SNAP-25 裂解产物中不包含所述 BoNT/A 裂解位点易分裂键的羧基末端谷氨酰胺的表位的缔合速率常数小于 $1 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$;且其中所述 α -SNAP-25 抗体对所述表位的平衡解离常数小于 0.450nM。

[0207] 29. 根据 27 所述的方法,其中所述分离的 α -SNAP-25 抗体具有包含选自 SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:80 和 SEQ ID NO:82 组成的组的氨基酸序列的重链可变区;和包含选自 SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:90 和 SEQ ID NO:92 组成的组的氨基酸序列的轻链可变区。

[0208] 30. 根据 27 所述的方法,其中所述分离的 α -SNAP-25 抗体至少包含具有 SEQ ID NO:93 的 V_H CDR1、具有 SEQ ID NO:94 的 V_H CDR1、具有 SEQ ID NO:95 的 V_H CDR1、具有 SEQ ID NO:118 的 V_H CDR1、具有 SEQ ID NO:119 的 V_H CDR1 或具有 SEQ ID NO:120 的 V_H CDR1。

[0209] 32. 根据 27 所述的方法,其中所述分离的 α -SNAP-25 抗体至少包含具有 SEQ ID NO:96 的 V_H CDR2、具有 SEQ ID NO:97 的 V_H CDR2、具有 SEQ ID NO:98 的 V_H CDR2、具有 SEQ ID NO:99 的 V_H CDR2、具有 SEQ ID NO:121 的 V_H CDR2、具有 SEQ ID NO:122 的 V_H CDR2 或具有 SEQ ID NO:123 的 V_H CDR2。

[0210] 33. 根据 27 所述的方法,其中所述分离的 α -SNAP-25 抗体至少包含具有 SEQ ID NO:100 的 V_H CDR3、具有 SEQ ID NO:101 的 V_H CDR3、具有 SEQ ID NO:102 的 V_H CDR3 或具有 SEQ ID NO:124 的 V_H CDR3。

[0211] 34. 根据 27 所述的方法,其中所述分离的 α -SNAP-25 抗体至少包含具有 SEQ ID NO:103 的 V_L CDR1、具有 SEQ ID NO:104 的 V_L CDR1、具有 SEQ ID NO:105 的 V_L CDR1、具有 SEQ ID NO:106 的 V_L CDR1、具有 SEQ ID NO:107 的 V_L CDR1、具有 SEQ ID NO:125 的 V_L CDR1、具有 SEQ ID NO:126 的 V_L CDR1、具有 SEQ ID NO:127 的 V_L CDR1、具有 SEQ ID NO:128 的 V_L CDR1 或具有 SEQ ID NO:129 的 V_L CDR1。

[0212] 35. 根据 27 所述的方法,其中所述分离的 α -SNAP-25 抗体至少包含具有 SEQ ID

NO:108 的 V_L CDR2、具有 SEQ ID NO:109 的 V_L CDR2、具有 SEQ ID NO:110 的 V_L CDR2、具有 SEQ ID NO:111 的 V_L CDR2 或具有 SEQ ID NO:112 的 V_L CDR2。

[0213] 36. 根据 27 所述的方法,其中所述分离的 α -SNAP-25 抗体至少包含具有 SEQ ID NO:113 的 V_L CDR3、具有 SEQ ID NO:114 的 V_L CDR3、具有 SEQ ID NO:115 的 V_L CDR3、具有 SEQ ID NO:116 的 V_L CDR3 或具有 SEQ ID NO:117 的 V_L CDR3。

[0214] 37. 根据 27 所述的方法,其中所述分离的 α -SNAP-25 抗体包含重链可变区,其包含 SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:121 和 SEQ ID NO:100;和轻链可变区,其包含 SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:110 和 SEQ ID NO:115。

[0215] 38. 根据 27 所述的方法,其中所述分离的 α -SNAP-25 抗体选择性结合具有 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:147 或 SEQ ID NO:148 的 SNAP-25 表位。

[0216] 39. 根据 27 所述的方法,其中所述分离的 α -SNAP-25 抗体选择性结合具有 SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:44 的 SNAP-25 表位。

实施例

[0217] 实施例 I

[0218] 筛选用于表达内源性重靶向内肽酶受体的候选细胞系

[0219] 以下实施例说明如何鉴别拥有开发基于细胞的效力测定所需的重靶向内肽酶摄取能力的确立细胞系。

[0220] 1. 候选细胞系储备培养物的生长。

[0221] 为生长细胞系,将适合密度的来自所测试的细胞系的细胞接种于含有 30mL 适合的生长培养基(参见表 1)的 162cm² 组织培养烧瓶中,并使其在 37℃ 培养箱中于 5% 或 10% 二氧化碳下生长,直到细胞达到所需密度。

[0222]

表 1.细胞系筛选中所用的培养基.

[0223]

细胞系	血清生长培养基组成
SiMa 和 SiMa 克隆	RPMI 1640、10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素、2 mM L-谷氨酰胺
PC12	RPMI 1640、5%热灭活胎牛血清、10%马血清、2 mM GlutaMAX™、10 mM HEPES、1 mM 丙酮酸钠、1%青霉素-链霉素
N18 ND8/34 NG108-15	90% DMEM、10%热灭活胎牛血清、2 mM 谷氨酰胺、2 mM 葡萄糖
SK-N-DZ SK-N-F1 SK-N-SH	90% DMEM、10%热灭活胎牛血清、4 mM 谷氨酰胺、4 mM 葡萄糖、0.1 mM 非必需氨基酸、1.5 g/L NaHCO ₃
BE(2)-C SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM(11090-081、Gibco)、Ham's F12 (11765-054, Gibco)、10%热灭活胎牛血清、2 mM 谷氨酰胺、0.1 mM 非必需氨基酸
ND3、ND7、 ND15	含 2 mM 谷氨酰胺(Invitrogen, 目录号 11885)、10%胎牛血清(Invitrogen, 目录号 16140)和 1×抗生素/抗真菌剂的 DMEM 培养基
Neuro-2a	EMEM、10%热灭活胎牛血清、2 mM 谷氨酰胺、0.1 mM 非必需氨基酸、1.5 g/L NaHCO ₃ 、1 mM 丙酮酸钠

[0224] 2. 筛选在细胞表面上表达靶受体的细胞。

[0225] 使用流式细胞计量术和 / 或配体结合测定筛选存在所需靶受体的细胞系。尽管以下实施例使用试剂来鉴别质膜中的阿片或阿片样受体,但也可以使用下文公开的方法来鉴别任何重靶向内肽酶的同源受体。

[0226] a. 使用流式细胞计量术鉴别细胞系。

[0227] 为鉴别包含在细胞表面上表达重靶向内肽酶靶受体的细胞的确立细胞系,进行流式细胞计量术分析。如第 1 部分中所述,使每一候选细胞系的细胞生长,用胰蛋白酶

处理,在包含 $1\times\text{PBS}$ 、 0.5% BSA 的染色缓冲液中洗涤,并在 1200rpm 下离心 3 分钟。将球状细胞再悬浮于染色缓冲液中,并将约 2.0×10^6 个细胞转移到新试管中,每种测试的受体使用两个试管。为针对阿片或阿片样受体的存在进行筛选,将约 $2.0\mu\text{L}$ 到 $5.0\mu\text{L}$ $\alpha\text{-ORL-1}$ RA14133 (Neuromics, Edina, MN)、 $\alpha\text{-DOR}$ 兔多克隆抗体 RA10101 (Neuromics, Edina, MN)、 $\alpha\text{-KOR}$ 兔多克隆抗体 RA10103 (Neuromics, Edina, MN) 或 $\alpha\text{-MOR}$ 兔多克隆抗体 RA10104 (Neuromics, Edina, MN) 加入一个试管中,并在 4°C 下孵育混合物 1 小时。在无任何抗体的情况下,将第二个试管在 4°C 下孵育 1 小时,并用作阴性对照物。在抗体孵育后,将 1.0mL 染色缓冲液加入各试管中,并在 1200rpm 下离心 3 分钟。再用 1.0mL 染色缓冲液洗涤细胞小球 1 次。将细胞小球再悬浮于 $200\mu\text{L}$ 染色缓冲液中,并将 $2.0\mu\text{L}$ 山羊抗兔 IgG FITC 抗体加入各试管中,并在 4°C 下于暗处孵育 1 小时。在与二抗一起孵育后,将 1.0mL 染色缓冲液加入各试管中,并在 1200rpm 下离心 3 分钟。再用 1.0mL 染色缓冲液洗涤细胞小球 1 次,并将小球再悬浮于 $500\mu\text{L}$ 染色缓冲液中。使用流式细胞计数器分析样本,且数据呈现为抗受体抗体染色覆盖在兔 IgG FITC 染色上的情形。

[0228] 结果表明,在所测试的细胞系中,ORL-1 在约 50% 的构成确立细胞系 SiMa、SiMa P > 33、克隆 H10、ND7 和 SK-N-DZ 的细胞的细胞表面上表达;在介于约 25% 到约 50% 之间的构成确立细胞系 SH-SY5Y 和 ND15 的细胞的细胞表面上表达;且在不到约 25% 的构成确立细胞系 ND3、ND8、N18 和 Neuro-2a 的细胞的细胞表面上表达(表 2)。结果还表明,KOR 在约 50% 的构成确立细胞系 SH-SY5Y 和 ND7 的细胞的细胞表面上表达;在介于约 25% 到约 50% 之间的构成确立细胞系 SiMa 克隆 H10、SiMa P > 33、ND15 和 Neuro-2a 的细胞的细胞表面上表达;且在不到约 25% 的构成确立细胞系 ND3、ND8 和 N18 的细胞的细胞表面上表达(表 2)。结果同时还揭露,MOR 在约 50% 的构成确立细胞系 ND7、ND15 和 SiMa P > 33 的细胞的细胞表面上表达;在介于约 25% 到约 50% 之间的构成确立细胞系 SH-SY5Y、SiMa 克隆 H10、ND8 和 Neuro-2a 的细胞的细胞表面上表达;且在不到约 25% 的构成确立细胞系 ND3 和 N18 的细胞的细胞表面上表达(表 2)。 $\alpha\text{-DOR}$ 兔多克隆抗体 RA10101 无法适宜地工作,并且产生不可用的数据。

[0229] b. 使用配体结合鉴别细胞系。

[0230] 为鉴别包含在细胞表面上表达重靶向内肽酶靶受体的细胞的确立细胞系,进行配体结合分析。将来自欲测试的候选细胞系的细胞接种于黑色透明底的 96 孔板上,孵育约 4 小时以促进附着。为针对阿片或阿片样受体的存在进行筛选,随后从各孔中抽吸出培养基,并用含 0 (未处理的对照物)、 0.001nM 、 0.01nM 、 0.1nM 或 1nM FAM- 痛敏肽 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA), 或含 0 (未处理的对照物)、 0.001nM 、 0.01nM 、 0.1nM 或 1nM FAM- 强啡肽 A (dynorphin A) (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA) 的 $50\mu\text{L}$ 配体溶液替换。在 37°C 培养箱中 5% 二氧化碳下将细胞与配体溶液一起孵育 1 小时。通过用 $100\mu\text{L}$ 的 $1\times\text{PBS}$ 洗涤细胞 3 次来洗涤细胞,以除去未结合的配体。在 Typhoon (Ex 488 且 Em 520nm) 上扫描板,随后在 M5 读板器 (Ex 495 且 Em 520nm) 上读取板中的 RFU 信号。结果表明,构成确立细胞系 SiMa 克隆 H10、SH-SY5Y 和 SK-N-DZ 的细胞结合痛敏肽,而构成 SiMa 克隆 H10 的细胞还结合强啡肽(表 2)。

[0231]

表 2. 在细胞表面上表达靶受体的细胞系

靶受体	鉴别的细胞系				
	流式细胞计量术			配体结合	
	超过 50% 表达	25% 到 50% 表达	不到 50% 表达	痛敏肽	强啡肽 A
ORL-1	AGN P33、 SiMa、SiMa 克隆 H10、ND7、 SK-N-DZ	SH-SY5Y、 ND15	ND3、 ND8、 N18、 Neuro-2a	SiMa 克隆 H10、 SH-SY5Y、 SK-N-DZ	—
DOR	ND	ND	ND	ND	ND
KOR	SH-SY5Y、 ND7	SiMa 克隆 H10、AGN P33、ND15、 Neuro-2a	ND3、 ND8、N18	—	SiMa 克隆 H10
MOR	ND7、ND15、 AGN P33	SH-SY5Y、 SiMa 克隆 H10、ND8、 Neuro-2a	ND3、N18	ND	ND

[0232] 使用类似方法,通过 FAM 标记这些内肽酶的靶向域,并如上文所述筛选细胞系,可鉴别出包含具有其它重靶向内肽酶的同源受体的细胞的细胞系。

[0233] 3. 使用重靶向内肽酶分子对候选细胞系进行单剂量筛选。

[0234] 为确定细胞系是否能够摄取适合的重靶向内肽酶分子,将适合密度的来自测试细胞系的储备培养物的细胞接种于含有 1mL 适合的血清生长培养基的 24 孔组织培养板的各孔中(表 1)。使细胞在 37℃ 培养箱中 5% 二氧化碳下生长,直到细胞达到所需密度(约 18 到 24 小时)。为评估阿片重靶向内肽酶的摄取情况,从各孔中抽吸出生长培养基,并用 1) 不含阿片重靶向内肽酶(未处理的细胞系)的新鲜生长培养基;或 2) 含 30nM 痛敏肽重靶向内肽酶(Noc/A)或 100nM 强啡肽重靶向内肽酶(Dyn/A)(处理过的细胞系)的新鲜生长培养基替换。在过夜孵育后,通过抽吸生长培养基并用 200 μL 的 1×PBS 冲洗各孔,来洗涤细胞。为收获细胞,抽吸出 1×PBS,通过加入 50 μL 的 2×SDS 上样缓冲液>Loading Buffer)来裂解细胞,将裂解物转移到清洁的试管中,并将样本加热到 95℃,保持 5 分钟。

[0235] 为检测未裂解的 SNAP-25 底物和裂解的 SNAP-25 产物的存在,通过蛋白质印迹来分析每一收获样本的等分试样。在该分析中,在变性、还原条件下,借助 MOPS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法,使用 NuPAGE® Novex 12% Bis-Tris 预制聚丙烯酰胺凝胶(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)分离出 12 μL 的收获样本的等分试样。借助蛋白质印迹,使用 TRANS-BLOT® SD

半干电泳转印细胞仪 (semi-dry electrophoretic transfer cell apparatus) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 将分离出的肽从凝胶转印到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) 上。通过在室温下在溶液中孵育 2 小时来封闭 PVDF 膜, 该溶液含有 Tris 缓冲生理盐水 (Tris-Buffered Saline, TBS) (25mM 2-氨基-2-羟甲基-1, 3-丙二醇盐酸 (Tris-HCl) (pH 7.4)、137mM 氯化钠、2.7mM 氯化钾)、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯)、2% 牛血清白蛋白 (BSA)、5% 脱脂奶粉。4℃ 下, 在 TBS、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯)、2% BSA 和 5% 脱脂奶粉中将封闭的膜孵育过夜, 该 5% 脱脂奶粉含有 1) α -SNAP-25 小鼠单克隆抗体的 1 : 5,000 稀释液作为一抗 (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD); 或 2) S9684 α -SNAP-25 兔多克隆抗血清的 1 : 5,000 稀释液作为一抗 (Sigma, St Louis, MO)。 α -SNAP-25 小鼠单克隆抗体和兔多克隆抗体都可同时检测未裂解的 SNAP-25 底物和裂解的 SNAP-25 产物, 从而能够评估各细胞系中 SNAP-25 的整体表达情况和重靶向内肽酶处理后裂解的 SNAP-25 百分比, 以作为参数来评估重靶向内肽酶的摄取量。在 TBS、TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 中洗涤用一抗探查的印迹 3 次, 每次持续 15 分钟。室温下, 在 TBS、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯)、2% BSA 和 5% 脱脂奶粉中孵育经过洗涤的膜 2 小时, 该 5% 脱脂奶粉含有 1) 缀合辣根过氧化物酶的山羊多克隆抗小鼠免疫球蛋白 G 重链和轻链 (IgG, H+L) 抗体 (Zymed, South San Francisco, CA) 的 1 : 10,000 稀释液作为二抗; 或 2) 缀合辣根过氧化物酶的山羊多克隆抗兔免疫球蛋白 G 重链和轻链 (IgG, H+L) 抗体 (Zymed, South San Francisco, CA) 的 1 : 10,000 稀释液作为二抗。在 TBS、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 中洗涤用二抗探查的印迹 3 次, 每次持续 15 分钟。使用 ECL Plus™ 蛋白印迹检测系统 (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 观察标记 SNAP-25 产物的信号检测, 并利用 Typhoon 9410 可变模式成像仪 (Variable Mode Imager) 和图像分析软件 (Imager Analysis software) (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 获取膜图像并定量裂解产物的百分比。根据单个印迹, 选择像素大小 (100 到 200 像素) 和 PMT 电压设置 (350 到 600, 通常为 400)。

[0236] 根据对 SNAP-25 裂解产物的检测, 以下细胞系展现摄取 30nM Noc/A : BE(2)-C、N18TG2、Neuro-2a、SiMa、SK-N-BE(2)-C 和 SK-N-DZ (表 3); 而以下细胞系展现摄取 100nM Dyn/A : N18TG2、Neuro-2a、PC12 和 SiMa。用较低剂量的化合物和 / 或用全剂量响应测试这些敏感细胞系中的一部分。

[0237]

表 3. 使用重靶向 Noc/A 和 Dyn/A 对候选细胞系进行单剂量筛选

细胞系	描述	来源	30 nM Noc/A 摄取	100 nM Dyn/A 摄取
BE(2)-C	人成神经细胞瘤	ATCC CRL-2268	是	NT
N18TG2	小鼠成神经细胞瘤	DSMZ ACC 103	是	是
ND3	小鼠成神经细胞瘤/原 代新生大鼠 DRG 杂交 物	ECACC 92090901	NDA	NDA
ND7/23	小鼠成神经细胞瘤/原 代大鼠 DRG 杂交物	ECACC 92090903	否	否
ND8	小鼠成神经细胞瘤/原 代新生大鼠 DRG 杂交 物	ECACC 92090904	NDA	NDA
ND15	小鼠成神经细胞瘤/原 代新生大鼠 DRG 杂交 物	ECACC 92090907	否	否
Neuro-2a	小鼠成神经细胞瘤	ATCC CCL-131	是	是
NG108-15	小鼠成神经细胞瘤/大 鼠神经胶质瘤杂交物	ECACC 88112302	否	NT
PC12	大鼠嗜铬细胞瘤	ATCC CRL-1721	NT	是
SH-SY5Y	人成神经细胞瘤	ATCC CRL-2266	否	NT

[0238]

表 3. 使用重靶向 Noc/A 和 Dyn/A 对候选细胞系进行单剂量筛选

细胞系	描述	来源	30 nM Noc/A 摄取	100 nM Dyn/A 摄取
SiMa	人成神经细胞瘤	DSMZ ACC 164	是	是
SK-N-BE(2)-C	人成神经细胞瘤	ATCC CRL-2271	是	NT
SK-N-DZ	人成神经细胞瘤	ATCC CRL-2149	是	NT
SK-N-F1	人成神经细胞瘤	ATCC CRL-2142	否	NT
SK-N-SH	人成神经细胞瘤	ECACC 86012802	否	NT
NT: 未测试。				
NDA: 在此细胞系中未检测到可检测量的 SNAP-25。				

[0239] 使用类似方法,可以评估包含具有其它重靶向内肽酶同源受体的细胞的细胞系的重靶向内肽酶摄取。

[0240] 实施例 II

[0241] 筛选内源性重靶向内肽酶受体表达的候选无性细胞系

[0242] 1. 来自亲本 SiMa 细胞系的候选无性细胞系的单剂量重靶向内肽酶筛选。

[0243] 伴随提交的专利申请 Zhu Hong 等, Cell Lines Useful in Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, 美国 专利申请序列第 61/160,199 号公开了源自于亲本 SiMa 细胞系的无性细胞系,这些无性细胞系可用于 BoNT/A 效力测定中,如 Ester Fernandez-Salas 等, Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, 美国专利申请序列第 12/403,531 号中所述,各专利申请的全部内容据此以引用的方式并入本文。为确定这些无性细胞系是否能够摄取适当的重靶向内肽酶,使用 ECL 夹心 ELISA 测定来对各细胞系进行筛选。

[0244] 为制备用重靶向内肽酶处理过的裂解物,将适合密度的来自所测试细胞系的储备培养物的细胞接种于含有 100 μ L 适合的血清生长培养基(表 1)的 96 孔组织培养板的各孔中,培养过夜。从各孔中抽吸出接种的细胞中的培养基,并用含有 30nM Noc/A 重靶向内

肽酶或 80nM Dyn/A 重靶向内肽酶的新鲜培养基替换。孵育 24 小时后,通过抽吸生长培养基并用 200 μ L 的 1 $\times$ PBS 冲洗各孔来洗涤细胞。为收获细胞,抽吸出 1 $\times$ PBS,通过向各孔中加入 30 μ L 包含 20mM Tris-HCl (pH 7, 5)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、1% Triton X-100 的裂解缓冲液来裂解细胞,并在 4 $^{\circ}$ C 下,在以 500rpm 旋转的振荡器上孵育板 30 分钟。在 4 $^{\circ}$ C 下,以 4000rpm 离心板 20 分钟以使细胞碎片形成粒状沉淀,并将上清液转移到涂有捕捉抗体的 96 孔板中,以进行检测步骤。

[0245] 为制备 α -SNAP-25₁₉₇ 捕捉抗体溶液,使用标准蛋白质 A 纯化方案纯化来自杂交瘤细胞系 2E2A6 (实施例 XI) 的腹水中所含的 α -SNAP-25₁₉₇ 小鼠单克隆抗体。

[0246] 为制备 α -SNAP-25 检测抗体溶液,根据制造商说明书 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD), 将 α -SNAP-25 兔多克隆抗体 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) 与 钌 (II)-三-二吡啶-(4-甲基磺酸酯) NHS 酯标记试剂 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 缀合。按以下方式进行缀合反应: 将 30 μ L 蒸馏水重悬的 (reconstituted) MSD SULFO-TAGTM 储备溶液加入 200 μ L 的 2 mg/mL α -SNAP-25 多克隆抗体中,并在室温下于暗处孵育反应 2 小时。使用标准离心柱方案纯化标记抗体,并使用标准比色蛋白质测定来确定蛋白质浓度。使用分光光度计在 455nm 下测量 α -SNAP-25 抗体 / MSD SULFO-TAGTM 缀合物的吸光度,以确定浓度 (以摩尔 / 升为单位)。在 4 $^{\circ}$ C 下储存检测抗体溶液待用。不用的等分试样在 -20 $^{\circ}$ C 下长期储存。

[0247] 为制备包含 α -SNAP-25₁₉₇ 捕捉抗体的 α -SNAP-25 固相载体,将约 5 μ L 适当的 α -SNAP-25₁₉₇ 单克隆抗体溶液 (在 1 $\times$ PBS 中为 20 μ g/mL) 加入 96 孔 MSD 高结合力 (MSD High Bind) 板的各孔中,并使溶液在生物安全柜中风干 2 到 3 小时,以便液体蒸发该溶液。密封经过封闭的板,并在 4 $^{\circ}$ C 下储存待用。

[0248] 为通过 ECL 夹心 ELISA 检测裂解的 SNAP-25 产物的存在,然后通过加入 150 μ L 封闭缓冲液 (Blocking Buffer) 在室温下培养封闭结合捕捉抗体的孔 2 小时,该封闭缓冲液包含 2% Amersham 封闭试剂 (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) 和 10% 山羊血清 (VWR, West Chester, PA)。抽吸出封闭缓冲液,将 25 μ L 用重靶向内肽酶处理过的细胞的裂解物加入各孔中,并在 4 $^{\circ}$ C 下将板孵育过夜。通过抽吸细胞裂解物,并用 200 μ L 1 $\times$ PBS、0.1% TWEEN-20[®] (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 冲洗各孔 3 次,将板中各孔洗涤 3 次。在洗涤之后,向各孔中加入 25 μ L 包含 1 $\times$ PBS 中 2% Amersham 封闭试剂、0.1% TWEEN-20[®] (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 的 5 μ g/mL α -SNAP-25 检测抗体溶液,然后密封,并在室温下振荡孵育 1 小时。在孵育 α -SNAP-25 检测抗体之后,用 200 μ L 1 $\times$ PBS、0.1% TWEEN-20[®] (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 洗涤各孔 3 次。洗涤后,将 150 μ L 1 $\times$ 读取缓冲液 (Read Buffer) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 加入各孔中,并使用 SECTORTM Imager 6000 型图像读取器 (Image Reader) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 读取板。使用 ECL 成像仪收集原始数据。

[0249] 结果表明,亲本 SiMa 细胞系以及无性细胞系 H10 都显示对 Noc/A 重靶向内肽酶的良好摄取 (表 4)。此外,这些结果还揭露,许多细胞系展现对 Dyn/A 重靶向内肽酶的摄取 (表 4)。三个无性细胞系 (1E11、AF4 和 DC4) 对 Dyn/A 重靶向内肽酶显示良好摄取; 11 个无性细胞系 (1E3、2D2、2D6、3D8、5C10、5F3、BB10、BF8、CG8、CG10 和 DE7) 展现对 Dyn/A 重靶向内肽酶的中等摄取; 且 (3B8、2B9、CE6、YB8、4C8、2F5、AC9、CD6、DD10、YF5) 显示对 Dyn/A

重靶向内肽酶的最少摄取。在全剂量响应测定中,用相应的重靶向内肽酶测试这些候选细胞系中的一部分。

[0250]

表 4. 使用重靶向 Noc/A 和 Dyn/A 对候选无性细胞系进行的单剂量筛选		
细胞系	30 nM Noc/A 摄取	80 nM Dyn/A 摄取
AGN P33	+++	NT
A10	—	NT
D11	—	NT
H1	—	—
H10	+++	—
1D4	NT	—
2E4	NT	—
3D5	NT	—
3G10	NT	—
4D3	NT	—
BB3	NT	—
CC11	NT	—
DF5	NT	—
YB7	NT	—

[0251]

表 4. 使用重靶向 Noc/A 和 Dyn/A 对候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	30 nM Noc/A 摄取	80 nM Dyn/A 摄取
BE3	NT	—
4B5	NT	—
2B9	NT	+
2F5	NT	+
3B8	NT	+
4C8	NT	+
AC9	NT	+
CD6	NT	+
CE6	NT	+
DD10	NT	+
YB8	NT	+
YF5	NT	+
1E3	NT	++
2D2	NT	++
2D6	NT	++
3D8	NT	++
5C10	NT	++
5F3	NT	++
BF8	NT	++
BB10	NT	++
CG8	NT	++
CG10	NT	++

[0252]

表 4. 使用重靶向 Noc/A 和 Dyn/A 对候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	30 nM Noc/A 摄取	80 nM Dyn/A 摄取
DE7	NT	++
1E11	NT	+++
AF4	NT	+++
DC4	NT	+++
NT: 未测试		
-: 无摄取; +: 最少摄取; ++: 中等摄取; +++: 良好摄取		

[0253] 2. 候选细胞系的全剂量响应筛选。

[0254] 接下来,使用适当重靶向内肽酶的全剂量响应来评估上文所鉴别的确立细胞系。将来自不同细胞系的细胞接种于 96 孔板中,并暴露于各种浓度的 Noc/A (0、0.14nM、0.4nM、1.23nM、3.7nM、11.1nM、33.3nM 和 100nM) 或 Dyn/A (0.017nM、0.05nM、0.15nM、0.45nM、1.4nM、4.1nM、12nM、37nM、111nM、333nM 和 1000nM),保持 24 小时。然后除去含重靶向内肽酶的培养基,并用新鲜的完全培养基替换。在 37℃、5% CO₂ 下再孵育孔板 24 小时,以使 SNAP-25 裂解。将细胞于裂解缓冲液(表 5)中裂解,并对孔板进行离心,以去除碎片。裂解物用于蛋白印迹测定中或夹心 ELISA 中。

[0255] 对于蛋白印迹分析,如实施例 I 中所述,测定样本中完整 SNAP-25 和 SNAP-25 裂解产物的存在。

[0256] 对于夹心 ELISA,在室温下,用 150 μL 封闭缓冲液封闭涂有 2E2A6 单克隆抗体的 ELISA 板,保持 2 小时。在除去封闭缓冲液之后,将 25 μL 细胞裂解物加入各孔中,并在 4℃ 下孵育板 2 小时。用 PBS-T 将板洗涤 3 次,并将 PBS-T 中的 2% 封闭剂中浓度为 5 μg/mL 的 25 μL 标记 SULFO-TAG NHS-酯的抗-SNAP25pAb 检测抗体加入各孔的底角。密封板并在室温下振荡 1 小时,随后用 PBS-T 洗涤 3 次。洗涤完成后,每孔加入 150 μL 1× 读取缓冲液,并在 SI6000 型图像读取器中读取板。为确定每一测试的细胞系的敏感性,计算各细胞系的 EC₅₀ 值。Noc/A 重靶向内肽酶的值概括于表 5 中。仅在 PC12 和克隆 AF4 中进行重靶向内肽酶 Dyn/A 的全剂量响应。在这两种情况下,测定未达到上渐近线且不能计算出 EC₅₀ 值。对于两种细胞系来说,产生 AF4 克隆信号的剂量较低,为 12nM。

[0257]

表 5. 使用重靶向 Noc/A 和 Dyn/A 对候选细胞系进行的全剂量筛选

细胞系	描述	来源	EC ₅₀ Noc/A 摄取	EC ₅₀ Dyn/A 摄 取
AGN P33	人成神经细胞瘤	—	5-10 nM	NT
BE(2)-C	人成神经细胞瘤	ATCC CRL-2268	NT	NT
N18TG2	小鼠成神经细胞瘤	DSMZ ACC 103	NT	NT
N18	小鼠成神经细胞瘤	ECACC 88112301	>100 nM	NT
ND3	小鼠成神经细胞瘤/ 原代新生大鼠 DRG 杂交物	ECACC 92090901	NDA	NT

[0258]

ND7/23	小鼠成神经细胞瘤/ 原代大鼠 DRG 杂交 物	ECACC 92090903	>100 nM	NT
ND8	小鼠成神经细胞瘤/ 原代新生大鼠 DRG 杂交物	ECACC 92090904	NDA	NT
ND15	小鼠成神经细胞瘤/ 原代新生大鼠 DRG 杂交物	ECACC 92090907	>100 nM	NT
Neuro-2a	小鼠成神经细胞瘤	ATCC CCL-131	30 nM	NT
NG108-15	小鼠成神经细胞瘤/ 大鼠神经胶质瘤杂 交物	ECACC 88112302	NT	NT
PC12	大鼠嗜铬细胞瘤	ATCC CRL-1721	NT	>1000 nM
SH-SY5Y	人成神经细胞瘤	ATCC CRL-2266	NT	NT
SiMa	人成神经细胞瘤	DSMZ ACC 164	30 nM	NT
SiMa 克隆 AF4	人成神经细胞瘤	—	NT	>300 nM
SiMa 克隆 H1	人成神经细胞瘤	—	>100 nM	NT
SiMa 克隆 H10	人成神经细胞瘤	—	20 nM	NT
SK-N-BE(2)-C	人成神经细胞瘤	ATCC CRL-2271	NT	NT

[0259]

SK-N-DZ	人成神经细胞瘤	ATCC CRL-2149	0.5-2 nM	NT
SK-N-F1	人成神经细胞瘤	ATCC CRL-2142	>100 nM	NT
SK-N-SH	人成神经细胞瘤	ECACC 86012802	>100 nM	NT
NT: 未测试。				
NDA: 在此细胞系中未检测到可检测量的 SNAP-25。				

[0260] 使用类似方法,可针对重靶向内肽酶摄取筛选和评估包含具有其它重靶向内肽酶同源受体的细胞的无性细胞系。

[0261] 实施例 III

[0262] 生长条件对候选细胞系中重靶向内肽酶摄取的影响的评估

[0263] 以下实施例说明如何确定使确立细胞系中重靶向内肽酶摄取最多的培养条件(生长和分化)。

[0264] 1. 细胞分化和营养因子对候选细胞系重靶向内肽酶摄取的影响。

[0265] 为确定细胞分化或生长培养基中营养因子的存在是否改进重靶向内肽酶摄取,利用不同培养基组成来测试展现良好 Noc/A 摄取的细胞系。将适合密度的来自所测试的 SiMa P > 30 细胞系的储备培养物的细胞接种于 96 孔组织培养板的各孔中,该 96 孔组织培养板的孔中含有 100 μ L 含 RPMI1640、1%青霉素-链霉素、2mM L-谷氨酰胺且补充有 B27 和 N2 的无血清培养基或者含有 100 μ L 含 RPMI1640、1%青霉素-链霉素、2mM L-谷氨酰胺且补充有 B27、N2 和 NGF(神经生长因子,100ng/mL)的无血清培养基。在 37°C 培养箱中 5%二氧化碳下孵育这些细胞,直到借助标准和常规形态学标准(例如生长停滞和神经突延伸)评估发现细胞分化为止(约 1 到 2 天)。作为对照物,将适合密度的来自测试细胞系的储备培养物的细胞接种于含有 100 μ L 含或不含 NGF(100ng/mL)的适宜生长培养基(表 1)的 96 孔组织培养板的各孔中。在 37°C 培养箱中 5%二氧化碳下使这些未分化的对照细胞生长,直到细胞达到所需密度(约 18 到 24 小时)。从各孔中抽吸出分化的对照培养物和未分化的对照培养物的培养基,并用含有 0(未处理的样本)或各种浓度的 Noc/A(0.14nM、0.4nM、1.23nM、3.7nM、11.1nM、33.3nM 和 100nM)的新鲜培养基替换。经过 24 小时的处理之后,洗涤细胞,并在不含重靶向内肽酶的培养基中孵育 24 小时,以增加产生的 SNAP25₁₉₇ 的量。然后洗涤并收获细胞用于如实施例 II 中所述的 ECL 夹心 ELISA 测定中。

[0266] 还测试营养因子对 SK-N-DZ 细胞系的影响。将 SK-N-DZ 细胞按每孔 25,000 个细胞接种于涂有聚 D-赖氨酸的 96 孔板上的 8 种不同 SM 培养基中(表 6),保持 72 小时。在含有 0、0.3nM、3nM 和 30nM 剂量的 Noc/A 的同样的八种培养基中处理细胞。经过 24 小时的处理后,洗涤细胞并在不含重靶向内肽酶的培养基中孵育 24 小时,以便增加产生的 SNAP25₁₉₇

裂解产物的量。然后洗涤并收获细胞用于如实施例 I 中所述的蛋白印迹测定中。

[0267] 分化对 SiMa > P30 细胞系中的 Noc/A 摄取没有影响,但似乎会改进 SK-N-DZ 细胞系中的摄取。基础培养基对 SK-N-DZ 细胞系中的 Noc/A 摄取具有显著影响,其中包含营养因子 N2 和 B27 的 RPMI1640 是最佳组合。培养基中 NGF 的存在似乎不会改进所测试的两种细胞系中的摄取。

[0268]

表 6. 营养因子和细胞分化对候选细胞系中 Noc/A 摄取的影响.			
未分化	分化	EC ₅₀ Noc/A 摄取	
		AGN P33	SK-N-DZ

[0269]

表 6. 营养因子和细胞分化对候选细胞系中 Noc/A 摄取的影响.

未分化	分化	EC ₅₀ Noc/A 摄取	
		AGN P33	SK-N-DZ
DMEM、10% FBS	—	NT	> 30 nM
DMEM、10% FBS、N2、 B27	—	NT	3 nM
DMEM、10% FBS、N2、 B27、NGF	—	NT	3 nM
DMEM、10% FBS、N2、 B27、RA	—	NT	>30 nM
RPMI1640、10% FBS	—	NT	10 nM
RPMI1640、10% FBS、N2、 B27	—	7.2 nM	1 nM
RPMI1640、10% FBS、N2、 B27、NGF	—	9.1 nM	1 nM
RPMI1640、10% FBS、N2、 B27、RA	—	NT	10 nM
—	RPMI1640、N2、B27	10.2 nM	1 nM
—	RPMI1640、N2、B27、 NGF	9.8 nM	0.6 nM
NGF: 神经生长因子; RA: 视黄酸			
NT: 未测试			

[0270] 使用类似方法,可评估包含具有其它重靶向内肽酶同源受体的细胞的无性细胞系的生长条件和分化条件。

[0271] 实施例 IV

[0272] 表达外源性重靶向内肽酶受体的确立细胞系的开发

[0273] 以下实施例说明如何制备表达重靶向内肽酶外源性受体的确立细胞系。

[0274] 1. 将靶受体转染到构成候选细胞系的细胞中。

[0275] 重靶向内肽酶 Noc/A 包含痛敏肽靶向域,其为类阿片受体 -1(ORL-1) 的天然配体。为获得包含 ORL-1 的开放阅读框的表达构建体,从 GeneCopoeia(GeneCopoeia, Germantown, MD) 中获得表达构建体 pReceiver-M02/ORL-1。

[0276] 或者,可以使用标准程序(BlueHeron®Biotechnology, Bothell, WA),根据 ORL-1 的氨基酸序列(例如氨基酸序列 SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:26)合成多核苷酸分子。使用标准亚磷酸胺合成法合成 20 到 50 碱基长的寡核苷酸。使这些寡核苷酸杂交成双链的双链体,其连接在一起以组装全长多核苷酸分子。使用标准分子生物学方法将该多核苷酸分子克隆到 pUCBHB1 载体中的 SmaI 位点,以产生 pUCBHB1/ORL-1。通过使用 Big Dye Terminator™ Chemistry 3.1(Applied Biosystems,Foster City,CA) 和 ABI 3100 型测序仪(Applied Biosystems,Foster City,CA) 进行测序来验证合成的多核苷酸分子。必要时,可根据 ORL-1 氨基酸序列(例如氨基酸序列 SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:26)合成表达优化的多核苷酸分子,以便改进其在大肠杆菌菌株中的表达。可对编码 ORL-1 的多核苷酸分子进行修饰,以使其 1) 含有通常存在于大肠杆菌菌株的天然多核苷酸分子中的同义密码子;2) 含有的 G+C 含量与大肠杆菌菌株中发现的天然多核苷酸分子的平均 G+C 含量极为匹配;3) 减少在多核苷酸分子内所发现的聚单核苷酸区;和/或 4) 消除在多核苷酸分子内所发现的内部调控或结构位点,参见例如,Lance E. Steward 等,Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type A,美国专利公布 2008/0057575(2008 年 3 月 6 日);和 Lance E. Steward 等,Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type E,美国专利公布 2008/0138893(2008 年 6 月 12 日)。一旦完成序列优化,就使用标准亚磷酸胺合成法合成 20 到 50 个碱基长的寡核苷酸。使这些寡核苷酸杂交成双链的双链体,其连接在一起以组装全长多核苷酸分子。使用标准分子生物学方法将该多核苷酸分子克隆到 pUCBHB1 载体中的 SmaI 位点,以产生 pUCBHB1/ORL-1。通过 DNA 测序来验证合成的多核苷酸分子。必要时,可针对例如酵母菌株、昆虫细胞系或哺乳动物细胞系等不同生物体进行表达优化,参见例如,Steward,美国专利公布 2008/0057575,同上文,(2008);和 Steward,美国专利公布 2008/0138893,同上文,(2008)。示例性编码 ORL-1 的多核苷酸分子包括 SEQ ID NO:61 和 SEQ ID NO:62。

[0277] 为构建编码 ORL-1 的表达构建体,用限制性内切核酸酶消化 pUCBHB1/ORL-1 构建体以 1) 切除编码 ORL-1 的开放阅读框的多核苷酸分子;并 2) 使该多核苷酸分子可操作地连接到 pcDNA3 载体(Invitrogen Inc.,Carlsbad,CA)。使用 T4DNA 连接酶程序将该插入物亚克隆到 pcDNA3 载体中,用适宜的限制性内切核酸酶消化,得到 pcDNA3/ORL-1。使用电穿孔法,将连接混合物转化到电击转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞(Edge Biosystems, Gaithersburg, MD) 中,并将细胞接种于含有 50 μ g/mL 氨苄西林的 1.5% Luria-Bertani 琼脂平板(pH 7.0) 上,并放入 37°C 培养箱中过夜生长。将含有表达构建体的细菌鉴别为氨苄西林抗性集落。使用碱性溶解质粒小量制备程序分离出候选构建体,并通过限制性内切核酸酶消化图进行分析,以确定插入物的存在和方位。该克隆策略将得到包含编码 ORL-1 的多核苷酸分子的 pcDNA3 表达构建体。

[0278] 重靶向内肽酶 Dyn/A 包含强啡肽靶向域,其为 κ -阿片受体(KOR) 的天然配体。为获得包含 ORL-1 的开放阅读框的表达构建体,从 GeneCopoeia(GeneCopoeia,Germantown, MD) 获得表达构建体 pReceiver-M02/KOR-1。或者,可以使用与上文所述方法类似的方法

合成并亚克隆编码 KOR 的表达构建体,以产生表达构建体 pcDNA3.1/KOR。示例性 KOR 氨基酸序列包括 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:30;示例性编码 KOR 的多核苷酸分子包括 SEQ ID NO:65 和 SEQ ID NO:66。

[0279] 可以使用类似克隆策略来制备编码其它重靶向内肽酶受体的表达构建体,例如 pcDNA3.1/DOR 或 pcDNA3.1/MOR、pcDNA3.1/甘丙肽受体 1、pcDNA3.1/甘丙肽受体 2 或 pcDNA3.1/甘丙肽受体 3。示例性 DOR 的氨基酸序列包括 SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28;示例性 MOR 的氨基酸序列包括 SEQ ID NO:31;示例性甘丙肽受体 1 的氨基酸序列包括 SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137 和 SEQ ID NO:138;示例性甘丙肽受体 2 的氨基酸序列包括 SEQ ID NO:139;且示例性甘丙肽受体 3 的氨基酸序列包括 SEQ ID NO:140。示例性编码 DOR 的多核苷酸分子包括 SEQ ID NO:63 和 SEQ ID NO:64;示例性编码 MOR 的多核苷酸分子包括 SEQ ID NO:67;示例性编码甘丙肽受体 1 的多核苷酸分子包括 SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142 和 SEQ ID NO:143;示例性编码甘丙肽受体 2 的多核苷酸分子包括 SEQ ID NO:144;且示例性编码甘丙肽受体 3 的多核苷酸分子包括 SEQ ID NO:145。

[0280] 为引入编码重靶向内肽酶受体的表达构建体,用编码重靶向内肽酶受体的表达构建体转染细胞系。为能用阿片或阿片样受体转染细胞系,将来自候选细胞系的细胞按 1×10^7 个细胞的密度接种于涂有 T₁₇₅ 胶原蛋白 IV (T₁₇₅ Collagen IV) 的烧瓶中,并在 37°C 培养箱中 5% 二氧化碳下生长,直到细胞达到所需密度。通过将 4mL 在室温下孵育了 5 分钟的含有 200 μ L LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的 OPTI-MEM 减血清培养基加入 4mL 含有 20 μ g pReceiver-MO2/ORL-1 或 20 μ g pReceiver-MO2/KOR-1 的 OPTI-MEM 减血清培养基中,制备 4.2mL 转染溶液。在室温下孵育该转染溶液约 20 分钟。将培养基用 8mL 无血清且无抗生素的新鲜培养基替换,并将转染溶液加入细胞中。然后在 37°C 培养箱中 5% 二氧化碳下孵育细胞约 16-18 小时。将转染培养基用新鲜的生长培养基替换,并在 37°C 培养箱在 5% 二氧化碳下孵育细胞。24 小时后,用含有培养基(选择培养基)中的浓度为 1mg/mL 的抗生素 G418 的新鲜生长培养基替换生长培养基,并孵育细胞 7 天。每周更换选择培养基,总共持续 4 周(在每周更换培养基期间,约 90% 细胞死亡并将其除去)。

[0281] 用 ORL-1 受体转染的候选细胞系包括 SiMa > P30、ND15、ND7、NG108-T15 和 SK-N-DZ 细胞系。用 KOR-1 受体转染的候选细胞系包括 SiMa、SiMa > P30、ND15、ND7、NG108-T15 和 SK-N-DZ 细胞系。转染的 NG108-T15 细胞在 G418 中选择时未能存活。

[0282] 2. 使用重靶向内肽酶分子对稳定转染的细胞系进行的单剂量和剂量响应筛选。

[0283] 将来自在前一部分中经过转染和选择的候选细胞系的细胞按 1×10^5 个细胞/孔接种到涂有聚 D-赖氨酸或胶原蛋白 IV 的 96 孔板上含有 N2 和 B27 添加物以及 NGF (50-100ng/ml) 的 RPMI1640 培养基中,持续 20 ± 4 小时,随后用化合物处理。然后用同种培养基中的 30nM 的重靶向内肽酶 Noc/A 处理用 ORL-1 受体稳定转染的细胞,持续 24 ± 2 小时,但 SK-N-DZ 细胞系除外,该细胞系是用 10nM 的重靶向内肽酶 Noc/A 处理。在 120 μ L 裂解缓冲液中裂解细胞,并将 20 μ L 裂解物与 2 $\times$ SDS 缓冲液混合,以进行如实施例 I 中详述的蛋白印迹测定。当用 ORL-1 受体转染时,所有细胞系都呈现重靶向 Noc/A 化合物的摄取增加(表 7)。

[0284]

表7. 用重靶向内肽酶Noc/A测试的被ORL-1稳定转染的细胞系

细胞系	描述	在30 nM下裂解的 SNAP25%	
		未转染	转染
AGN P33	人成神经细胞瘤	20%	40%
SK-N-DZ	人成神经细胞瘤	在10 nM下 25%	在10 nM下 40%
ND7	小鼠成神经细胞瘤和大 鼠DRG细胞杂交物	10%	42%
ND15	小鼠成神经细胞瘤和大 鼠DRG细胞杂交物	8%	20%
NG108-T15	小鼠成神经细胞瘤/大 鼠神经胶质瘤杂交物	无细胞存活	无细胞存活

[0285] 将来自在前一部分中经过转染和选择的候选细胞系的细胞按 1×10^5 个细胞 / 孔接种到涂有聚 D- 赖氨酸或胶原蛋白 IV 的 96 孔板上含有 10% FBS 以及 N2 和 B27 添加物的 RPMI1640 培养基中, 持续 20 ± 4 小时, 随后用化合物处理。用同种培养基中的 100nM 的重靶向内肽酶 Dyn/A 处理用 KOR-1 受体稳定转染的细胞, 持续 24 ± 2 小时。在 120 μ L 裂解缓冲液中裂解细胞, 并将 20 μ L 裂解物与 2 $\times$ SDS 缓冲液混合, 以进行如实施例 I 中详述的蛋白印迹测定。当用人 KOR-1 受体转染时, 所有细胞系都呈现重靶向 Dyn/A 化合物的摄取增加。

[0286] 3. 通过连续稀释选择展现高敏感性的稳定转染的无性细胞系

[0287] 以下实施例说明如何鉴别稳定转染的确立细胞系中对重靶向内肽酶作用影响或具有重靶向内肽酶摄取能力的无性系细胞。

[0288] 对于上述所选细胞的单细胞克隆, 采用有限稀释细胞系克隆法。用胰蛋白酶处理细胞, 计数, 稀释以实现每 100 μ L 0.5-1 个细胞, 将细胞按每孔 100 μ L 接种于 5 个涂有聚 D- 赖氨酸的 96 孔板中的选择培养基中。将细胞孵育超过 2 周, 直到在孔底部形成集落。对源自单一细胞的阳性集落进行标记。使用显微照相机获取单细胞源性克隆的照片。在克隆开始后约 4 周, 使来自含单一克隆的孔中的细胞再生长 1 周, 并将其转移到 24 孔板中。

[0289] 对于克隆的选择, 用于筛选阳性克隆的主要参数是使用蛋白印迹分析, 用识别完

整和裂解的 SNAP-25 的抗体测量的在 Noc/A 或 Dyn/A 处理后获得的 SNAP-25 裂解产物的最高量。一旦可获得足够的细胞,就用 10nM 和 30nM 的重靶向内肽酶 Noc/A 测试过表达 ORL-1 的克隆过夜(表 8)。用 100nM 的重靶向内肽酶 Dyn/A 测试过表达 KOR-1 的克隆过夜(表 9)。此外,根据实施例 I 中所述的强啡肽结合测定来测试过表达 KOR-1 的克隆。

[0290]

表 8. 使用重靶向内肽酶 Noc/A 对用 ORL-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	10 nM Noc/A 摄取	30 nM Noc/A 摄取	在 1 nM 下进行的第二次 筛选(裂解%)
AGN P33	1	+	+	28%
AGN P33	2	++	+++	50%
AGN P33	3	-	+	NT
AGN P33	4	ND	ND	NT

[0291]

表 8. 使用重靶向内肽酶 Noc/A 对用 ORL-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	10 nM Noc/A 摄取	30 nM Noc/A 摄取	在 1 nM 下进行的第二次 筛选(裂解%)
AGN P33	5	-	+	31%
AGN P33	6	++	+++	60%
AGN P33	7	+	+	14%
AGN P33	8	+	+	NT
AGN P33	9	+	+	38%
AGN P33	10	+	++	29%
AGN P33	11	+	+	NT
AGN P33	12	+	+	27%
ND7	1C11	NT	++	NT
ND7	2F3	NT	-	NT
ND7	1D10	NT	-	NT
ND7	1F9	NT	-	NT
ND7	1G10	NT	-	NT
ND7	2D8	NT	-	NT
ND7	2E2	NT	-	NT
ND7	4B7	NT	+++	NT
ND7	3C11	NT	-	NT
ND7	3C3	NT	+	NT
ND7	3E8	NT	-	NT

[0292]

表 8. 使用重靶向内肽酶 Noc/A 对用 ORL-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	10 nM Noc/A 摄取	30 nM Noc/A 摄取	在 1 nM 下进行的第二次 筛选(裂解%)
ND7	3E11	NT	—	NT
ND7	2G3	NT	—	NT
ND7	4D5	NT	+	NT
ND7	4D8	NT	+	NT
ND7	4C8	NT	—	NT
ND7	4C9	NT	+++	NT
ND7	4E8	NT	+	NT
ND7	2E6	NT	++	NT
ND7	4F4	NT	+++	NT
ND7	5D6	NT	—	NT
ND7	5G3	NT	—	NT
ND7	4D5	NT	++	NT
ND15	1C10	NT	+	NT
ND15	1F10	NT	++	NT
ND15	2D8	NT	++	NT
ND15	2E11	NT	—	NT
ND15	2F4	NT	++	NT
ND15	2F10	NT	++	NT
ND15	2F11	NT	—	NT

[0293]

表 8. 使用重靶向内肽酶 Noc/A 对用 ORL-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	10 nM Noc/A 摄取	30 nM Noc/A 摄取	在 1 nM 下进行的第二次 筛选(裂解%)
ND15	3C4	NT	+	NT
ND15	3C7	NT	++	NT
ND15	3E8	NT	+++	NT
ND15	4C8	NT	+	NT
ND15	4D8	NT	+	NT
SK-N-DZ	#2	—	—	NT
SK-N-DZ	#4	—	—	NT
SK-N-DZ	#5	+++	++	NT
SK-N-DZ	#6	NT	++	NT
SK-N-DZ	#7	+	NT	NT
SK-N-DZ	#8	—	NT	NT
SK-N-DZ	#9	+	NT	NT
SK-N-DZ	#10	—	NT	NT
SK-N-DZ	#11	+	+++	NT
SK-N-DZ	#12	—	NT	NT
SK-N-DZ	#14	++	NT	NT
SK-N-DZ	#16	—	NT	NT
SK-N-DZ	#17	+	+++	NT
SK-N-DZ	#19	+	+++	NT

[0294]

表 8. 使用重靶向内肽酶 Noc/A 对用 ORL-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	10 nM Noc/A 摄取	30 nM Noc/A 摄取	在 1 nM 下进行的第二次 筛选(裂解%)
SK-N-DZ	#20	—	NT	NT
SK-N-DZ	#23	NT	++	NT
SK-N-DZ	#25	—	NT	NT
SK-N-DZ	#26	—	++	NT
SK-N-DZ	#27	+	NT	NT
SK-N-DZ	#28	++	+	NT
SK-N-DZ	#30	++	NT	NT
SK-N-DZ	#31	—	NT	NT
SK-N-DZ	#32	++	++	NT
SK-N-DZ	#33	+	NT	NT
SK-N-DZ	#34	+++	ND	NT
SK-N-DZ	#35	+	++	NT
SK-N-DZ	#36	—	NT	NT
SK-N-DZ	#37	+++	++	NT
SK-N-DZ	#42	—	NT	NT
SK-N-DZ	#43	+	++	NT

ND: 未测定; NT: 未测试。

—: 无摄取; +: 最少摄取; ++: 中等摄取; +++: 良好摄取

[0295]

表 9. 使用重靶向内肽酶 Dyn/A 对用 KOR-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	100 nM Dyn/A 摄取	100 nM Dyn 结 合	选择用于后续测 试
SiMa	2	—	—	否
SiMa	6	+	+	否
SiMa	8	+	+	否
SiMa	12	+++	++	是
SiMa	14	++	++	否
SiMa	20	+	++	否
SiMa	25	++	++	否
AGN P33	1	+++	+	是
AGN P33	3	++	+	否
AGN P33	5	++	+	是
AGN P33	6	++	+	否
AGN P33	7	+++	+	是
AGN P33	8	++	+	是
AGN P33	9	+++	+	是
AGN P33	10	+++	+	是
AGN P33	11	++	+	否
AGN P33	12	+++	+	是
AGN P33	14	+	+	否
AGN P33	16	++	+	否

[0296]

表 9. 使用重靶向内肽酶 Dyn/A 对用 KOR-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	100 nM Dyn/A 摄取	100 nM Dyn 结 合	选择用于后续测 试
AGN P33	17	+++	+	是
AGN P33	21	+	++	否
ND7	A1	+	+	否
ND7	A2	-	-	否
ND7	A3	-	-	否
ND7	A4	-	-	否
ND7	A5	-	-	否
ND7	A6	-	-	否
ND7	A7	-	-	否
ND7	A8	-	-	否
ND7	A9	-	-	否
ND7	A10	-	-	否
ND7	A11	-	-	否
ND7	A12	+++	+++	是
ND7	B1	-	-	否
ND7	B2	-	-	否
ND7	B3	-	-	否
ND7	B4	-	-	否
ND7	B5	+	+	是

[0297]

表 9. 使用重靶向内肽酶 Dyn/A 对用 KOR-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	100 nM Dyn/A 摄取	100 nM Dyn 结 合	选择用于后续测 试
ND7	B6	—	—	否
ND7	B7	—	—	否
ND7	B8	—	—	否
ND7	B9	—	—	否
ND7	B10	—	—	否
ND7	B11	—	—	否
ND7	B12	—	—	否
ND7	C1	—	—	否
ND7	C2	—	—	否
ND7	C3	—	—	否
ND7	C4	—	—	否
ND7	C5	—	—	否
ND7	C6	+	+	否
ND7	C7	—	—	否
ND7	C8	—	—	否
ND7	C9	—	—	否
ND7	C10	—	—	否
ND7	C11	—	—	否
ND7	C12	—	—	否

[0298]

表 9. 使用重靶向内肽酶 Dyn/A 对用 KOR-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	100 nM Dyn/A 摄取	100 nM Dyn 结 合	选择用于后续测 试
ND7	D1	—	—	否
ND7	D2	—	—	否
ND7	D3	—	—	否
ND7	D4	—	—	否
ND7	D5	—	—	否
ND7	D6	++	++	是
ND7	D7	++	++	是
ND7	D8	—	—	否
ND7	D9	—	—	否
ND7	D10	—	—	否
ND7	D11	—	—	否
ND7	D12	—	—	否
ND7	E1	—	—	否
ND7	E2	—	—	否
ND7	E3	—	—	否
ND7	E4	—	—	否
ND7	E5	—	—	否
ND7	E6	—	—	否
ND7	E7	—	—	否

[0299]

表 9. 使用重靶向内肽酶 Dyn/A 对用 KOR-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	100 nM Dyn/A 摄取	100 nM Dyn 结 合	选择用于后续测 试
ND7	E8	—	—	否
ND7	E9	—	—	否
ND7	E10	—	—	否
ND7	E11	—	—	否
ND7	E12	++	++	是
ND7	F1	—	—	否
ND7	F2	—	—	否
ND7	F3	—	—	否
ND7	F4	—	—	否
ND15	A1	—	—	否
ND15	A2	—	—	否
ND15	A3	+	—	否
ND15	A4	+	—	否
ND15	A5	—	—	否
ND15	A6	++	—	否
ND15	A7	++	—	否
ND15	A8	++	—	否
ND15	A9	+	—	否
ND15	A10	+	—	否

[0300]

表 9. 使用重靶向内肽酶 Dyn/A 对用 KOR-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	100 nM Dyn/A 摄取	100 nM Dyn 结 合	选择用于后续测 试
ND15	A11	—	—	否
ND15	A12	—	—	否
ND15	B1	—	—	否
ND15	B2	++	—	否
ND15	B3	—	—	否
ND15	B4	—	—	否
ND15	B5	+++	—	是
ND15	B6	+	—	否
ND15	B7	—	—	否
ND15	B8	—	—	否
ND15	B9	—	—	否
ND15	B10	—	—	否
ND15	B11	—	—	否
ND15	B12	—	—	否
ND15	C1	—	—	否
ND15	C2	+++	+	是
ND15	C3	—	—	否
ND15	C4	—	—	否
ND15	C5	+	NT	否

[0301]

表 9. 使用重靶向内肽酶 Dyn/A 对用 KOR-1 稳定转染的候选无性细胞系进行的单剂量筛选

细胞系	克隆数	100 nM Dyn/A 摄取	100 nM Dyn 结 合	选择用于后续测 试
ND15	C6	+++	NT	是
SK-N-DZ	#11	NT	NT	ND
ND: 未确定; NT: 未测试。				
-: 无摄取; +: 最少摄取; ++: 中等摄取; +++: 良好摄取				

[0302] 4. 使用重靶向内肽酶对稳定转染的无性细胞系进行的剂量响应筛选。

[0303] 在全剂量响应实验中测试来自第 3 部分的显示出良好重靶向内肽酶 Noc/A 摄取的候选的稳定转染无性细胞系, 以确定其对重靶向内肽酶 Noc/A 的敏感性和功效。将细胞按 1×10^5 个细胞 / 孔接种到涂有聚 D- 赖氨酸或胶原蛋白 IV 的 96 孔板上含有 N2 和 B27 添加物以及 NGF (50–100ng/ml) 的 RPMI1640 培养基中, 持续 20 ± 4 小时, 随后用化合物处理。用同种培养基中的 0、0.14nM、0.4nM、1.23nM、3.7nM、11.1nM、33.3nM 和 100nM 的 Noc/A 处理来自亲本 AGN P33 细胞系和 ND7 无性细胞系的细胞 24 小时, 并在不含重靶向内肽酶的培养基中孵育 24 小时, 以使 SNAP-25 裂解。此外, 用同种培养基中的 0、0.03nM、0.08nM、0.24nM、0.74nM、2.22nM、6.67nM 和 20nM 的 Noc/A 处理来自亲本 AGN P33 细胞系的细胞 24 小时, 并在不含重靶向内肽酶的培养基中孵育 24 小时, 以使 SNAP-25 裂解。除去培养基, 并洗涤且裂解细胞, 以进行如实施例 II 中所详述的 ECL 夹心 ELISA 测定。由用 ORL-1 受体稳定转染的 AGN P33 亲本和无性细胞系得到的数据概述于表 10 中。克隆 #2 和克隆 #6 对重靶向内肽酶 Noc/A 呈现的敏感性和功效优于亲本细胞系。此外, 具有较高敏感性的新无性细胞系允许使用较低浓度来进行剂量响应, 由此证实新无性细胞系更敏感。

[0304]

表 10. 在 AGN P33 背景细胞系中的 3 种最敏感的过表达 ORL-1 的克隆的信噪比(S/N)和 EC₅₀ 值的总表.

	亲本	克隆 2	克隆 6	克隆 8
S/N 比: 0.03 nM/BK		41	26	1.8
S/N 比: 20 nM/BK		259	522	33.1
S/N 比: 0.14 nM/BK				
S/N 比: 100 nM/BK				
EC ₅₀ (nM)	6.8 ± 1.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.07	0.3 ± 0.2

[0305] 由用 ORL-1 受体稳定转染的 ND7 亲本和无性细胞系得到的数据概述于表 11 中。测试的所有克隆对重靶向内肽酶 Noc/A 呈现的敏感性和功效都比亲本细胞系 ND7 有所改进。克隆 4B7、克隆 1E6 和克隆 1C11 最敏感,且 EC₅₀ 值都低于 10pM。

[0306]

表 11. 在 ND7 背景细胞系中的 6 种最敏感的过表达 ORL-1 的克隆的信噪比(S/N)和 EC₅₀ 值的总表.

	亲本	1C11	4B7	4C9	4F4	1E6	3E9
S/N 比: 0.14 nM/BK	1.7	9.3	11.1	5.3	3.6	5.8	5.1
S/N 比: 100 nM/BK	53	217	243	126	169	123	121
EC ₅₀ (nM)	>50	8.6 ± 2	5.7 ± 0.5	33 ± 11	24 ± 5	6.7 ± 1	>30 nM

[0307] 表 12 概述了在不同细胞背景中由过表达 ORL-1 受体的无性细胞系的产生和测试获得的结果。

[0308]

表 12: 用 Noc/A 测试的过表达人 ORL-1 受体的无性细胞系的概述

背景细胞系	种类	用全剂量 Noc/A 测试的稳定细胞系	EC ₅₀ (nM)
AGN P33	人成神经细胞瘤	3 种	0.6-2.5
ND7	大鼠成神经细胞瘤和 DRG 杂交物	6 种	3.7-8
SK-N-DZ	人成神经细胞瘤	无(选择 7 个稳定克隆进行进一步研究)	N/A

[0309] 实施例 V

[0310] 来自亲本 SK-N-DZ 细胞系的无性细胞系的开发。

[0311] 以下实施例说明如何鉴别亲本确立细胞系中对重靶向内肽酶的胞吐抑制作用敏感或具有重靶向内肽酶摄取能力的无性系细胞。

[0312] 1. 无性细胞系的分离。

[0313] 在表征 SK-N-DZ 细胞系期间,发现构成该确立细胞系的细胞包含至少 5 种不同的细胞表型。为确定这些表型不同的细胞类型中任一者是否使该细胞系对重靶向内肽酶胞吐抑制作用敏感,进行了两次不同的有限稀释筛选以获得每一表型不同的细胞类型的单集落分离株。

[0314] 使适合密度的来自 SK-N-DZ 储备溶液的细胞在涂有胶原蛋白 IV 的 T175 烧瓶中所含的 DMEM、10% 胎牛血清 (热灭活)、0.1mM 非必需氨基酸、10mM HEPES、1mM 丙酮酸钠、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素中生长。第二次传代后,用胰蛋白酶处理细胞以产生细胞悬浮液,并确定细胞浓度。将该细胞悬浮液中约 4.0×10^6 个细胞转移到 50mL 试管中,并通过使用 10mL 注射器经由 18.5 号针反复用力排出,将细胞解离成单个细胞。然后,通过加入 15mL 新鲜生长培养基,将来自该解离的单细胞悬浮液的细胞稀释到 0.2×10^6 个细胞 / 毫升的浓度,并将 2.5 μ L 的该稀释液加入 50mL 新鲜生长培养基中,以达到 10 个细胞 / 毫升的浓度。对于该最终稀释储备溶液,将 100 μ L 生长培养基加入涂有胶原蛋白 IV 的 96 孔板的各孔中,并使细胞在 37°C 培养箱中 5% 二氧化碳下安静生长 4 周。设置 4 个 96 孔板进行分析。4 周后,用显微镜观察各孔,以鉴别正在生长的单一集落,且对于鉴别出来的每一集落,将 100 μ L 新鲜生长培养基加入各孔中,并使细胞在 37°C 培养箱中 5% 二氧化碳下安静生长 2 周。再生长 2 周后,用胰蛋白酶处理正在生长的单一集落,并将其转移到新的 96 孔板中继续生长。一旦根据目测观察,集落生长达到约 1,000 个细胞,就用胰蛋白酶处理细胞,并将每一细胞悬浮液转移到新的涂有胶原蛋白 IV 的 24 孔板的各孔中。使这些细胞在 37°C 培养箱中 5% 二氧化碳下生长,必要时每 2 到 3 天补充一次新鲜生长培养基。使细胞生长直到培养物达到约 60% 或更高程度汇合,此时,根据 24 孔板中细胞的汇合程度,用胰蛋白酶处理细胞,并将每一细胞悬浮液转移到涂有胶原蛋白 IV 的 25cm² 烧瓶中。使这些细胞在

37℃培养箱中5%二氧化碳下生长,必要时每2到3天补充一次新鲜生长培养基。一旦烧瓶中的细胞达到70-80%的汇合时,就将其冷冻并储存于液氮中,直到进行无性细胞系测试,以确定其对Noc/A的胞吐抑制作用的敏感度。根据活力和生长标准,从最初由两次筛选确立的384个集落分离株中选出24个无性细胞系,并进行扩增,以供后续筛选程序使用。在这些细胞系中,鉴别出12个快速生长的细胞系。

[0315] 2. 使用重靶向内肽酶对来自无性细胞系的细胞的重靶向内肽酶活性敏感度的初步筛选。

[0316] 为确定来自无性细胞系的细胞是否对重靶向内肽酶Noc/A活性敏感,使用供确定内肽酶活性的基于免疫的方法进行初步筛选。

[0317] 将13个SK-N-DZ克隆(#3、#4、#5、#8、#9、#10、#13、#15、#16、#17、#18、#22和#23)加SK-N-DZ亲本细胞接种于96孔板(每孔的细胞数量未知)上的EMEM、10%FBS、1×B27和1×N2中,并孵育过夜。用1nM的Noc/A处理细胞24小时。用100μL的裂解缓冲液裂解细胞20分钟,并在4000rpm下离心20分钟。将50μL的2×SDS样本缓冲液加入50μL的细胞裂解物中,并在95℃下加热5分钟。将10μL的蛋白质样本装载到12%NuPage凝胶的每个泳道上,并进行如实施例I中所述的蛋白印迹测定。针对总SNAP-25和裂解的SNAP-25的评估证实,克隆#3、克隆#8、克隆#15和克隆#22在Noc/A摄取方面至少与亲本细胞一样良好。在将细胞按比例扩增后,进行全剂量响应处理和利用ECL夹心ELISA测定的分析。

[0318] 3. 使用重靶向内肽酶分子对无性细胞系进行二次响应筛选。

[0319] 为确定来自无性细胞系的细胞是否对重靶向内肽酶Noc/A活性敏感,使用用于确定内肽酶活性的基于免疫的方法进行二次筛选。

[0320] 为进一步比较这些SK-N-DZ克隆的细胞系,进行ECL夹心ELISA测定。将5个克隆(#3、#9、#15、#16、#22)加SK-N-DZ亲本细胞按每个细胞系25,000个细胞/孔接种于涂有聚D-赖氨酸的96孔板上的RPMI 1640、10%FBS、1×B27和1×N2培养基(无NGF)中过周末。用0到20nM(0nM、0.03nM、0.08nM、0.24nM、0.74nM、2.22nM、6.67nM、20nM)剂量的Noc/A处理细胞24小时。如实施例I中详述的用ECL ELISA测定定量裂解的SNAP-25₁₉₇。

[0321] 表13显示了5个克隆和其亲本细胞系的EC₅₀值和信噪比。与亲本细胞系(约2nM)相比较,名为#3、#9和#15的3个克隆产生较低EC₅₀值(<1nM)且克隆#16和克隆#22产生类似的EC₅₀值。然而,来自裂解的SNAP25的总信号高于克隆#3、克隆#22和亲本细胞中的总信号。与其余细胞系相比较,克隆#9、克隆#16和克隆#15具有较低总信号。

[0322]

表 13. 通过有限稀释克隆从 SK-N-DZ 细胞中得到的 5 个克隆的信噪比(S/N)和 EC₅₀ 值的总表.

	亲本	3	9	19	16	22
S/N 比: 0.03 nM/BK	2	3	2	2	2	3
S/N 比: 20 nM/BK	19	27	12	8	14	20
EC ₅₀ (nM)	2.6 ± 1.5	0.8 ± 0.07	0.7 ±0.04	0.6 ± 0.1	2.2 ± 0.8	1.9 ± 0.6

[0323] 优化针对 SK-N-DZ 克隆的 Noc/A 处理条件, 并执行测定, 以比较克隆 #3、克隆 #15 和克隆 #22 与亲本异质 SK-N-DZ 细胞系。表 14 显示了比较结果, 并证实测定优化极大地改进了测定的信噪比。选择克隆 #3 和克隆 #22 进行进一步测定开发, 因为这两个克隆拥有优良的敏感性和功效。

[0324]

表 14. 使用优化的条件从 SK-N-DZ 细胞中得到的 3 个克隆的信噪比(S/N)和 EC₅₀ 值的总表.

	亲本	3	15	22
S/N 比: 0.03 nM/BK	15	8	5	10
S/N 比: 20 nM/BK	107	89	33	60

[0325]

表 14. 使用优化的条件从 SK-N-DZ 细胞中得到的 3 个克隆的信噪比(S/N)和 EC₅₀ 值的总表.

	亲本	3	15	22
EC ₅₀ (nM)	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.09

[0326] 实施例 V

[0327] 针对重靶向内肽酶摄取表征和比较无性细胞系

[0328] 以下实施例说明如何表征和比较源自包含异质细胞群的确立细胞系或通过靶受体转染和随后的细胞系克隆得到的无性细胞系。

[0329] 为评估重靶向内肽酶摄取的特异性或选择性, 使用缺乏靶向域的重靶向内肽酶进行非特异性摄取测定。对于阿片重靶向内肽酶, 将来自 AGN P33 克隆 #6 细胞系 (包含用编码 ORL-1 受体的表达构建体稳定转化的细胞) 和 SK-N-DZ 无性细胞系 #3 和 #22 (包含表达

内源性 ORL-1 受体的细胞) 的细胞按 150,000 个细胞 / 孔接种于涂有聚 D- 赖氨酸的 96 孔板上含有 N2 和 B27 添加物以及 NGF (50ng/mL) 的 RPMI 1640 无血清培养基中, 并在 5% CO₂ 的培养箱中 37℃ 下孵育 20±4 小时, 随后用化合物处理。用同种培养基中的范围为 0nM 到 20nM 或 0nM 到 40nM 的 8 种剂量的 Noc/A 或范围为 0nM 到 400nM 或 0nM 到 40nM 的 8 种剂量的 LH_N/A 处理细胞 22 小时。除去培养基, 并洗涤、裂解和离心细胞, 以去除制剂中的碎片以供夹心 ELISA 测定用。在室温下, 用 150 μL 封闭缓冲液封闭涂有 2E2A6 单克隆抗体的 ELISA 板, 保持 1 小时。除去封闭缓冲液后, 将 30 μL 细胞裂解物加入各孔中, 并在 4℃ 下孵育板 2 小时。用 PBS-T 将板洗涤 3 次, 并将 PBS-T 中的 2% 封闭剂中浓度为 5 μg/mL 的 30 μL 标记 SULFO-TAG NHS- 酯的检测 α-SNAP25 多克隆抗体加入各孔的底角。密封板并在室温下振荡 1 小时, 随后用 PBS-T 洗涤 3 次。洗涤完成后, 每孔加入 150 μL 1× 读取缓冲液, 并在 SI6000 型图像读取器中读取板。Noc/A 摄取与阴性对照 LH_N/A 的比较结果显示于表 15 和表 16 中。这些结果表明, 两种细胞系中 Noc/A 与 LH_N/A 摄取之间存在明显不同, 这证实了 Noc/A 摄取的特异性。

[0330]

表 15. SK-N-DZ 克隆#3 的非特异性摄取。4 次独立实验的概述		
nM	非特异性摄取 %	SEM (平均值的标准误差)
0	2	0.5
1	6	0.5
2	8	0.5
5	10	1
15	19	0.9
44	33	1.5
133	65	2.4
400	93	2.3

[0331]

表 16. hORL-1 #6 细胞的非特异性摄取。3 次独立实验的概述		
nM	非特异性摄取%	SEM (平均值的标准误差)
0	1	0.2
1	2	0.2
2	3	0.6

[0332]

表 16. hORL-1 #6 细胞的非特异性摄取。3 次独立实验的概述		
nM	非特异性摄取%	SEM (平均值的标准误差)
5	3	0.3
15	8	1.3
44	12	1.9
133	22	3.0
400	32	3.0

[0333] 表 17 概括了表征和比较 3 个细胞系的结果。SK-N-DZ 无性细胞系 #3 和 #22 拥有与原代 eDRG 相同的敏感性,并具有优良的信噪比,由此可开发针对重靶向内肽酶 Noc/A 的稳健测定。AGN P33 无性细胞系 #6 因低非特异性摄取和适宜的敏感性也成为优良的候选物。

[0334]

表 17.

参数	SK-N-DZ 克隆 3	SK-N-DZ 克隆 22	AGN P33 克 隆 6	eDRG
细胞系种类	人克隆	人克隆	人克隆	大鼠原代
细胞受体表 达	内源性人 ORL1	内源性人 ORL1	转染的人 ORL1	内源性大鼠 ORL1
动态范围	0.03 nM 到 20 nM 剂量响应	0.03 nM 到 20 nM 剂量响应	0.04 nM 到 40 nM 剂量 响应	0.17 nM 到 20 nM 剂量 响应
敏感性(EC_{50})	$EC_{50} =$ 0.75 ± 0.1 (N=10)	$EC_{50} = 0.8 \pm 0.2$ (N=9)	$EC_{50} = 2.4 \pm$ 0.2 (N=21)	$EC_{50} = 0.8 \pm$ 0.15 (N=6)

[0335]

表 17.

参数	SK-N-DZ 克隆 3	SK-N-DZ 克隆 22	AGN P33 克 隆 6	eDRG
ULOQ	20 nM	20 nM	20 nM	10-20 nM
S/N ULOQ/ 背景	98 ± 15 (N=10)	86 ± 17 (N=9)	385 ± 32 (N=19)	~300
S/N LLOQ/ 背景	12 ± 2 (N=11)	10 ± 2 (N=9)	29 ± 7 (N=18)	N/A
相对于 LH _N /A 的特 异性	≥ 2 log (N=4)	≥ 2 log (N=4)	≥ 2 log (N=3)	N/A
SNAP-25 表 达	内源性	内源性	内源性	内源性
与痛敏肽变 体竞争	完全竞争(n=4)	完全竞争(n=4)	部分竞争 (n=4)	N/A
通过抗痛敏 肽抗体抑制	完全竞争(n=4)	完全竞争(n=4)	完全竞争 (n=4)	N/A
通过抗 868 抗体抑制	部分竞争 (N=3)	部分竞争 (N=3)	部分竞争 (N=3)	N/A

[0336] 为评估重靶向内肽酶摄取的敏感性,进行配体饱和结合测定。大部分配体与其结合位点的相互作用都可根据结合亲和力来表征(NIH测定指南)。一般说来,高亲和力结合涉及配体在其受体结合位点的停留时间比低亲和力结合的情形长。解离常数常被用来描述配体(L)(例如某种药物)与蛋白质(P)之间的亲和力,即,配体与特定蛋白质结合的紧密程度。平衡饱和结合实验可测量在各种放射性配体浓度下的总结合和非特异性结合(NSB)。平衡解离常数或针对放射性配体的亲和力 K_d 以及受体结合位点的最大数量 B_{max} 都可使用非线性回归分析由特异性结合(总结合-NSB)计算出来。针对特异性结合的 K_d 可以使用如以下等式中所示的单位点结合双曲线非线性回归分析(即GraphPad Prism)计算得到,其中 B_{max} 是结合位点的最大数量(pmol/mg或pmol/细胞或位点/细胞),且 K_d (nM、pM等)是达到一半最大结合所需的放射性配体的浓度:

[0337]

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

[0338] 对于阿片重靶向内肽酶,将来自 AGN P33 克隆 #6 细胞系(包含用编码 ORL-1 受体的表达构建体稳定转化的细胞)、SK-N-DZ 亲本细胞系以及 SK-N-DZ 无性细胞系 #3、#15 和 #22(包含表达内源性 ORL-1 受体的细胞)的细胞按 200,000 个细胞/孔接种到涂有聚 D-赖氨酸的 48 孔板上含有 1×N2 和 1×B27 添加物的 RPMI1640 无血清培养基中,并在 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 下孵育过夜。除去培养基,并将细胞和 150 μL Tris 结合缓冲液加入各孔中以用以评估总结合,并将 100 μL Tris 结合缓冲液加入各孔中以很好地用以评估非特异性结合。将约 50 μL 4× 最终浓度的冷痛敏肽(2.5 μM 加入 SK-N-DZ 细胞系中,且 1 μM 加入 AGN P33 无性细胞系 #6 中)加入非特异性结合孔中,并将 50 μL 4× 最终浓度的 ³H- 痛敏肽(0nM、0.05nM、0.1nM、0.2nM、0.4nM、0.8nM、1.6nM、3.1nM、6.3nM、12.5nM、25nM 和 50nM 加入 SK-N-DZ 细胞系中,且 0、0.01nM、0.02nM、0.039nM、0.078nM、0.156nM、0.313nM、0.625nM、1.25nM、2.5nM、5.0nM 和 10nM 加入 AGN P33 无性细胞系 #6 中)加入总结合孔和非特异性结合孔中,达到最终体积 200 μL。在 37℃ 下孵育 30 分钟后,用 0.5mL 冷洗涤缓冲液洗涤细胞 2 次。然后在 200 μL 2N NaOH 中使细胞变性,并将其转移到含有 5mL 闪烁液的 20mL 闪烁瓶中。使用原始数据绘制剂量-响应曲线图,并计算每一样本的 K_d 值。将得到的原始数据传输到 SigmaPlot v10.0 中,并使用单点饱和拟合依据配体结合的等式类别来界定剂量-响应曲线。生成图形报告,并含有以下参数:R²(相关系数)、B_{max} 和 K_d ± SE(系数 ± 标准误差)。根据针对 SK-N-DZ 无性细胞系 #3、#15 和 #22 以及 AGNP33 无性细胞系 #6 细胞进行的测定获得总结合、特异性结合和非特异性结合的曲线图。SK-N-DZ 无性细胞系 #3 和 #22 对 ³H- 痛敏肽产生浓度依赖性且可饱和的结合。在相同的实验条件下,SK-N-DZ 无性细胞系 #15 对 ³H- 痛敏肽产生剂量依赖性响应,但在 50nM 最高剂量下也未饱和。与表达内源性 ORL-1 的 SK-N-DZ 细胞系相比较,来自 AGN P33 无性细胞系 #6 的细胞以明显较高的亲和力结合 ³H- 痛敏肽(最高剂量为 10nM 对 SK-N-DZ 中的 50nM),且具有较低的非特异性结合。

[0339] 使用 SK-N-DZ 无性细胞系 #3、#22、#15 以及 AGN P33 无性细胞系 #6 的饱和结合曲线,由在 3 个不同天针对每一细胞系进行的 3 次独立的结合实验,来估算 K_d 和 B_{max} 值。这 4 个细胞系的等级次序为:AGN P33 无性细胞系 #6(K_d = 1.86nM 且 B_{max} = 2.9fmol/细胞) > SK-N-DZ 无性细胞系 #3(K_d = 14nM 且 B_{max} = 0.6fmol/细胞) ≥ SK-N-DZ 无性细胞系 #22(K_d = 17nM 且 B_{max} = 0.6fmol/细胞) >> SK-N-DZ 无性细胞系 #15(K_d > 50nM)。为实现 SK-N-DZ 无性细胞系 #15 的饱和剂量响应,需要使用较高剂量范围的 ³H- 痛敏肽。表 16 概述了有关 3 个 SK-N-DZ 无性细胞系 #3、#15 和 #22 以及 AGN P33 无性细胞系 #6 稳定细胞系中特异性膜痛敏肽结合位点的特征的数据。数据显示:1) 在 AGN P33 无性细胞系 #6 中具有高亲和力位点和极低非特异性结合(K_d, 1.8nM, B_{max} 2.9fmol/细胞);2) 痛敏肽结合可在表达内源性受体的 SK-N-DZ 天然细胞上进行;3) AGN P33 无性细胞系 #6 对痛敏肽的亲和力比 SK-N-DZ 细胞系的高约 10 倍;4) 如在基于细胞的效力测定中可以看出,SK-N-DZ 无性细胞系 #3 和 #22(K_d 14-17nM, B_{max} 0.6fmol/细胞)中每个细胞的受体位点数多于 SK-N-DZ 无性细胞系 #15(在相同剂量范围下不能达到饱和)。

[0340]

表 18. 针对 4 种重要细胞系的 ^3H -痛敏肽饱和结合测定的概述(n=3 次独立实验)

细胞系	K_d (nM $\pm$ SD)	B_{max} (fmol/细胞)
SK-N-DZ #3	14 ± 1.6	0.59
SK-N-DZ #15	>50	ND
SK-N-DZ #22	16.7 ± 1.1	0.58
AGN P33 无性细胞系 #6	1.86 ± 0.1	2.89

[0341] 为评估重靶向内肽酶摄取的敏感性,使用 RT-PCR,在 mRNA 水平上评估表达的重靶向内肽酶受体的量。细胞中表达的受体量是表征用于测试的细胞系的一个重要方面,且其与对重靶向内肽酶的敏感性有关。表达的重靶向内肽酶受体的量还可以是用于筛选其它潜在细胞系并消除不表达靶受体的细胞系的工具。测量受体表达的一种方法是使用实时 PCR(RT-PCR) 定量重靶向内肽酶受体 mRNA 的量。

[0342] 对于阿片重靶向内肽酶,从在无血清培养基或含血清培养基中生长的未转染的亲本 SiMa 细胞系的细胞、来自 AGN P33 无性细胞系 #6 的细胞、来自亲本 SK-N-DZ 细胞系的细胞以及来自 SK-N-DZ 无性细胞系 #3 和 #22 的细胞中分离出 RNA。将 mRNA 转化为 cDNA,并且使用 ORL-1 的以下寡核苷酸引物扩增 ORL-1,同时进行实时测量,以确定各细胞系中存在的相对量:正向引物 5' -CACTCGGCTGGTGCTGGTGG-3' (SEQ ID NO:148) 和反向引物 5' -AATGGCCACGGCAGTCTCGC-3' (SEQ ID NO:149)。通过使用 SYBR®绿色荧光染料定量 DNA,该荧光染料将相对于反应中存在的双链 DNA(PCR 产物)的量发出荧光。对荧光量 vs. 循环数作图,得到每一反应的逻辑曲线(logistic curve)。反应越快到达曲线的线性阶段,反应中存在的 ORL-1 受体 cDNA 就越多。使用未加入酶的对照 RT 反应来确定是否存在污染。由于该反应中不存在 RT 酶,所以不会产生 cDNA。使用 RNA 模板不能产生 PCR 产物,因此,如果在 -RT 反应中出现 PCR 曲线,只有一种可能是存在基因组 DNA 污染。在 -RT 反应中,如果没有出现 PCR 曲线,则可确定存在极少基因组 DNA 污染(未显示数据)。表 18 列出了细胞系及其 CT 值。CT 是产生高于设置的阈值的信号所发生的相应 PCR 反应的 PCR 循环数。可以通过观察相应的 CT 值,来比较一个细胞系与另一细胞系中 ORL-1 受体 mRNA 的量。根据 CT 值,来自 AGN P33 无性细胞系 #6 的细胞在无血清培养基(平均 CT:28.6 vs. 17.3)和含血清培养基(平均 CT:26.1 vs. 16.5)中产生的 ORL-1 mRNA 远高于亲本 SiMa 细胞系。由 AGN P33 无性细胞系 #6 中传代 6 次的细胞与传代 16 次的细胞获得的 mRNA 似乎具有极小差异。亲本 SK-N-DZ 细胞系与无性细胞系 #3 和 #22 的 CT 值和曲线似乎也具有极小差异。该结论符合生长于含血清培养基和无血清培养基中的细胞,并反映出在针对 Noc/A 的基于细胞的效力测定中所观察到的这些细胞系的相似性。

[0343]

表 19. 细胞系中 ORL-1 表达的平均 CT 值

培养基	细胞系	CT 平均值
无血清培养基	SiMa 亲本 p26	28.6
	SiMa hORL-1 克隆#6 p6	17.3
	SiMa hORL-1 克隆#6 p16	17.3
完全培养基	SiMa 亲本 p26	26.1
	SiMa hORL-1 克隆#6 p6	16.4
	SiMa hORL-1 克隆#6 p16	16.6
无血清培养基	SK-N-DZ	26.3
	SK-N-DZ 克隆#3	25.9

[0344]

表 19. 细胞系中 ORL-1 表达的平均 CT 值

培养基	细胞系	CT 平均值
	SK-N-DZ 克隆#22	26.6
完全培养基	SK-N-DZ	26.2
	SK-N-DZ 克隆#3	25.8
	SK-N-DZ 克隆#22	26.4

[0345] 实施例 VII

[0346] 选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有游离羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 单克隆抗体的开发

[0347] 以下实施例说明如何制备可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 单克隆抗体。

[0348] 1. α -SNAP-25 单克隆抗体的产生。

[0349] 为开发可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的单克隆 α -SNAP-25 抗体, 将具有 13 个残基的肽 CDSNKTRIDEANQ_{COOH} (SEQ ID NO: 38) 设计为 SNAP-25 裂解产物抗原。该肽包含柔性连接子区和用于结合至 KLH 的 N-末端半胱氨酸残基以及具有羧基化 C-末端谷氨酰胺 (SEQ ID NO: 38) 的人 SNAP-25 (SEQ ID NO:

5) 的氨基酸 186-197。产生针对适当选择的唯一肽序列的单克隆抗体将控制表位特异性, 从而允许从密切相关的同种型库中鉴别出特定的蛋白质亚群。Blast 搜索显示, 这种肽只与 SNAP-25 具有高同源性, 并且几乎不可能与神经元细胞中的其它蛋白质发生交叉反应。同时, 通过利用计算机算法小心地细查序列, 以确定亲水性指数、蛋白质表面概率、柔性区和有利的二级结构, 随后适当的定位和呈递所选肽序列。合成肽, 并将其与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 缀合, 以增加免疫原性。用这种肽免疫 6 只 Balb/c 小鼠, 并在约 8 周内进行 3 次免疫, 之后抽取小鼠的血液进行测试。将血液在 4℃ 下孵育 60 分钟, 以使其凝块。在 4℃ 下, 以 10,000xg 离心凝块的血液 10 分钟, 以使细胞碎片形成粒状沉淀。将所得血清样本分成 50 μ l 的等分试样, 并储存于 -20℃ 下待用。

[0350] 使用基于本说明书中公开的其它 SNAP-25 抗原的类似策略来开发可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 单克隆抗体。例如, SNAP-25 抗原 SEQ ID NO:45 可缀合至 KLH, 而不是 SNAP-25 抗原 SEQ ID NO:38。再例如, 来自 SNAP-25 抗原 SEQ ID NO:38 的人 SNAP-25 的氨基酸 186-197 可以替换为 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:44。

[0351] 2. 针对 α -SNAP-25 单克隆抗体的存在的筛选。

[0352] 为确定可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的 α -SNAP-25 单克隆抗体的存在, 使用提取的小鼠血清进行比较性 ELISA 和基于细胞的裂解测定。对于比较性 ELISA, 构建两种融合蛋白: BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ (SEQ ID NO:48) 和 BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ (SEQ ID NO:49)。BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ 包含天然生物素化的 16 氨基酸 BirA 肽 (SEQ ID NO:50), 该 SEQ ID NO:50 氨基末端连接到包含氨基酸 134-197 (SEQ ID NO:5) 的 SNAP-25 肽。BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ 包含天然生物素化的 16 氨基酸 BirA 肽 (SEQ ID NO:50), 该 SEQ ID NO:50 氨基末端连接到包含氨基酸 134-206 (SEQ ID NO:5) 的 SNAP-25 肽。将这两种底物以 10 μ g/mL BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ 和 BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ 的浓度悬浮于 1×PBS 中。通过加入约 100 μ l 适宜的底物溶液并在室温下孵育板 1 小时, 将 BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ 和 BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ 涂覆于分离的板上。在 37℃ 下, 在含有来源于 6 只免疫小鼠之一 (小鼠 1、小鼠 2、小鼠 3、小鼠 4、小鼠 5 和小鼠 6) 的含抗体血清的 1:10 到 1:100 稀释液的 1×TBS 中的 0.5% BSA 中孵育经过洗涤的板 1 小时。在 200 μ l TBS、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 中洗涤用一抗探查过的板 4 次, 每次持续 5 分钟。在 37℃ 下, 在含有缀合辣根过氧化物酶的山羊多克隆抗小鼠 IgG 抗体 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 的 1:10,000 稀释液作为二抗的 1×TBS 中孵育经过洗涤的板 1 小时。在 200 μ l TBS、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 中洗涤用二抗探查的板 4 次。通过使用 ImmunoPure TMB 底物试剂盒 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 进行的显色检测观察标记 SNAP-25 产物的显色检测结果。涂有 BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ 的板中显出黄色, 但涂有 BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ 的板则没有显出黄色, 这表明 α -SNAP-25 抗体优先识别 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物。结果表明, 在 6 只用于免疫的小鼠中, 有 3 只小鼠 (小鼠 2、小鼠 3 和小鼠 4) 对在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原具有较高滴度和较高特异

性。

[0353] 使用 ELISA 轻链活性测定来确定这些结果。通过加入约 100 μ l 以下底物溶液来准备涂有 Reacti-Bind 抗生蛋白链霉素的 96 孔板 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) : 用 100 μ l 12 种不同浓度的 BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ 涂覆 A-C 行 ; 用 100 μ l 浓度为 10 μ g/mL 的 BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ 涂覆 D-H 行。通过抽吸底物溶液,并用 200 μ l TBS、0.1% TWEEN-20[®] (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 冲洗各孔 3 次,来洗涤这些板。在 37 $^{\circ}$ C 下,在 BoNT/A 孵育缓冲液 (50mM HEPES, pH 7.4, 1% 胎牛血清、10 μ M ZnCl₂、10mM 二硫代苏糖醇) 中预还原 BoNT/A 的稀释液 20 分钟,并将 100 μ l 预还原的 BoNT/A 加入涂有底物的板中,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 90 分钟。通过抽吸 BoNT/A 孵育缓冲液并用 200 μ l TBS、0.1% TWEEN-20[®] (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 冲洗各板 3 次,来洗涤经 BoNT/A 处理的板。在 37 $^{\circ}$ C 下,在 1 $\times$ TBS 中的 0.5% BSA 中孵育经过洗涤的板 1 小时,该 1 $\times$ TBS 含有测试的含抗体血清的 1 : 10 到 1 : 100 稀释液。在 200 μ l TBS、0.1% TWEEN-20[®] (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 中洗涤用一抗探查过的板 4 次,每次持续 5 分钟。经过洗涤的板在 1 $\times$ TBS 中 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时,该 1 $\times$ TBS 含有缀合辣根过氧化物酶的山羊多克隆抗小鼠 IgG 抗体 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 的 1 : 10,000 稀释液作为二抗。在 200 μ l TBS、0.1% TWEEN-20[®] (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 中洗涤用二抗探查的板 4 次。通过使用 ImmunoPure TMB 底物试剂盒 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 进行的显色检测观察标记 SNAP-25 产物的显色检测结果。使用源自于所有 6 只免疫小鼠 (小鼠 1、小鼠 2、小鼠 3、小鼠 4、小鼠 5 和小鼠 6) 的含抗体血清,在用 BoNT/A 处理过的样本中检测到与 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物的存在相关的黄色显影,但未处理的对照物中未观察到。因此,比较性 ELISA 分析表明,在 6 只用于免疫的小鼠中,有 3 只小鼠 (小鼠 2、小鼠 3 和小鼠 4) 对在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原具有较高滴度和较高特异性。

[0354] 对于基于细胞的裂解测定,将适合密度的 PC12 细胞接种于含有 3mL 适宜血清培养基 (表 1) 的 60mm² 组织培养板中。使细胞在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 5% 二氧化碳下生长,直到细胞达到适宜的密度。通过以下方式制备 500 μ l 转染溶液 : 将 250 μ l 在室温下孵育了 5 分钟的含有 15 μ l LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) 的 OPTI-MEM 减血清培养基加入 250 μ l 含有 10 μ g pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 表达构建体 (SEQ ID NO : 51) 的 OPTI-MEM 减血清培养基。pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 表达构建体包含 pQBI-25 表达载体 (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA), 该载体的启动子元件功能性连接编码 GFP-BoNT/A 轻链的多核苷酸 (SEQ ID NO : 52)。在室温下,将该转染混合物孵育约 20 分钟。将培养基用新鲜的未补充培养基替换,并将 500 μ l 转染溶液加入细胞。然后,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 5% 二氧化碳下孵育细胞约 6 到 18 小时。如实施例 II 中所述,洗涤并收获细胞。为检测裂解的 SNAP-25₁₉₇ 产物的存在,如实施例 II 中所述,借助蛋白质印迹来分析每一收获的样本的等分试样,但所用一抗为含抗体血清的 1 : 1,000 稀释液,且所用二抗为小鼠 α -IgG 辣根过氧化物酶 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 的 1 : 20,000 稀释液。使用源自于 3 只小鼠 (小鼠 2、小鼠 3 和小鼠 4) 的含抗体血清,在用 BoNT/A 处理过的样本中检测到对应于 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物的单一带,但未处理的对照物中未检测到。因此,基于细胞的裂解测定表明,在用于免疫的小鼠中,有 3 只小鼠 (小鼠 2、小鼠 3 和小鼠 4) 对在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的

P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原具有较高滴度和较高特异性。

[0355] 3. 杂交瘤的产生。

[0356] 为制备产生可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的 α -SNAP-25 单克隆抗体的杂交瘤, 在最后一次“增强”免疫后 3 天收获小鼠 2 的脾, 并使用标准杂交瘤方案将脾细胞与骨髓瘤细胞 P3-X63 Ag8.653 融合。将这些细胞接种于 5 个 96 孔板中, 并使用 HAT 培养基选择杂交物。在融合后的 8 到 14 天内, 使用比较性 ELISA, 用涂覆在两个独立板中的 BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ 肽和 BirA-HisTag®-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ 肽对约 480 个亲本克隆进行初次筛选。比较性 ELISA 是一种用于鉴别产生对裂解的 SNAP-25₁₉₇ 具特异性的抗体的杂交瘤的快速筛选方法。使用上述基于细胞的裂解测定以及 LC/A 转染的细胞的免疫染色对顶部的 18 个克隆进行进一步筛选 (表 20)。

[0357]

表 20. 含 α -SNAP-25 单克隆抗体的上清液的分析

克隆	比较性 ELISA				基于细胞的测定	
	OD SNAP-25 ₁₉₇	OD SNAP-25 ₂₀₆	比率 197/206	比率 206/197	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
1D3	1.805	0.225	8.02	0.13	+++	—
1F12	0.365	0.093	3.92	0.25	—	—
1G10	0.590	0.137	4.31	0.23	++	—
1H1	0.335	0.121	2.77	0.36	—	—
1H8	0.310	0.302	1.03	0.97	+	—
2C9	0.139	0.274	0.51	1.97	—	—
2E2	0.892	0.036	24.78	0.04	++	—
2E4	0.228	0.069	3.30	0.30	+	—
2F11	1.095	1.781	0.61	1.63	—	—
3C1	1.268	0.053	23.92	0.04	++	—
3C3	0.809	0.052	15.56	0.06	++	—
3E1	0.086	0.155	0.55	1.80	0	—
3E8	2.048	0.053	38.64	0.03	+++	—
3G2	0.053	0.158	0.34	2.98	—	—
4D1	0.106	0.218	0.49	2.06	—	—
4G6	0.061	0.159	0.38	2.61	—	—
5A5	0.251	0.106	2.37	0.42	+	—
5F11	0.243	0.061	3.98	0.25	—	—

[0358] 通过有限稀释对克隆 1D3、1G10、2E2、3C1、3C3 和 3E8 进行进一步克隆, 因为由这些克隆产生的条件培养基包含的 α -SNAP-25 抗体具有优先结合特异性, 即, SNAP-25₁₉₇ 裂解产物相对于 SNAP-25₂₀₆ 未裂解底物的比率 _{197/206} 为至少 4 : 1, 并使用基于细胞的裂解测定和用 GFP-LC/A 转染的 PC12 细胞的免疫染色来检测 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物。类似地, 通过有限稀释对克隆 2C9、2F11、3G2、4D1 和 4G6 进行进一步克隆, 因为由这些克隆产生的条件培养基包含的 α -SNAP-25 抗体具有优先结合特异性, 即, SNAP-25₂₀₆ 未裂解底物相对于 SNAP-25₁₉₇

裂解产物的比率_{206/197}为至少 1.5 : 1, 并使用基于细胞的裂解分析来检测 SNAP-25₂₀₆ 未裂解底物。使用比较性 ELISA、基于细胞的裂解和免疫染色再次筛选这些单细胞衍生无性系, 以确定其亲和力和特异性, 并使用标准程序对抗体进行同种型分类。由克隆 1D3B8 (IgM. k)、1G10A12 (IgG3. k)、2C9B10 (IgG3. k)、2E2A6 (IgG3. k)、2F11B6 (IgM. k)、3C1A5 (IgG2a. k) 和 3C3E2 (IgG2a. k) 产生腹水。在克隆过程中, 克隆 3E8 停止产生抗体, 并且无法进行进一步评估。

[0359] 4. α -SNAP-25 单克隆抗体的结合特异性的评估。

[0360] 为评估可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的 α -SNAP-25 单克隆抗体的结合特异性, 使用基于细胞的活性测定、免疫细胞化学和免疫沉淀法, 使用由克隆 1D3B8、1G10A12、2C9B10、2E2A6、2F11B6、3C1A5 和 3C3E2 产生的腹水来检测 SNAP-25 裂解产物。

[0361] 对于基于细胞的活性测定, 通过用蛋白印迹分析法分析含 α -SNAP-25 抗体的腹水来检测未裂解的 SNAP-25₂₀₆ 底物和裂解的 SNAP-25₁₉₇ 产物的能力来确定结合特异性。如上文所述, 将适合密度的 PC12 细胞接种于含 3mL 适宜的血清培养基的 60mm² 组织培养板中, 使其在 37°C 培养箱中 5% 二氧化碳下生长, 直到达到适宜的细胞密度, 并用不含 pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 的表达构建体 (未转染细胞) 的转染溶液或含 pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 表达构建体 (经过转染的细胞) 的转染溶液进行转染。如实施例 I 中所述, 洗涤并收获细胞。为检测未裂解的 SNAP-25₂₀₆ 底物和裂解的 SNAP-25₁₉₇ 产物的存在, 如实施例 I 中所述, 借助蛋白质印迹来分析每一收获的样本的等分试样, 但所用的一抗为含 α -SNAP-25 单克隆抗体的腹水的 1 : 100 稀释液, 且所用的二抗为缀合辣根过氧化物酶的 α -小鼠 IgG (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 的 1 : 20,000 稀释液。此外, 还测试了 3 只可商购获得的小鼠 α -SNAP-25 单克隆抗体。SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), 一种 α -SNAP-25 抗体, 制造商指示用来检测未裂解的 SNAP-25₂₀₆ 底物和裂解的 SNAP-25₁₉₇ 产物, 根据制造商的推荐, 以 15,000 稀释液来使用。MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), 一种 α -SNAP-25 抗体, 制造商指示用来检测未裂解的 SNAP-25₂₀₆ 底物和裂解的 SNAP-25₁₉₇ 产物, 根据制造商的推荐, 以 1 : 100 稀释液使用。MC-6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), 一种 α -SNAP-25 抗体, 制造商指示只用来检测裂解的 SNAP-25₁₉₇ 产物, 根据制造商的推荐, 以 1 : 100 稀释液来使用。

[0362] 表 21 指明含 α -SNAP-25 抗体的腹水只检测 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物。基于细胞的裂解测定指明, 由克隆 1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5 和 3C3E2 产生的腹水将合成对 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物具有高结合特异性的 α -SNAP-25 单克隆抗体, 由此允许相对于 SNAP-25₂₀₆ 未裂解底物选择性识别该裂解产物。商用抗体 SMI-81 检测 SNAP-25₂₀₆ 未裂解底物, 但识别 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物的能力较差 (表 21)。意外的是, 商用抗体 MC-6050 只检测 SNAP-25₂₀₆ 未裂解底物, 并且不能识别 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物 (表 21)。更意外的是, 商用抗体 MC-6050 只检测 SNAP-25₂₀₆ 未裂解底物, 并且不能识别 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物, 即使制造商宣称这种抗体可选择性检测 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物 (表 21)。因此, 该分析表明, 虽然 1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5 和 3C3E2 对 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物展现适当的选择性, 但是 1G10A12 和 2F11B6 不具有该选择性。此外, 商用抗体 SMI-81、MC-6050 和 MC-6053 都不适用于本申请案中公开的基于免疫

的方法,因为它们都不能选择性检测 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物。

[0363] 对于免疫细胞化学分析,通过用免疫染色法分析含 α -SNAP-25 抗体的腹水检测未裂解的 SNAP-25₂₀₆ 底物和裂解的 SNAP-25₁₉₇ 产物的能力来测定结合特异性。参见例如, Ester Fernandez-Salas 等, Plasma Membrane Localization Signals in the Light Chain of Botulinum Neurotoxin, Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. 101(9):3208-3213(2004)。如上文所述,将适合密度的 PC12 细胞接种,使其生长,并用不含 pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 表达构建体(未转染的细胞)的转染溶液或含 pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 表达构建体(经过转染的细胞)的转染溶液进行转染。用 1×PBS 洗涤细胞,并在室温下于 5mL PAF 中固定 30 分钟。在磷酸盐缓冲盐水中洗涤固定的细胞,于 1×PBS 中的 5mL 0.5% Triton®X-100(聚乙二醇辛基苯醚)中孵育,用 1×PBS 洗涤,并在 -20℃ 下 5mL 甲醇中透化 6 分钟。在室温下 5mL 100mM 甘氨酸中封闭透化的细胞 30 分钟,用 1×PBS 洗涤封闭细胞,并在室温下 1×PBS 中的 5mL 0.5% BSA 中封闭 30 分钟。于 1×PBS 中洗涤封闭细胞,并在室温下于 1×PBS 中的 0.5% BSA 中孵育 2 小时,该 1×PBS 含有由测试的克隆杂交瘤细胞系产生的腹水的 1:10 稀释液。在 1×PBS 中洗涤用一抗探查的细胞 3 次,每次持续 5 分钟。在室温下于 1×PBS 中孵育经过洗涤的细胞 2 小时,该 1×PBS 含有缀合 ALEXA®FLUOR 568 的山羊多克隆抗小鼠免疫球蛋白 G 重链和轻链(IgG, H+L)抗体(Invitrogen, Carlsbad, CA)的 1:200 稀释液作为二抗。在 1×PBS 中洗涤用二抗探查的细胞 3 次,每次持续 5 分钟。将经过洗涤的细胞封片到 VECTASHIELD®封片剂(Vector Laboratories, Burlingame, CA)中并盖上盖玻片以为显微镜检查作准备。利用 Leica 共聚焦显微镜,使用适宜的激光设置来获得信号检测的图像。表 21 显示含 α -SNAP-25 抗体的腹水特异性检测 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物。免疫细胞化学分析表面,由克隆 1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5 和 3C3E2 产生的腹水将合成对 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物具有高结合特异性的 α -SNAP-25 单克隆抗体,从而允许相对于 SNAP-25₂₀₆ 未裂解底物优先识别该裂解产物。

[0364] 对于免疫沉淀分析,通过分析蛋白质 A(HiTrap™ Protein A HP Columns, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ),纯化的 α -SNAP-25 单克隆抗体使未裂解的 SNAP-25₂₀₆ 底物和裂解的 SNAP-25₁₉₇ 产物沉淀的能力来确定结合特异性。参见例如,第 8 章 Storing and Purifying Antibodies,第 309 页 - 第 311 页, Harlow 和 Lane,同上文, 1998a。如上文所述,接种适合密度的 PC12 细胞,使其生长,并用含有 pQBI-25/GFP 表达构建体(对照细胞;SEQ ID NO:53)的转染溶液或含有 pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 表达构建体(实验细胞)的转染溶液进行转染。pQBI-25/GFP 表达构建体包含其启动子元件功能性连接到编码 GFP 的多核苷酸(SEQ ID NO:54)的表达载体。过夜孵育后,通过抽吸生长培养基并用 200 μ L 1×PBS 冲洗各孔来洗涤细胞。为收获细胞,抽吸出 PBS,通过加入免疫沉淀裂解缓冲液,并在 4℃ 下孵育 1 小时来裂解细胞,该免疫沉淀裂解缓冲液包含 50mM HEPES、150mM NaCl、1.5mM MgCl₂、1mM EGDT、10% 甘油、1% Triton®X-100(聚乙二醇辛基苯醚)和 1×COMPLETE™ 蛋白酶抑制剂混合液(Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN)。在 4℃ 下,以 3,000×g 离心裂解的细胞 10 分钟,以除去细胞碎片,并将上清液转移到清洁的试管中,并将其稀释到约 1mg/mL 的蛋白质浓度。将约 5 μ g 纯化的单克隆抗体加入 0.5mL 稀释过的上清液,并在 4℃ 下孵育 2 小时。在一抗孵育后,将约 50 μ L 固定的蛋白质 G(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)加入稀释的上清液中,并在 4℃ 下孵育 1 小时。通过加入

0.5mL 免疫沉淀裂解缓冲液来洗涤经过 孵育的上清液 3 次,每次持续 30 分钟,在 4℃下以 300×g 离心 1 分钟,以使固定的蛋白质 G 形成粒状沉淀,并倾析出上清液。洗涤后,将颗粒再悬浮于 30 μl 1×SDS 上样缓冲液中,并将样本加热到 95℃,保持 5 分钟。为检测未裂解的 SNAP-25₂₀₆ 底物和裂解的 SNAP-25₁₉₇ 产物的存在,如实施例 I 中所述,借助蛋白质印迹来分析每一收获的样本的等分试样,但所用的一抗为 α-SNAP-25 多克隆抗体血清的 1 : 1,000 稀释液(见实施例 V),且所用的二抗为兔 α-IgG 辣根过氧化物酶(Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 的 1 : 20,000 稀释液。表 21 显示通过免疫沉淀分析特异性沉淀 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物的含 α-SNAP-25 抗体的腹水。免疫沉淀分析表明,由克隆 2E2A6 和 3C1A5 产生的腹水将合成对 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物具有高结合特异性的 α-SNAP-25 单克隆抗体,其允许相对于 SNAP-25₂₀₆ 未裂解底物优先识别该裂解产物。

[0365]

表 21. 含 α-SNAP-25 单克隆抗体的克隆腹水的分析

克隆	基于细胞的测定		免疫细胞化学		免疫沉淀	
	SNAP-25	SNAP-25	SNAP-25	SNAP-25	SNAP-25	SNAP-25
	197	206	197	206	197	206
1D3B8	++	—	++	—	未测试	未测试
1G10A 12	++	++	未测试	未测试	未测试	未测试
2C9B10	++	—	++	—	未测试	未测试
2E2A6	++	—	++	—	++	—
2F11B6	+	+	+	+	未测试	未测试
3C1A5	++	—	++	—	++	—
3C3E2	+	—	未测试	未测试	未测试	未测试
MC-60 50	—	+	未测试	未测试	未测试	未测试

[0366]

MC-60 53	—	+	未测试	未测试	未测试	未测试
SMI-81	-/+	++	未测试	未测试	未测试	未测试

[0367] 5. α-SNAP-25 单克隆抗体结合亲和力评估。

[0368] 为确定对 SNAP-25₁₉₇ 裂解产物或 SNAP-25₂₀₆ 未裂解底物显示高结合特异性的

α -SNAP-25 单克隆抗体的结合亲和力,使用羧甲基葡聚糖 (CM5) 传感器芯片 (BIAcore, Piscataway, NJ),在 BIAcore 3000 仪器上进行结合亲和力测定。在 25℃下,用包含 10mM HEPES (pH 7.4)、150mM 氯化钠、3mM EDTA、0.005% (v/v) 表面活性剂 P20 的 HBS-EP 缓冲液,以 10 μ L/min 的流速进行流挂。使用标准氨基偶联,将包含氨基酸 134-197 (SEQ ID NO:5) (SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇) 或氨基酸 134-206 (SEQ ID NO:5) (SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆) 的 SNAP-25 肽共价连接到 CM5 传感器芯片表面。简言之,通过历时 7 分钟注入 0.2M 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺与 0.05M N-羟基丁二酰亚胺的混合物,激活 CM5 芯片;然后以 10 μ L/min 的流速将 SNAP-25 肽注入 10mM 乙酸钠 (pH 4.0) 中,耗时 20 分钟;并通过历时 7 分钟注入 1M 乙醇胺盐酸盐 (pH 8.5) 来封闭未反应的丁二酰亚胺酯。以响应单位增加 100-150 (约 0.10-0.15ng/mm²) 来反映芯片上 SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ 或 SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ 的固定量。使包含由克隆 1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5 和 3C3E2 产生的腹水或纯化的单克隆抗体的抗体以及可商购获得的 α -SNAP-25 抗体的样本通过 CM5 芯片的表面,允许保持 10 分钟的缔合时间和 20 分钟的解离时间。在每轮分析之间,通过以 15 μ L/min 的流速历时 1 分钟注入 10mM 甘氨酸-HCl (pH 2.5) 使表面在流挂之间再生。利用 BIAevaluation 3.0 软件,将感应图曲线与 1:1 动力学结合模型相拟合。

[0369] 结果表明,2E2A6 和 3C1A5 对裂解的 SNAP-25₁₉₇ 产物的特异性均高于 SNAP-25 未裂解的底物 (表 22)。当与 MC-6050 和 MC-6053 的结合亲和力相比较时,1D3B6 对 SNAP-25 裂解产物的平衡解离常数是这些商用抗体的约 10 倍 (表 22)。有趣的是,2E2A6 对 SNAP-25 裂解产物的平衡解离常数仅略低于这些商用抗体 (0.405nM 对 0.497 和 0.508) (表 22)。由于这些商用 α -SNAP-25 抗体都不能选择性识别 SNAP-25 裂解产物 (表 21),故低于约 0.5nM 的平衡解离常数看起来在某种程度上对实现这种选择很关键。类似地,当与 MC-6050 和 MC-6053 的结合亲和力相比较时,2E2A6 的分解速率 / 解离常数慢约至少 1 倍 (6.74×10^{-5} 对 $8.82 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 和 $1.18 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$) (表 22)。这进一步表明,低于约 8.82×10^{-4} 的分解速率 / 解离常数看起来在某种程度上对实现 SNAP-25 裂解产物的选择性结合很关键。该结果与 1D3B8 一致,其分解速率 / 解离常数为 $5.78 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ (表 22)。

[0370]

表 22. 结合亲和力 α -SNAP-25 单克隆抗体的分析				
SPR 参数	1D3B8		2E2A6	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^a	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^b
Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	1.06 × 10 ⁶	—	1.70 × 10 ⁶ (1.66 × 10 ⁵)	— (—)
Kd (s ⁻¹)	5.78 × 10 ⁻⁵	—	1.53 × 10 ⁻⁴ (6.74 × 10 ⁻⁵)	— (—)
KD (nM)	0.050	—	0.090 (0.405)	— (—)
SPR 参数	3C1A5		2C9B10	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^c	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^d
Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	2.17 × 10 ⁵	—	1.15 × 10 ⁴	—

[0371]

Kd (s ⁻¹)	2.88 × 10 ⁻⁴	—	3.11 × 10 ⁻⁴	—
KD (nM)	1.33	—	27.1	—
SPR 参 数	MC-6050		MC-6053	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	1.78 × 10 ⁶	3.06 × 10 ²	2.32 × 10 ⁶	1.06 × 10 ²
Kd (s ⁻¹)	8.82 × 10 ⁻⁴	6.07 × 10 ⁻³	1.18 × 10 ⁻³	2.56 × 10 ⁻⁵
KD (nM)	0.497	19,800	0.508	240
^a 当 10 分钟缔合时间之后多达 125 nM 的 α-SNAP-25 单克隆抗体 1D3B8 通过 CM5 传感器芯片的表面时, 未观察到结合。 ^b 当 10 分钟缔合时间之后多达 10 μM 的 α-SNAP-25 单克隆抗体 2E2A6 通过 CM5 传感器芯片的表面时, 未观察到结合。 ^c 当 10 分钟缔合时间之后多达 100 nM 的 α-SNAP-25 单克隆抗体 3C1A5 通过 CM5 传感器芯片的表面时, 未观察到结合。 ^d 当在 10 分钟缔合时间之后多达 100 nM 的 α-SNAP-25 单克隆抗体 2C9B10 通过 CM5 传感器芯片的表面时, 未观察到结合。				

[0372] 为比较 6 种不同的抗体, 使用 BIA 评估 4.1 软件的程序将结合速率 (ka) 和分解速率 (kd) 分别归一化。为比较结合速率, 首先通过删除再生部分和注射峰个别地整理数据, 随后将数据归一化到 0 到 100 标度。对于分解速率的比较, 将数据归一化到注射停止点 / 顶部点。该分析显示, 2C9B10 的结合速率比其它抗体慢很多 (图 7A), 而且 MC-6053 的分解速率 (解离) 比其它抗体快很多 (图 7B)。MC-6053 的分解速率较快表明, 这种抗体不能很好地在本说明书中公开的方法中发挥作用, 因为该抗体在洗涤步骤期间很难保持于底物抗原结合。

[0373] 6. 对分离的 α-SNAP-25 单克隆抗体的表位测序。

[0374] 为确定可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的分离的 α-SNAP-25 单克隆抗体的表位, 对编码由杂交瘤 1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5 和 3C3E2 产生的 α-SNAP-25 单克隆抗体的可变重链 (V_H) 和可变轻链 (V_L) 的

多核苷酸分子进行测序。使用标准方案从各杂交瘤中提取出 mRNA 并加以纯化,并且使用寡聚 dT 反义引物或基因特异性(鼠类 IgG1CH 和 κ CL)反义引物将 mRNA 逆转录为 cDNA。在产生 cDNA 后,使用特异性鼠类和人恒定域引物,通过 PCR 来扩增 cDNA,以确定抗体的同种型。使用简并 V_H 和 V_L 引物扩增 cDNA 中的可变域。对于 5'RACE,将同聚物 dCTP 尾部添加到 cDNA 的 3'端。随后,用寡聚 dG 正义引物和基因特异性(CH/KC)反义引物扩增重链和轻链。PCR 产物包括信号肽、可变域和恒定域至反义引物的序列。对 PCR 产物进行凝胶纯化,以除去小片段,并克隆到平端或 TA 载体中以供测序。对每条链的 5 个独立克隆进行测序,并确定 V_H 和 V_L 链和一致序列的比对。用于测定 V_H 和 V_L 氨基酸序列的方法描述于例如以下文献中:Roger A. Sabbadini 等,Novel Bioactive Lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same,美国专利公开 2007/0281320;和 Peter Amersdorfer,等,Molecular Characterization of Murine Humoral Immune Response to Botulinum Neurotoxin Type A Binding Domain as Assessed by Using Phage Antibody Libraries,65(9)Infect. Immun. 3743-3752,各文献的全部内容以引用的方式并入本文。此外,商用服务可用于对抗体可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)进行测序,并鉴别 CDR 区,参见例如,Fusion Antibodies Ltd.,Northern Ireland。在一种情况下,对于 3C1A5 的 V_L 区,也可通过用高分辨率 2DE 电泳法分离经过亲和纯化的抗体,随后在用蛋白水解消化后,使用高分辨率纳米 LC-MSMS 对这种蛋白质进行肽段指纹分析(peptide fragmentation fingerprinting analysis),对氨基酸序列进行测定。

[0375] 构成由本说明书中公开的杂交瘤产生的 α -SNAP-25 单克隆抗体的 V_H 链和 V_L 链的多核苷酸序列如下:1D3B8 V_H (SEQ ID NO:71)、2C9B10 V_H (SEQ ID NO:73)、2E2A6 V_H (SEQ ID NO:75)、3C1A5 V_H (SEQ ID NO:77)、3C3E2 V_H 变体 1(SEQ ID NO:79)、3C3E2 V_H 变体 2(SEQ ID NO:81)、3C3E2 V_H 变体 3(SEQ ID NO:132)、1D3B8 V_L (SEQ ID NO:83)、2C9B10 V_L (SEQ ID NO:85)、2E2A6 V_L (SEQ ID NO:87)、3C1A5 V_L (SEQ ID NO:89) 和 3C3E2 V_L (SEQ ID NO:91)。构成由本说明书中公开的杂交瘤产生的 α -SNAP-25 单克隆抗体的 V_H 链和 V_L 链的氨基酸序列如下:1D3B8 V_H (SEQ ID NO:72)、2C9B10 V_H (SEQ ID NO:74)、2E2A6 V_H (SEQ ID NO:76)、3C1A5 V_H (SEQ ID NO:78)、3C3E2 V_H 变体 1(SEQ ID NO:80)、3C3E2 V_H variant 2(SEQ ID NO:82);3C3E2 V_H 变体 2(SEQ ID NO:133)、1D3B8 V_L (SEQ ID NO:84)、2C9B10 V_L (SEQ ID NO:86)、2E2A6 V_L (SEQ ID NO:88)、3C1A5 V_L (SEQ ID NO:90) 和 3C3E2 V_L (SEQ ID NO:92)。包含由杂交瘤 1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5 和 3C3E2 产生的 α -SNAP-25 单克隆抗体的 V_H 和 V_L CDR 域的氨基酸序列提供于表 23 中。

[0376]

表 23. 来自 α -SNAP-25 单克隆抗体的 V _H 和 V _L 域的 CDR 序列			
CDR	序列	标识符	SEQ ID NO:
V _H CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6	93
		2C9B10	
		3C1A5	
V _H CDR 1	TFTNYVIH	3C3E2	94
V _H CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95

[0377]

V _H CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V _H CDR 2	YLFPNGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5	97
V _H CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C3E2	98
V _H CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V _H CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5	100
V _H CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
V _H CDR 3	ARMDY	3C3E2var1	102
V _H CDR 3	ARMGY	3C3E2var2	134
V _H CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C3E2var3	135
V _L CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
V _L CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
V _L CDR 1	KSSQSLLYTNGKTYLT	2E2A6	105
V _L CDR 1	KSSQSLLNTNGKTYLT	3C1A5	106
V _L CDR 1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
V _L CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
V _L CDR 2	NAKSLAE	2C9B10	109
V _L CDR 2	LVSELDs	2E2A6	110
V _L CDR 2	LVSKLDS	3C1A5	111
V _L CDR 2	YASQsIS	3C3E2	112
V _L CDR 3	FQGSHVPPT	1D3B8	113
V _L CDR 3	QHhYGTPYT	2C9B10	114
V _L CDR 3	LQSAHFPPT	2E2A6	115

[0378]

V _L CDR 3	LQSSHFPFT	3C1A5	116
V _L CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

[0379] 包含由本说明书中公开的杂交瘤产生的 α -SNAP-25 单克隆抗体的 V_H CDR 域变体的氨基酸序列的非限制性实例包括:1D3B8, 的 V_H CDR1 变体 SEQ ID NO:118;2C9B10、2E2A6 和 3C1A5V_H 的 V_H CDR1 变体 SEQ ID NO:119;3C1A5 V_H 和 3C3E2 变体 3 的 V_H CDR1 变体 SEQ ID NO:120;1D3B8 和 2E2A6 的 V_H CDR2 变体 SEQ ID NO:121;2C9B10 和 3C1A5 V_H 的 V_H CDR2 变体 SEQ ID NO:122;3C1A5 V_H 和 3C3E2 变体 3 的 V_H CDR2 变体 SEQ ID NO:123;1D3B8 和 2C9B10 的 V_H CDR3 变体 MDY;2E2A6 和 3C1A5 V_H 的 V_H CDR3 变体 MGY;以及 3C1A5 V_H 和 3C3E2 变体 3 的 V_H CDR3 变体 SEQ ID NO:124。包含由本说明书中公开的杂交瘤产生的 α -SNAP-25 单克隆抗体的 V_L CDR 域变体的氨基酸序列的非限制性实例包括:1D3B8 的 V_L CDR1 变体 SEQ ID NO:125;2C9B10 的 V_L CDR1 变体 SEQ ID NO:126;2E2A6 的 V_L CDR1 变体 SEQ ID NO:127;3C1A5 的 V_L CDR1 变体 SEQ ID NO:128;3C3E2 的 V_L CDR1 变体 SEQ ID NO:129;1D3B8 的 V_L CDR2 变体 KVS;2C9B10 的 V_L CDR2 变体 NAK;2E2A6 的 V_L CDR2 变体 LVS;3C1A5 的 V_L CDR2 变体 YAT;以及 3C3E2 的 V_L CDR2 变体 YAS。

[0380] 实施例 VIII

[0381] 选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有游离羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 多克隆抗体的开发

[0382] 以下实施例说明如何制备可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 表位的 α -SNAP-25 多克隆抗体。

[0383] 为开发可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 多克隆抗体,将具有 10 个残基的肽 CGGGRIDEANQ(SEQ ID NO:46) 设计为 SNAP-25 裂解产物抗原。这种肽包含与 KLH 缀合的 N 末端半胱氨酸残基、连接到人 SNAP-25 的氨基酸 191-197(SEQ ID NO:5) 的 G- 间隔子柔性间隔子 (GGG),并具有羧基化 C- 末端谷氨酰胺。Blast 搜索显示,这种肽只与 SNAP-25 具有高同源性,并且几乎不可能与神经元细胞中的其它蛋白质发生交叉反应。也可利用计算机算法小心地细查序列,以确定亲水性指数、蛋白质表面概率、柔性区和有利的二级结构,随后适当的定位和呈递所选肽序列。合成肽,并且将其与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 缀合,以增加免疫原性。在对动物进行免疫之前,首先在蛋白印迹中针对来自候选细胞系的细胞裂解物筛选本地兔,以鉴别对细胞裂解物中存在的蛋白质不具免疫反应性的动物。用这种肽使两只预先筛选出来的兔免疫,并在约 8 周内进行 3 次免疫,之后抽取兔的血液进行测试。将血液在 4℃ 下孵育 60 分钟,以使血液凝块。在 4℃ 下以 10,000xg 离心凝块血 10 分钟,以使细胞碎片形成粒状沉淀。将所得血清样本分成 50 μ l 的等分试样,并储存于 -20℃ 下待用。

[0384] 使用基于本说明书中公开的其它 SNAP-25 抗原的类似策略来开发可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 的 α -SNAP-25 多克隆抗体。例如, SNAP-25 抗原 SEQ ID NO:47 可以缀合到 KLH,而不是 SNAP-25 抗原 SEQ ID NO:46。再例如,来自 SNAP-25 抗原 SEQ ID NO:38 的人 SNAP-25 的氨基酸 191-197 可以替换为 SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:44。

[0385] 2. 针对 α -SNAP-25 多克隆抗体的存在的筛选。

[0386] 为确定可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的 α -SNAP-25 多克隆抗体的存在,如实施例 III 所述,使用提取的兔血清进行比较性 ELISA 和基于细胞的裂解分析。来自两只兔的血清含有可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的 α -SNAP-25 多克隆抗体。 α -SNAP-25 兔多克隆抗体命名为 NTP 22 和 NTP 23。

[0387] 3. α -SNAP-25 多克隆抗体的纯化。

[0388] 为纯化可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的 α -SNAP-25 多克隆抗体,使用含有 SNAP-25 抗原 SEQ ID NO:46 的亲合柱来纯化来自兔血清的 NTP 22 抗体和 NTP 23 抗体。

[0389] 4. α -SNAP-25 多克隆抗体结合特异性的评估。

[0390] 为评估可选择性结合在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 抗原的 α -SNAP-25 多克隆抗体的结合特异性,如实施例 III 中所述,通过基于细胞的活性测定、免疫细胞化学和免疫沉淀法,使用纯化的 NTP 22 和 NTP 23 α -SNAP-25 多克隆抗体来检测裂解产物。基于细胞的裂解测定、免疫细胞化学分析和免疫沉淀分析都表明,NTP 22 和 NTP 23 α -SNAP-25 多克隆抗体不与未裂解的 SNAP-25 交叉反应。因此,NTP 22 和 NTP 23 均对裂解的 SNAP-25₁₉₇ 产物具有高结合特异性,从而允许相对于 SNAP-25₂₀₆ 未裂解底物来说优先识别这种裂解产物。如实施例 III 中所述,可使用 BiAcore 中的 SPR 测定抗原的亲合力。

[0391] 实施例 IX

[0392] 夹心 ELISA 法的组分和条件准备

[0393] 以下实施例说明如何鉴别和准备进行夹心 ELISA 所需的组分和条件,这种夹心 ELISA 是通过使用对在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P_1 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 具有特异性的 α -SNAP-25 单克隆抗体检测 SNAP-25 裂解产物,来进行用于检测重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法。

[0394] 1. 用重靶向内肽酶处理过的细胞的细胞裂解物的制备。

[0395] 为获得用重靶向内肽酶处理过的细胞裂解物来进行分析,将适合密度的来自 Neuro-2a 的储备培养物的细胞接种于含有 50mL 无血清培养基的 T175 烧瓶中,所述无血清培养基含有 MEM 培养基 (Minimum Essential Medium)、含厄尔平衡盐 (Earle's salt) 的 2mM GlutaMAX™ I、1×B27 添加物、1×N2 添加物、0.1mM 非必需氨基酸、10mM HEPES。在 37℃ 培养箱中 5% 二氧化碳下孵育这些细胞,直到细胞分化,如通过标准和常规形态学标准评估,例如生长停滞和神经突延伸 (约 2 到 3 天)。作为对照物,将适合密度的来自 Neuro-2a 的储备培养物的细胞接种于含有 50mL 适宜的生长培养基 (表 1) 的 T175 烧瓶中。使这些未分化的对照细胞在 37℃ 培养箱中 5% 二氧化碳下生长,直到达到 50% 汇合 (约 18 小时)。从各孔中抽吸出分化培养物和未分化对照培养物的培养基,并用含有 0 (未处理的样本) 或 10nM 的重靶向内肽酶的新鲜培养基替换。过夜培养后,洗涤细胞,并通过在恒定搅动下,在 4℃ 下于新制的 Triton X-100 裂解缓冲液 (50mM HEPES、150mM NaCl、1.5mM MgCl₂、1mM EGTA、1% Triton X-100) 中裂解细胞 30 分钟,来收获细胞。使用台式离心机,在 4℃ 下以 4000rpm 离心裂解的细胞 20 分钟,以去除碎片。通过 Bradford 测定来测量细胞裂解物的蛋白质浓度。

[0396] 2. 夹心 ELISA 组分的制备和鉴别。

[0397] 为鉴别适宜的捕捉抗体-检测抗体对,对 26 种不同的捕捉抗体和检测抗体对的组合进行 ECL 夹心 ELISA 分析,这些组合中包含 11 种不同的 α -SNAP-25 捕捉抗体和 7 种不同的 α -SNAP-25 检测抗体(表 12)。所用的 α -SNAP-25 抗体是本说明书中公开的 2E2A6 和 3C1A5 α -SNAP-25 小鼠单克隆抗体;本说明书中公开的 SMI-81、MC-6050 和 MC-6053 α -SNAP-25 小鼠单克隆抗体;本说明书中公开的 NTP 23 α -SNAP-25 兔多克隆抗体;S9684 α -SNAP-25 兔多克隆抗体(Sigma, St. Louis, MO);H-50 α -SNAP-25 兔多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA);C-18 α -SNAP-25 山羊多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA);N-19 α -SNAP-25 山羊多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA);以及 SP12 α -SNAP-25 小鼠多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)。

[0398] 为制备捕捉抗体溶液,使用标准蛋白质 A 纯化方案,纯化来自杂交瘤细胞系 2E2A6 和 3C1A5 的腹水中所含的 α -SNAP-25 单克隆抗体,以及 α -SNAP-25MC-6050 和 MC-6053 单克隆抗体。所有其它 α -SNAP-25 抗体都是购买为纯化抗体。

[0399] 为制备检测抗体溶液,根据制造商说明书(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD),将适合的 α -SNAP-25 抗体与钆(II)-三-二吡啶-(4-甲基磺酸酯) NHS 酯标记试剂(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)缀合。按以下方式进行缀合反应:将 30 μ L 蒸馏水重悬的 MSD SULFO-TAG™ 储备液加入 200 μ L 2mg/mL α -SNAP-25 多克隆抗体中,并在室温下于暗处孵育该反应 2 小时。使用标准离心柱纯化标记抗体,并使用标准比色蛋白分析来测定蛋白质浓度。使用分光光度计在 455nm 下测量 α -SNAP-25 抗体/MSD SULFO-TAG™ 缀合物的吸光度,以确定浓度(以摩尔/升为单位)。在 4℃ 下储存检测抗体溶液待用。

[0400] 为制备包含对 SNAP-25 裂解产物具特异性的捕捉抗体的固相载体,将约 5 μ L 适当的 α -SNAP-25 单克隆抗体溶液(20 μ g/mL 的 1×PBS 溶液)加入 96 孔 MSD High Bind 板的各孔中,并使溶液在生物安全柜中风干 2 到 3 小时,以便对溶液进行液体蒸发。随后,通过加入 150 μ L 包含 2% Amersham 封闭剂(GE Life Sciences, Piscataway, NJ)和 10% 山羊血清(VWR, West Chester, PA)的封闭缓冲液,在室温下封闭结合捕捉抗体的孔 2 小时。密封封闭的板并在 4℃ 下储存待用。

[0401] 为通过 ECL 夹心 ELISA 分析来检测裂解的 SNAP-25 裂解产物的存在,如上文所述,从储存板各孔中抽吸出封闭缓冲液,将 25 μ L 用重靶向内肽酶处理过的细胞的裂解物加入各孔中,并在 4℃ 下孵育板过夜。通过抽吸细胞裂解物并用 200 μ L 1×PBS、0.1% TWEEN-20®(聚氧化乙烯(20)山梨聚糖单月桂酸酯)冲洗各孔 3 次,将板中各孔洗涤 3 次。洗涤之后,向各孔中加入 25 μ L 包含 1×PBS 中的 2% Amersham 封闭试剂、0.1% TWEEN-20®(聚氧化乙烯(20)山梨聚糖单月桂酸酯)的 5 μ g/mL 检测抗体溶液,将板密封,并在室温下振荡孵育密封的板 1 小时。在孵育检测抗体之后,用 200 μ L 1×PBS、0.1% TWEEN-20®(聚氧化乙烯(20)山梨聚糖单月桂酸酯)洗涤各孔 3 次。洗涤之后,将 150 μ L 1×读取缓冲液(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)加入各孔中,并使用 SECTOR™ Imager 6000 型图像读取器(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)读取板。通过用由 10nM 剂量的各抗体对获得的信号除以由 0nM 剂量的各抗体对获得的信号来计算比率(表 24)。这些结

果表明,在测试的 26 种不同的抗体对的组合中,只有 3 个抗体对在所测试的较高剂量下具有高于 10 : 1 的信噪比:第 1 号对(2E2A6 小鼠单克隆抗体和 S9684 兔多克隆抗体)、第 4 号对(3C1A5 小鼠单克隆抗体和 S9684 兔多克隆抗体)和第 18 号对(S9684 兔多克隆抗体和 2E2A6 小鼠单克隆抗体)。选择抗体对 1 进行进一步测定开发。

[0402]

表 24. α -SNAP-25 抗体组合的筛选

抗体 对编 号	捕捉抗体	检测抗体	检测 SNAP-25 裂 解产物	检测 SNAP-25 未 裂解底物	信噪比 (10 nM/0 nM)
1	2E2A6 小鼠单 克隆抗体	S9684 兔多 克隆抗体	是	否	26.6:1
2	2E2A6 小鼠单 克隆抗体	N-19 山羊多 克隆抗体	是	否	7.3:1
3	2E2A6 小鼠单 克隆抗体	H-50 兔多克 隆抗体	是	否	0.9:1
4	3C1A5 小鼠单 克隆抗体	S9684 兔多 克隆抗体	是	否	12.1:1
5	3C1A5 小鼠 单克隆抗体	N-19 山羊多 克隆抗体	是	否	1.9:1
6	3C1A5 小鼠单 克隆抗体	H-50 兔多克 隆抗体	是	否	0.9:1
7	C-18 山羊多 克隆抗体	S9684 兔多 克隆抗体	否	否	0.8:1
8	C-18 山羊多 克隆抗体	N-19 山羊多 克隆抗体	否	否	0.9:1
9	C-18 山羊多 克隆抗体	H-50 兔多克 隆抗体	否	否	0.9:1
10	H-50 兔多克 隆抗体	2E2A6 小鼠 单克隆抗体	是	否	0.9:1
11	H-50 兔多克 隆抗体	C-18 山羊多 克隆抗体	否	否	1.0:1

[0403]

12	N-19 山羊多 克隆抗体	2E2A6 小鼠 单克隆抗体	是	否	0.9:1
13	N-19 山羊多 克隆抗体	C-18 山羊多 克隆抗体	否	否	1.1:1
14	NTP 23 兔多 克隆抗体	N-19 山羊多 克隆抗体	是	否	1.2:1
15	NTP 23 兔多 克隆抗体	C-18 山羊多 克隆抗体	否	否	1.1:1
16	NTP 23 兔多 克隆抗体	SP12 小鼠 pAb	是	否	1.3:1
17	NTP 23 兔多 克隆抗体	H-50 兔多克 隆抗体	是	否	1.1:1
18	S9684 兔多克 隆抗体	2E2A6 小鼠 单克隆抗体	是	否	21.3:1
19	S9684 兔多克 隆抗体	C-18 山羊多 克隆抗体	否	否	0.7:1
20	S9684 兔多克 隆抗体	SMI-81 小鼠 单克隆抗体	是	是	1.2:1
21	SMI-81 小鼠 单克隆抗体	S9684 兔多 克隆抗体	是	是	1.1:1
22	SMI-81 小鼠 单克隆抗体	N-19 山羊多 克隆抗体	是	是	1.0:1
23	SMI-81 小鼠 单克隆抗体	C-18 山羊多 克隆抗体	否	否	0.8:1
24	SP12 小鼠多 克隆抗体	C-18 山羊多 克隆抗体	否	否	1.0:1
25	MC-6050 小鼠 单克隆抗体	S9684 兔多 克隆抗体	是	是	5.0:1

[0404]

26	MC-6053 小鼠 单克隆抗体	S9684 兔多 克隆抗体	是	是	7.1:1
----	---------------------	------------------	---	---	-------

[0405] 实施例 X

[0406] 使用 ECL 夹心 ELISA 进行的用于检测具有 BoNT/A 轻链酶活性的重靶向内肽酶的基于免疫的方法

[0407] 以下实施例说明用于检测重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法,该方法通过 ECL 夹心 ELISA,使用对在 BoNT/A 裂解位点易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 裂解产物具有特异性的 α -SNAP-25 单克隆抗体来检测 SNAP-25 裂解产物。

[0408] 为制备用具有 BoNT/A 轻链酶活性的重靶向内肽酶处理过的细胞的裂解物,将适合密度的来自确立细胞系的细胞接种于含有 100 μ L 适宜培养基的 96 孔组织培养板的各孔中。在 37°C 培养箱中 5% 二氧化碳下孵育这些细胞约 24 小时。从各孔中抽吸出细胞的培养基,并用含有 0 (未处理的样本) 或由对这种重靶向内肽酶的剂量响应实验测定的多种剂量中一种剂量的重靶向内肽酶的新鲜培养基替换。孵育 24 小时之后,洗涤并收获细胞。

[0409] 为制备 α -SNAP-25 捕捉抗体溶液,使用标准蛋白质 A 纯化方案,纯化来自杂交瘤细胞系 2E2A6 的腹水中所含的 α -SNAP-25 单克隆抗体。为制备 α -SNAP-25 检测抗体溶液,根据制造商说明书 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD),将 α -SNAP-25 兔多克隆抗体 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) 与钌 (II)-三-二吡啶-(4-甲基磺酸酯) NHS 酯标记试剂 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 缀合。缀合反应、标记的 α -SNAP-25 抗体的纯化、浓度测定和储存都如实施例 VI 中所述。

[0410] 为制备包含对 SNAP-25 裂解产物具特异性的捕捉抗体的固相载体,将约 5 μ L α -SNAP-25 单克隆抗体 2E2A6 溶液 (20 μ g/mL 的 1×PBS 溶液) 加入 96 孔 MSD High Bind 板的各孔中,并使溶液在生物安全柜中风干 2 到 3 小时,以便对溶液进行液体蒸发。随后封闭结合捕捉抗体的孔,并直接用于检测重靶向内肽酶活性。

[0411] 为通过 ECL 夹心 ELISA 分析检测裂解的 SNAP-25 产物的存在,从储存板的各孔中抽吸出封闭缓冲液,将 25 μ L 用重靶向内肽酶处理的细胞的裂解物加入各孔中,并在 4°C 下孵育板过夜。通过抽吸细胞裂解物并用 200 μ L 1×PBS、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 冲洗各孔 3 次,将板中各孔洗涤 3 次。洗涤之后,向各孔中加入 25 μ L 包含 1×PBS 中的 2% Amersham 封闭试剂、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 的 5 μ g/mL 检测抗体溶液,将板密封,并在室温下振荡孵育密封的板 1 小时。在孵育检测抗体之后,用 200 μ L 1×PBS、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 洗涤各孔 3 次。洗涤之后,将 150 μ L 1×读取缓冲液 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 加入各孔中,并使用 SECTOR™ Imager 6000 型图像读取器 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 读取板。如实施例 VI 中所述,分析收集到的数据,并计算 EC₅₀ 值。对于阿片重靶向内肽酶,这些结果表明,在 EC₅₀ 下检测到平均 1.0nM 的 Noc/A (在约 0.3nM 到约 2.0nM 的范围内),其中下渐近线的信噪比为约 15 : 1 到约 20 : 1;而上渐进线的信噪比为约 180 : 1 到约 300 : 1。

[0412] 实施例 XI

[0413] 使用 CL 夹心 ELISA 检测重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法

[0414] 以下实施例说明用于检测重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法,该方法通过 CL 夹心 ELISA,使用对在 BoNT/A 裂解位点 易分裂键的 P₁ 残基处具有羧基末端的 SNAP-25 具有特异性的 α -SNAP-25 单克隆抗体,来检测 SNAP-25 裂解产物。

[0415] 如实施例 VII 中所述进行制备用重靶向内肽酶处理过的细胞的裂解物和 α -SNAP-25 捕捉抗体溶液。

[0416] 为制备 α -SNAP-25 检测抗体溶液,根据制造商说明书 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL),将 α -SNAP-25 多克隆抗体 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) 与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合。按以下方式缀合反应:将 500 μ L 1mg/mL α -SNAP-25 多克隆抗体加入含有冻干的活性过氧化物酶的小瓶中,混合各组分,然后加入 10 μ L 氰基硼氢化钠。室温下,在通风橱中孵育该反应混合物 1 小时。淬灭反应之后,使用标准离心柱方案纯化标记抗体,并使用标准比色蛋白分析来测定蛋白质浓度。使用分光光度计,在 455nm 下测量 α -SNAP-25 多克隆抗体 /HRP 缀合物的吸光度,以确定浓度 (以摩尔 / 升为单位)。在 4°C 下储存 α -SNAP-25 检测抗体溶液待用。

[0417] 为制备包含对 SNAP-25 裂解的产物具有特异性的 α -SNAP-25 捕捉抗体的固相载体,将约 100 μ L α -SNAP-25 单克隆抗体 2E2A6 溶液 (1mg/mL 的 1×PBS 溶液) 加入 96 孔 Greiner 白色板 (Greiner white plate) 各孔中,并在 4°C 下孵育板过夜,然后丢弃任何过量的抗体溶液。然后通过加入 150 μ L 包含 2% Amersham 封闭试剂 (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) 和 10% 山羊血清 (VWR, West Chester, PA) 的封闭缓冲液,在室温下封闭结合捕捉抗体的孔 1 小时。丢弃封闭缓冲液,通过在纸巾上倒置板并轻叩,将其印迹在纸巾上。然后封闭结合捕捉抗体的孔,并直接用于检测重靶向内肽酶活性。

[0418] 为通过 CL 夹心 ELISA 分析检测裂解的 SNAP-25 产物的存在,将 50 μ L 用重靶向内肽酶处理的细胞的裂解物加入各孔中,将板密封,并在 4°C 下,在以 500rpm 旋转的振荡器上孵育密封的板 2-4 小时到过夜。通过抽吸细胞裂解物,并用 200 μ L 1×PBS、0.05% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 冲洗各孔 3 次,将板中各孔洗涤 3 次。洗涤之后,向各孔中加入 100 μ L 包含 1×PBS 中的 2% Amersham 封闭试剂、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 的 1mg/mL α -SNAP-25 多克隆抗体 /HRP 检测抗体溶液,密封板,并在室温下,在以 650rpm 旋转的振荡器上孵育密封的板 1 小时。在孵育检测抗体之后,用 200 μ L 1×PBS、0.05% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 洗涤各孔 3 次。洗涤之后,将 100 μ L SuperSignal ELISA Pico 1 : 1 混合物 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 加入各孔中,并使用光度计 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 在 395nm 下读取板。如实施例 VI 中所述,分析收集到的数据,并计算 EC₅₀ 值。

[0419] 实施例 XII

[0420] 使用多重 ECL 夹心 ELISA 进行的用于检测重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法

[0421] 以下实施例说明用于检测重靶向内肽酶活性的多重基于免疫的方法,该方法使用对 SNAP-25 裂解产物具有特异性的 α -SNAP-25 单克隆抗体和针对不同蛋白质的第二抗体对来检测 SNAP-25 裂解产物。

[0422] 重靶向内肽酶效力分析可以使用多重 ECL 夹心 ELISA 来进行。该分析描述于伴随提交的专利申请 Ester Fernandez-Salas 等, Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype

A Activity Assays, 美国专利申请第 12/403, 531 号 (该专利的全部内容以引用的方式并入本文) 中, 并且可以使用本说明书中公开的细胞系和重靶向内肽酶以及相应的细胞系进行。

[0423] 实施例 XIII

[0424] 使用多重 ECL 夹心 ELISA 检测重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法

[0425] 以下实施例说明用于检测重靶向内肽酶活性的多重基于免疫的方法, 该方法使用对 SNAP-25 裂解产物具有特异性的 α -SNAP-25 单克隆抗体和针对不同蛋白质的第二抗体来检测 SNAP-25 裂解产物。

[0426] 可使用多重 EC 夹心 ELISA 来进行重靶向内肽酶效力测定。该测定描述于伴随提交的专利申请 Ester Fernandez-Salas 等, Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, 美国专利申请第 12/403, 531 号, 该专利申请的全部内容以引用的方式并入本文中, 并且可以使用本说明书中公开的细胞系和重靶向内肽酶以及相应的细胞系来使用该测定。

[0427] 实施例 XIV

[0428] 用于检测纳摩尔浓度量的重靶向内肽酶的基于免疫的方法

[0429] 以下实施例说明如何进行用于检测纳摩尔浓度量的重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法。

[0430] 1. 使用 ECL 夹心 ELISA 检测重靶向内肽酶的基于免疫的方法。

[0431] 为制备用重靶向内肽酶处理的细胞的裂解物, 将约 50, 000 到 150, 000 个来自适于本测定的确立细胞系的细胞接种于含有 100 μ L 适宜培养基 (参看实施例 I 和实施例 II) 的涂有聚 D-赖氨酸的 96 孔组织培养板的各孔中。在 37°C 培养箱中 5% 二氧化碳下孵育这些细胞 24 小时。从各孔中抽吸出细胞的培养基, 并用含有 0 (未处理的样本) 和本申请中所述的适宜剂量响应的各重靶向内肽酶的新鲜培养基替换。孵育 24 小时之后, 洗涤并收获细胞, 或在收获前, 在没有重靶向内肽酶的情况下再孵育 2 天。为收获细胞, 抽吸出培养基, 并用 1 $\times$ PBS 洗涤, 且通过向各孔中加入 30 μ L 包含 50mM HEPES、150mM NaCl、1.5mM MgCl₂、1mM EGTA、1% Triton X-100 的裂解缓冲液裂解, 在 4°C 下, 在以 500rpm 旋转的振荡器上孵育板 30 分钟。在 4°C 下以 4000rpm 离心板 20 分钟, 以使细胞碎片形成粒状沉淀, 并将上清液转移到涂有捕捉抗体的 96 孔板中, 以进行检测步骤。

[0432] 如实施例 VII 中所述进行制备 α -SNAP-25 捕捉抗体溶液、 α -SNAP-25 检测抗体溶液以及包含对 SNAP-25 裂解的产物具有特异性的捕捉抗体的固相载体。

[0433] 为通过 ECL 夹心 ELISA 分析检测 SNAP-25 裂解产物的存在, 从储存板中抽吸出封闭缓冲液, 将 25 μ L-30 μ L 的用重靶向内肽酶处理的细胞的裂解物加入各孔中, 并在 4°C 下孵育板 2 小时或 24 小时。通过抽吸细胞裂解物并用 200 μ L 1 $\times$ PBS、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 冲洗各孔 3 次, 而将板中各孔洗涤 3 次。洗涤之后, 向各孔中加入 25 μ L 包含 1 $\times$ PBS 中的 2% Amersham 封闭试剂、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 的 5 μ g/mL α -SNAP-25 检测抗体溶液, 密封板, 并在室温下振荡孵育密封的板 1 小时。在孵育 α -SNAP-25 检测抗体之后, 用 200 μ L 1 $\times$ PBS、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 洗涤各孔 3 次。洗涤之后, 处理板, 分析收集到的数据, 并如实施例 VI 中所述计算 EC₅₀ 值。这些结果表明, 当使用 SK-N-DZ 无

性细胞系 #3 细胞时,在 EC_{50} 下检测到平均 1.0nM 的 Noc/A (在约 0.3nM 到约 2.0nM 的范围内),其中上渐进线的信噪比为约 20 : 1 到约 300 : 1。此外,当使用 AGN P33 无性细胞系 #6 细胞时,在 EC_{50} 下检测到平均 3.7nM 的 Noc/A (在约 2.0nM 到约 5.5nM 的范围内),其中上渐进线的信噪比为约 20 : 1 到约 500 : 1。对于对含有强啡肽 A 配体的重靶向内肽酶具有特异性的 SK12 细胞,当使用 SK12 细胞时,在 EC_{50} 下检测到平均 8.4nM 的 Dyn/A (在约 4.5nM 到约 10.0nM 的范围内),其中上渐进线的信噪比为约 10 : 1 到约 20 : 1。此外,当使用 Neuro-2a 无性细胞系 #7 细胞时,在 EC_{50} 下检测到平均 8.8nM 的 TVEMP- 甘丙肽 (在约 5.0nM 到约 15.5nM 的范围内),其中上渐进线的信噪比为约 20 : 1 到约 200 : 1。本方法也可如实施例 IX 中所述按多重方式进行。

[0434] 2. 使用 CL 夹心 ELISA 进行的用于检测重靶向内肽酶的基于免疫的方法。

[0435] 如实施例 VII 中所述进行制备用重靶向内肽酶处理的细胞的裂解物和 α -SNAP-25 捕捉抗体溶液。如实施例 VIII 中所述进行制备 α -SNAP-25 检测抗体溶液和包含对 SNAP-25 裂解产物具有特异性的捕捉抗体的固相载体。

[0436] 为通过 CL 夹心 ELISA 分析检测 SNAP-25 裂解产物的存在,将 100 μ L 用重靶向内肽酶处理的细胞的裂解物加入各孔中,密封板,并在 4°C 下,在以 500rpm 旋转的振荡器上孵育密封的板 2 小时或 24 小时。通过抽吸细胞裂解物,并用 200 μ L 1×PBS、0.05% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 冲洗各孔 3 次,将板中各孔洗涤 3 次。洗涤之后,向各孔中加入 100 μ L 1×PBS 中的包含 2% Amersham 封闭试剂、0.1% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 的 1mg/mL α -SNAP-25 多克隆抗体/HRP 检测抗体溶液,密封板,并在室温下,在以 650rpm 旋转的振荡器上孵育密封的板 1 小时。在孵育检测抗体之后,用 200 μ L 1×PBS、0.05% TWEEN-20® (聚氧化乙烯 (20) 山梨聚糖单月桂酸酯) 洗涤各孔 3 次。洗涤之后,将 100 μ L SuperSignal ELISA Pico 1 : 1 混合物 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 加入各孔中,并使用光度计 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 在 395nm 下读取板。分析收集到的数据,并如实施例 VI 中所述计算 EC_{50} 值。本方法也可如实施例 IX 中所述按多重方式进行。

[0437] 实施例 XV

[0438] 用于检测中和 α -重靶向-内肽酶抗体的基于免疫的方法

[0439] 以下实施例说明如何进行可检测中和 α -Noc/A 抗体存在的基于免疫的方法。

[0440] Noc/A 是目前正在评估的用于治疗疼痛病症 (其中有一些为慢性的) 的抗体。反复长期利用 Noc/A 进行治疗,患者会产生针对重靶向内肽酶的中和 α -Noc/A 抗体,从而产生免疫抗性。中和 α -Noc/A 抗体将通过结合重靶向内肽酶的靶配体和 / 或转位域 (H_N), 阻止神经元和其它靶细胞中重靶向内肽酶的摄取,来抑制重靶向内肽酶活性。目前还没有用于测定患者血液中中和 α -Noc/A 抗体的存在的确立的测定。如果能够开发出一种检测用重靶向内肽酶治疗的患者体内的中和抗体的基于细胞的测定,就能节约成本和时间。

[0441] 为检测中和 α -Noc/A 抗体的存在与否,可以使用本说明书中公开的用于测定重靶向内肽酶活性的基于免疫的方法。一种方式是使用蛋白印迹检测法测定用各种浓度的 Noc/A 治疗后存在的 SNAP-25 裂解产物的量,另一种方式是使用 ECL 夹心 ELISA 检测法。

[0442] 为制备包含中和 α -Noc/A 抗体的样本,从用 Noc/A 免疫的猴的血液中分离出血清,并对抗体进行亲和纯化。也用痛敏肽变体肽 (Noc/A 分子中存在的靶配体) 使兔免疫,

收集其血清,并亲和纯化抗体(抗痛敏肽多克隆抗体)。

[0443] 为制备用包含 Noc/A 的样本处理的细胞的裂解物,将 SK-N-DZ 无性细胞系 #3 细胞和 AGN P33 无性细胞系 #6 细胞接种于涂有聚 D-赖氨酸的 96 孔板中,持续 16-18 小时。在含有 1nM 的 Noc/A 的 RPMI SFM(有 N2、B27 和 NGF 添加物)中稀释 0-3 $\mu\text{g/mL}$ 的抗痛敏肽多克隆抗体,并在室温下预孵育混合物 1 小时。然后将溶液加入细胞中,并孵育 24 小时,然后进行 ECL ELISA 测定。这种抗痛敏肽变体抗体在 1 $\mu\text{g/mL}$ 下完全封闭两种细胞系上 1nM Noc/A 摄取(> 90%抑制)。也在这些细胞系上测定抗 Noc/A 猴多克隆抗体。将细胞按 100,000 个细胞/孔接种于涂有聚 D-赖氨酸的 96 孔板中的补充有 N2、B27 和 NGF 的 RPMI 生长培养基中,持续 24 小时。在含有 1nM Noc/A 的培养基中稀释 0-20 $\mu\text{g/mL}$ 的抗 Noc/A 多克隆抗体,并在室温下预孵育混合物 1 小时。然后将混合物加入细胞中,并孵育 24 小时,然后进行 ECL ELISA 测定。在抗 Noc/A 多克隆抗体的浓度较高(6-20 $\mu\text{g/mL}$)的情况下,在 SK-N-DZ 细胞系上观察到高达 60%抑制,且在 AGN P33 无性细胞系 #6 细胞系上观察到约 30%抑制。这可能是由于抗 Noc/A 多克隆抗体对结合位点不具特异性,且含有结合该分子其它部分的其它抗体,从而导致在所测试的浓度下仅引起部分封闭。可能需要更高浓度来实现完全封闭。

[0444] 为通过蛋白印迹分析检测 SNAP-25 裂解产物的存在,从各孔中抽吸出培养基,使细胞悬浮于 50 μL 的 SDS-PAGE 上样缓冲液中,然后加热到 95 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 分钟。如实施例 I 中所述,通过蛋白质印迹分析每一收获的样本的等分试样,但通过 SDS-PAGE,使用 12% 26 孔 Criterion 凝胶(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)分离收获的样本,并使用兔多克隆 α -SNAP-25₁₉₇ 抗体血清作为一抗(参看实施例 V)。结果披露,最低浓度的重靶向内肽酶可在蛋白印迹中产生可检测的 SNAP-25 裂解产物带。

[0445] 为通过 ECL 夹心 ELISA 检测 SNAP-25 裂解产物的存在,如实施例 VI 中所述,除去各孔中的培养基并裂解细胞。如实施例 VIII 中所述进行制备 α -SNAP-25 捕捉抗体溶液、 α -SNAP-25 检测抗体溶液和 α -SNAP-25 固相载体。将上清液转移到 α -SNAP-25 固相载体中,并如实施例 VI 中所述进行 ECL 夹心 ELISA 测定。如实施例 VI 中所述,分析收集得到的数据,并计算 EC_{50} 值,但 EC_{50} 是抑制重靶向内肽酶活性达到其最大抑制的 1/2 所需的血清稀释度,而最大信号(信号_{max})与最小信号(信号_{min})的比率是通过用在最大抗体稀释度下获得的 SNAP-25 裂解产物信号除以在最低抗体稀释度下获得的信号而获得。

[0446] 结果表明,可检测出在猴血清中存在中和 α -Noc/A 抗体,且存在来自兔的 α -痛敏肽变体抗体。随着抗体稀释度降低,在经过亲和纯化的来自免疫动物的抗体中孵育的 Noc/A 分子的活性也降低。利用对每一测试化合物具有特异性的细胞系,用 Dyn/A 和 TVEMP-甘丙肽化合物进行相同的测定。

[0447] 实施例 XV

[0448] 针对甘丙肽重靶向内肽酶的基于细胞的测定的开发

[0449] 以下实施例说明如何鉴别具有开发基于细胞的效力测定所需的重靶向内肽酶摄取能力的确立细胞系。

[0450] 1. 候选细胞系的储备培养物的生长。

[0451] 为生长细胞系,将适合密度的来自测试细胞系的细胞接种于含 30mL 适合的生长培养基(参见表 25)的 162cm² 组织培养烧瓶中,并使其在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中 5%或 10%二氧化

碳下生长,直到细胞达到所需密度。

[0452]

表 25. 所有细胞系和其相应培养基的总表.		
细胞类型; 描述; 来源	完全培养基 (CM) 都来自 Invitrogen(除 非另外指明)	无血清培养基 (SFM) 都来自 Invitrogen(除非另 外指明)
SiMa (人成神经细胞瘤细胞系, DSMZ# ACC 164;	RPMI 1640	RPMI 1640 (90%)

[0453]

Braunschweig, Germany)	(90%)	
SiMa H1 (由 SiMa 细胞克隆的细胞系)	胎牛血清 (FBS, 10%) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), 丙酮酸钠(1 mM) 青霉素(100 U/ml) 链霉素(100 µg/ml),	NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), 丙酮酸钠(1 mM) 青霉素(100 U/ml) 链霉素(100 µg/ml) N2 添加物(1x) B27 添加物(1x)
Neuro-2a (小鼠成神经细胞瘤: (ATCC#CCl131, Manassas, VA)	Earle's MEM (90%) 胎牛血清 (10%) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), 丙酮酸钠(1	EMEM (90%) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), 丙酮酸钠(1 mM), 青霉素(100 U/ml), 链霉素(100 µg/ml)

[0454]

	mM), 青霉素(100 U/ml), 链霉素(100 µg/ml)	
PC-12 大鼠嗜铬细胞瘤 (ATCC # CRL-1721)	RPMI 1640 (90%) 经过透析的 FBS (5%) 马血清(10%) HEPES (10 mM) 丙酮酸钠(1 mM) D-葡萄糖 (0.5% ,Sigma 公司) 青霉素(100 U/ml); 链霉素(100 µg/ml) N2 添加物(1x)	<u>分化培养基:</u> RPMI 1640 (90%) HEPES (10 mM) 丙酮酸钠(1 mM) D-葡萄糖 (0.5% ,Sigma 公司) 青霉素(100 U/ml); 链霉素(100 µg/ml) N2 添加物(1x) 牛血清白蛋白(0.2% w/v) NGF (50 ng/ml, Promega)

[0455]

P19 小鼠胚胎性癌 (ATCC #CRL-1825)	α -MEM (90%) 小牛血清 (7.5%) FBS (2.5%) 青霉素(100 U/ml); 链霉素(100 μ g/ml)	α -MEM (90%) FBS (2.5%) 青霉素(100 U/ml); 链霉素(100 μ g/ml)
NEAA: 非必需氨基酸; MEM: 最小必需培养基。DMEM: Dulbecco MEM。EMEM-厄尔氏 MEM。请注意, PC-12 细胞在分化培养基中分化, 但不能在 SFM 中分化。		

[0456] 2. 针对对甘丙肽 TVEMP- 甘丙肽化合物的敏感性筛选商用细胞系

[0457] 针对通过用相应化合物处理后 SNAP25 的裂解情况所测量的细胞系对 TVEMP- 甘丙肽化合物的敏感性来筛选商用细胞系。使用各种 TVEMP- 甘丙肽化合物来筛选和测试。将 PC-12、Neuro-2a、SiMa 和 P19 细胞接种于无血清培养基中, 持续 3 天, 或接种于 CM 中, 持续 1 天。用 0 和 75nM 浓度的 TVEMP- 甘丙肽批料 A 处理这些分化的细胞和天然的细胞 18 小时。观察到裂解的 SNAP25 的存在量增加, 表明 TVEMP- 甘丙肽批料 A 在 PC-12 和 Neuro-2a 细胞中显示活性, 且在分化状态下 Neuro-2a 细胞对带有甘丙肽配体的 TVEMP 化合物的敏感性高于天然细胞。细胞活性的等级次序显示 PC-12 细胞的活性最高, 其次为 Neuro-2a 细胞, 最后为 SiMa 细胞。必要时, 需确定这种摄取是否对这些甘丙肽-重靶向化合物具有特异性, 且因此用不含甘丙肽配体的其它化合物测试细胞很重要。Noc/A 是一种含有痛敏肽变体配体的重靶向化合物, 且 LH_N/A (阴性对照) 是一种不含结合域的化合物。LH_N/A 的摄取不具特异性, 而如果细胞系对重靶向化合物具有特异性摄取, 那么 LH_N/A 的活性应明显低于 TVEMP- 甘丙肽化合物。先前已经显示 Noc/A 化合物在 SiMa 细胞中具有特异性摄取, 并用作测试细胞系的基线。有利的细胞系应对 LH_N/A 化合物和 Noc/A 化合物具有低摄取, 而对 TVEMP- 甘丙肽化合物具有高摄取。表 26 显示了由该实验的结果。

[0458]

表 26. 使用 TVEMP-甘丙肽在不同条件下进行筛选 PC-12、Neuro-2a 细胞和 SiMa 细胞.

		TVEMP-甘 丙肽批料 A	TVEMP-甘 丙肽批料 B	LH _N /A	Noc/A
浓度(mg/mL)		0.168	0.175	1.63	1.00
EC ₅₀ 值 (nM)	PC-12, 天然细胞	73.4 ± 10.7	105.6 ± 16.0	>200	72.9 ± 26.9
	SiMa, 天然细胞	138.6 ± 43.9	133.8 ± 24.2	>300	48.3 ± 18.1
	Neuro-2a, 天然细胞	122.4 ± 15.7	116 ± 17.5	>200	>150
	SiMa, 分化过夜	>400	>150	>400	16.1 ± 11.9
	Neuro-2a, 分化第 4 天		34.5 ± 7.5	39.7 ± 5.6	105.9 ± 44.3
	SiMa, 分化第 4 天	101.8 ± 20.5	65.3 ± 7.8	>150	88.7 ± 23.3

在各种细胞系上和各種生长/分化条件下进行的 TVEMP-甘丙肽批料 A 和批料 B 以及 LH_N/A 和 Noc/A 对照物测试。总表显示了所测试的每个化合物的细节和 EC₅₀ 值。

[0459] 结果显示,对于测试的细胞系,TVEMP-甘丙肽批料 A 和 TVEMP-甘丙肽批料 B 具有活性与阴性对照物类似或仅为阴性对照物的 1 到 2 倍的曲线或 EC₅₀ 值。该数据表明天然细胞不够敏感,且这些细胞须用编码甘丙肽受体蛋白 GalR1 或 GalR2 受体的质粒转染。

[0460] 3. 用 GalR 稳定转染 PC-12、Neuro-2a 和 SiMa 细胞。

[0461] 在转染前一天,将细胞按 0.5×10^6 个细胞 / 孔的密度接种于涂有胶原蛋白 IV 的 6 孔板 (Cat# 354554;BD Biosciences) (SiMa, PC-12) 或 6 孔 Costar 板 (Cat# 3516; Corning) (Neuro-2a) 中。通过将 12 μ l Lipofectamine™ 2000 (Cat# 52758, Invitrogen) 稀释于 250 μ l Opti-MEM® I 减血清培养基 (Cat# 3195, Invitrogen) 中,随后在室温下孵育 5 分钟,来进行转染。将 4 μ g GalR 质粒 DNA 与 0.4 μ g pAdVantage™ 载体 (1mg/ml, Cat# E1711, Promega) 混合于 250 μ l Opti-MEM® I 减血清培养基中,保持 5 分钟。孵育 5 分钟之后,将稀释的 Lipofectamine™ 2000 与稀释的质粒 DNA 混合,并在室温下再孵育 20 分钟,以形成复合物。同时,用 OPTI-MEM® 洗涤细胞,并将 0.5ml OPTI-MEM® 加入各孔中。孵育 20 分钟之后,将 0.5ml 含有稀释的 Lipofectamine™ 2000 与稀释的质粒 DNA 的复合

物小心地加入 0.5ml OPTI-MEM[®] 中的含有细胞的孔中。在 37℃ 下孵育板 5 小时,之后加入 1mL 完全培养基。次日,将培养基用生长培养基替换,孵育 48 小时。在第 4 天,回收转染的细胞,随后将生长培养基用含有 0.5mg/ml (1 : 100 稀释) Geneticin[®] (Cat# 10131 : Invitrogen) 的新鲜长培养基替换,并且再孵育 3 天。在转染后第 7 天,将细胞转移到含有生长培养基和遗传霉素 (0.5mg/ml, 1 : 100 稀释液) 的 75cm 胶原蛋白 IV 烧瓶 (Cat# 35423 : BD Biosciences) 中。进行此转移时,约 90% 的细胞死亡,并在更换培养基期间将其除去。每 2 天更换一次含有遗传霉素 (0.5mg/ml, 1 : 100 稀释) 的生长培养基,直到第 21 天。

[0462] 为选择能够吸收甘丙肽 TVEMP 化合物的稳定细胞,在使用用于捕获的涂有单克隆 2E2A6 的板和用于检测的磺基标记的多克隆 SNAP25 (Sigma, Cat# S9684) 抗体的 ECL 夹心 ELISA 中,各参数应能筛选出用 TVEMP-甘丙肽处理产生了最高百分数的 SNAP25 裂解产物的克隆。表 27 中的 EC₅₀ 值显示,在用 GalR1 和 GalR2 转染的 SiMa 和 Neuro-2a 细胞中,TVEMP-甘丙肽批料 D 展现的摄取是阴性对照物的至少 10 倍,而在经过转染的 PC-12 细胞中仅为 2 到 4 倍。由于经过转染的 PC-12 细胞的敏感性和特异性似乎低于 SiMa 和 Neuro-2a 细胞,故将不对其进行克隆。此外,由于 TVEMP-甘丙肽化合物中的甘丙肽 1 到 16 单体配体结合 GALR1 受体的亲和力高于 GALR2,故只克隆用 GALR1 转染的细胞。图中还显示,在 Neuro-2aGalR1 中,TVEMP-甘丙肽批料 C 和批料 D 展现的摄取是 LH_N/A 和重靶向痛敏肽化合物 TVEMP-痛敏肽的 9 到 10 倍。

[0463]

表 27. 用 GalR1 或 GalR2 受体转染的 SiMa、Neuro-2a 和 PC12 的稳定转染但非无性系的细胞群的测试					
		TVEMP-甘丙肽 C	TVEMP-甘丙肽 D	LH _N /A	TVEMP-痛敏肽
浓度(mg/mL)		1.260	0.303	1.46	1.00
EC ₅₀ 值 (nM)	SiMa GalR1		36.2 ± 8.6	>300	
	SiMa GalR2		26.6 ± 6.7	>300	
	PC-12 GalR1		64.1 ± 19.5	202.7	
	PC-12 GalR2		>150	>300	

[0464]

	Neuro-2a GalR1	32.2 ± 3.3	40.8 ± 6.0	>300	>300
	Neuro-2a GalR2	35.2 ± 3.1	46.0 ± 6.1	>300	>300

[0465] 根据常规,所选非无性系细胞群不是适合使用的良好细胞群,因为这些细胞群含有受体表达不同水平的细胞的混合物,而且其可随时间发生变化。为获得来源于单细胞的稳定细胞系,启用稀释克隆法。第 21 天,用胰蛋白酶处理转染的细胞,用针将其分开,并计数。剩余的转染的细胞系冷冻起来待用。在含有遗传霉素 (0.5mg/ml, 1 : 100 稀释) 的生长培养基中将细胞连续稀释到 10 个细胞 / 孔。按 100 μ l / 孔将细胞接种到 2 个涂有胶原蛋白 IV 的 96 孔板 (SiMa、PC-12) 或 2 个 96 孔 Costar 板 (Neuro-2a) 中,以达到 1 个细胞 / 孔的密度。将板放回培养箱,并非接触孵育 2 周,以形成集落。2 周后 (第 35 天),小心地检查孔中形成于孔底部的单个集落的存在 (对于多个集落,小心检查整个孔)。当鉴别出某一孔中具有单一细胞团时,小心地细查整个孔,以确保有且仅有一个细胞团存在。拍摄该细胞团的照片。如果怀疑还存在细胞团,就不选择这个孔。第 36 天,用 TrypLE 将所选克隆脱离,并加入 0.5mL 含有遗传霉素 (0.5mg/ml, 1 : 100 稀释) 的完全培养基,以停止胰蛋白酶反应。将其整个体积转移到 6 孔板中,并用 3.0ml 含有遗传霉素 (0.5mg/ml, 1 : 100 稀释) 的完全培养基进一步稀释。使克隆生长到 90% 汇合,然后再用胰蛋白酶处理,并转移到装有 10.0ml 含遗传霉素 (0.5mg/ml, 1 : 100 稀释) 的完全培养基的 75cm 涂有胶原蛋白 IV 的烧瓶或 Costar 烧瓶中。一旦细胞再次达到 90% 汇合,就使用这些细胞填装 3 个冷冻小瓶进行冷冻储存,或用于 ELISA 测定中进行甘丙肽重靶向化合物的筛选。

[0466] 使用参照化合物 TVEMP- 甘丙肽批料 C 来测试这些克隆,由两个操作人员进行独立测试。SiMa GalR1 克隆生长缓慢,且此时不能用于测试。幸运的是,Neuro-2a 克隆生长较快,并且很快 12 个克隆中就有 8 个达到足够量用于测试。用全剂量范围的 TVEMP- 甘丙肽化合物 (0-300nM) 测试这些 Neuro-2a GalR1 无性系细胞,且这些克隆中的 9 个克隆的结果显示于下文中。剩余 4 个克隆生长很慢,并未进行测试。所选非无性系亲本细胞连同这些克隆一起接种,以用作基准。表 28 显示了当用 TVEMP- 甘丙肽化合物测试时,8 个克隆中每一者以及所选非无性系 Neuro-2aGalR1 细胞的活性。在所测试的 8 个克隆中,只有克隆 #4、克隆 #7 和克隆 #12 显示对 TVEMP- 甘丙肽化合物的良好摄取,其中具有可接受的 EC_{50} 值。Neuro-2a GalR1 克隆 #1、克隆 #3 和克隆 #10 不吸收 TVEMP- 甘丙肽化合物,而克隆 #5、克隆 #11 和克隆 #13 以及非克隆细胞群产生极高 EC_{50} 值,并且没有使用这些细胞进行进一步测试。

[0467]

表 28. 用 TVEMP-甘丙肽批料 C 筛选 Neuro-2a GalR1 单细胞源性克隆的结果.

板	细胞类型	EC50 ±标准误差(nM)	
		操作人员 1	操作人员 2
1	N2A 非克隆	82.1±9.6	92.0±10.8
1	N2A GALR1 克隆#1	>300	>300
1	N2A GALR1 克隆#3	>300	>300
1	N2A GALR1 克隆#4	39.7±3.4	39.4±6.6
2	N2A 非克隆	211.2±167.7	116.0±26.8
2	N2A GALR1 克隆#5	202.6±82.9	113.0±18.1
2	N2A GALR1 克隆#7	23.1±3.3	15.5±1.8
2	N2A GALR1 克隆#10	>300	>300
3	N2A GALR1 克隆#7	20.3 ± 1.6	38.0±6.3
3	N2A GALR1 克隆#11	270.0±243	247.0±101
3	N2A GALR1 克隆#12	43.2±5.2	57.5±14.3

[0468]

3	N2A GALR1 克隆#13	144.1±143	184.7±15.6
---	-----------------	-----------	------------

[0469] 4. 无性细胞系中 GalR1 表达情况的表征

[0470] 针对克隆的筛选显示, 只有克隆 #4、克隆 #7 和克隆 #12 的敏感性高于非无性系细胞。从这 3 个克隆以及未转染的亲本 Neuro-2a 细胞和稳定转染的非无性系 Neuro-2a 细胞中提取出信使 RNA (mRNA), 通过 RT-PCR, 使用实施例 V 中所述的 RT-PCR 条件和表 29 中所述的引物进行表征。

[0471]

表 29. 特异性 GALR1 引物和 GALR2 引物

名称	序列	SEQ ID NO:
GALR1 正向引物	5' 'CCCCATCATGTCATCCACCT 3'	150
GALR1 反向引物	5' ATGGGGTTCACCGAGGAGTT 3'	151
GALR2 正向引物	5' CATCGTGGCGGTGCTTTT 3'	152
GALR2 反向引物	5' AGCGGGAAGCGACCAAAC 3'	153

[0472] 表 30 中的结果显示,经过转染的非无性系细胞和无性系 GALR1mRNA 量远高于亲本细胞。在 TVEMP- 甘丙肽细胞筛选中,克隆 #7 对 TVEMP- 甘丙肽显示出最高敏感性。根据表 30,还显示克隆 #7 具有最高的 GALR1mRNA 量。Neuro-2a GalR1 克隆 7 (Neuro-2a#7) 的 CT 值最低,其次是克隆 4,接着是为克隆 12。此时,所测试的非克隆细胞提供的 CT 值与克隆 12 很接近,但这些细胞含有一直变化的含有不同浓度的 GalR1 受体的细胞群,并因此不被认为是适于进一步研究的细胞群。在 3 个 EC_{50} 较低的克隆中,Neuro-2a 克隆 GalR1 克隆 #12 (Neuro-2a#12) 生长最快,其次是 Neuro-2a 克隆 #7,最后是 Neuro-2a 克隆 #4。除了其生长速率较慢外,Neuro-2a 克隆 #4 还因 Neuro-2a 克隆 #4 的敏感性远不如克隆 #7 而未进行测试。

[0473]

表 30. 经过转染的 Neuro-2a 无性系细胞与经过转染的非无性系细胞和亲本细胞中 GALR1 mRNA 的较大差异.

细胞系	亲本	非克隆	克隆 4	克隆 7	克隆 12
平均 CT 值	32.0	21.7	20.8	19.3	21.6
mRNA 改变倍数	1.0	1269.5	2418.7	6793.8	1332.6

[0474] 5. 利用 TVEMP- 甘丙肽化合物进行的 Neuro-2a 克隆 #7 与克隆 #12 的敏感性和特异性的比较

[0475] 同时测试两个克隆,以尝试鉴别出二者中敏感性和选择性最强的一个,由此,可以肯定地从表现最好的克隆收集数据。表 31 显示了当用 TVEMP- 甘丙肽批料 C 和 LH_{α}/A 处理时,这两个克隆各自的敏感性和选择性的结果。两个克隆都展现高信噪比。Neuro-2a 克隆 #7 的 EC_{50} 值为 5.5nM,而 Neuro-2a 克隆 #12 的 EC_{50} 值为 68.4nM。Neuro-2a 克隆 #12 须用

0nM 到 300nM 的剂量范围测试,而 Neuro-2a 克隆 #7 可用 0nM 到 30nM 的剂量范围测试,以在所用最高浓度下引起稳定状态。两个克隆都显示出 LH_N/A 与 TVEMP- 甘丙肽批料 C 间的明显差异,Neuro-2a 克隆 #12 在高浓度下显示某种程度的非特异性摄取,而 Neuro-2a 克隆 #7 则不然。从表中的结果可以看出,用 Neuro-2a#7 细胞测试的范围比 Neuro-2a #12 细胞的测试范围低 10 倍,致使 Neuro-2a #7 所用化合物的量比 Neuro-2a #12 的低 10 倍。当 LH_N/A 用作比较时,Neuro-2a #7 的选择性是 Neuro-2a 克隆 #12 的 8 倍。两个克隆的信噪比都超过 100,但比率为 10 就足以进行基于细胞的效力测定。Neuro-2a#7 克隆 EC_{50} 值为 5.5nM,比 Neuro-2a#12 的低约 12 倍,Neuro-2a#12 的 EC_{50} 值为 68.4nM。较低的测试剂量范围、对于 LH_N/A 为 24 倍的选择性、高信噪比、产生低 EC_{50} 值的优良敏感性和每个测试所需的低蛋白质量都表明 Neuro-2a 克隆 #7 将是进行基于细胞的效力测定用于确定针对 TVEMP- 甘丙肽化合物的效力比的克隆。

[0476]

表 31. Neuro-2a 克隆#7 与克隆#12 的特征的比较.

	Neuro-2a #7	Neuro-2a #12
范围	0-30 nM	0-300 nM
选择性	24 倍	3 倍
信噪比	190	547
最大 LH_N/A 信号高于最大 TVEMP-Gal 信号的百分比	4.3%	37.6%
EC_{50}	5.5 nM	68.4 nM
所需蛋白质	约 1 μ g	约 10 μ g
在 CM 中用 TVEMP-甘丙肽批料 C 和 LH_N/A 处理 Neuro-2a # 7 和#12 达 16 小时。使用 ECL-ELISA 检测活性。		

[0477] 实施例 XVI

[0478] 用于摄取强啡肽 A 重靶向内肽酶的过表达 KOR-1 受体的无性细胞系的产生

[0479] 以下实施例说明如何表征和比较由被靶受体转染确立细胞系且随后进行细胞系克隆得到的数个无性细胞系。该具体实施例将提到最先在实施例 III 表 9 中描述的被 hKOR-1 转染的无性细胞系的鉴别和表征。

[0480] 选出 4 个 AGN P33-KOR 克隆 (实施例 III 表 9 中的克隆编号 8、9、10 和 12), 并利用 Dyn/A 通过 0nM 到 150nM 的全剂量响应加以测试。同时,选出 2 个 SiMa-KOR 克隆 (实施例 III 表 9 中的克隆编号 12 和 16), 并利用 Dyn/A 通过 0nM 到 150nM 的全剂量响应加以测

试。在本实验中, AGN P33-KOR 克隆 8、克隆 9 和克隆 12 产生极低摄取, 并因此被丢弃; AGN P33-KOR 克隆 10 呈现良好摄取, 且其 EC_{50} 值为 30.3 nM。所测试的两个 SiMa-KOR 克隆呈现良好摄取, 并且克隆 16 的 EC_{50} 值为 26.6 nM, 且克隆 12 的 EC_{50} 值为 11.8 nM。然后通过将靶 Dyn/A 化合物与缺乏靶配体的阴性对照 LHN/A 和 Noc/A 对照物的摄取相比较, 来测试这三个克隆的敏感性和选择性。利用 0 nM 到 150 nM 的全剂量响应进行的三个克隆以及亲本 SiMa 细胞的比较概括于表 32 中。

[0481]

表 32.			
细胞系	EC_{50} Dyn/A (nM)	EC_{50} LHN/A (nM)	EC_{50} Noc/A (nM)
SiMa 亲本	> 100	> 100	5.4
AGN P33-KOR 克隆 10	9.7	> 150	9.4
SiMa-KOR 克隆 16	10.6	> 100	1.6
SiMa-KOR 克隆 12	4.65	>150	19.7

[0482] 用 Dyn/A 处理的经过 KOR-1 转染的克隆的 Dyn/A 摄取明显增加, 而亲本 SiMa 细胞显示出化合物的极低摄取 (摄取量类似于阴性对照 LHN/A)。包括亲本 SiMa 细胞在内的所有细胞系中都存在一定量 Noc/A。这也在意料之中, 因为在针对该重靶向化合物的测定研究期间, 观察到 SiMa 细胞摄取 Noc/A。此外, Noc/A 摄取在特别针对该重靶向内肽酶衍生得到的 AGN P33 细胞系中最高。在无性 SiMa-KOR 克隆 12 (SK12) 细胞中存在明显的 Noc/A 摄取与 Dyn/A 化合物的摄取差异。在所有图表中, 阴性对照 LHN/A 的活性最小, 表明在不存在结合域的情况下, 这些细胞系中不会发生特异性摄取, 且 SK12 细胞中摄取最少, 表明 Dyn/A 化合物的摄取具有高度特异性。从这些结果可知, 应选择 SK12 克隆用于后续优化和表征。

[0483] 利用 SK12 细胞进行优化研究, 以便开发出一种具有特异性和敏感性的稳定测定。需测定的数个参数包括接种培养基和接种密度、处理培养基和处理时间。优化期间获得的数据的总结提供于表 33 中。

[0484]

表 33.

所用培养基			细胞数/孔				
接种	处理	处理时间	25000	50000	75000	100000	150000
完全培养基	完全培养基	6 小时+ 过夜	51.3	76	13.4	9.2	n/a
完全培养基	完全培养基	16 小时	21.3	19.0	4.96	4.64	n/a
完全培养基	完全培养基	16 小时	n/a	n/a	n/a	2.1	15.3

[0485]

无血清培养基	无血清培养基	16 小时	n/a	n/a	n/a	9.0	12.1
完全培养基	无血清培养基	16 小时	n/a	10.3	5.4	8.97	8.38
完全培养基	完全培养基	16 小时	n/a	7.7	4.86	13.72	11.26
无血清培养基	无血清培养基	16 小时	n/a	11.2	8.5	8.4	9.2

[0486] 表 B 显示,按 100,000 个细胞 / 孔接种于 CM 中并用 CM 中的化合物处理过的细胞在各实验中的 EC_{50} 值变化较大 (4.6nM、1.2nM 和 13.72nM),而按 100,000 个细胞 / 孔接种

于 SFM 中并用 SFM 中稀释的化合物处理过的细胞提供优良的曲线和一致的 EC_{50} 值 (9.0nM 和 8.4nM)。今后,细胞也将按 100,000 个细胞 / 孔接种于 SFM 中,并用 SFM 中的化合物处理。

[0487] 将 SK12 按 100,000 个细胞 / 孔接种于 PDL 板上的 SFM 中,持续 24 小时,随后在 SFM 中处理 16 小时,得到最低 EC_{50} 值 8.4 $\pm$ 1.1nM,且信噪比为 12。这两个值是今后在 CBPA 中使用此细胞可接受的。

[0488] 利用饱和结合测定表征 SK12 细胞

[0489] 此处利用的饱和结合分析详细描述于实施例 V 中。使用 KOR-1 拮抗剂 3H -二丙诺啡 (diprenorphine) 进行饱和结合研究,以评估结合。在几个实验中测量总结合、特异性结合和非特异性结合。由两次独立实验生成 3H -二丙诺啡与受体的饱和结合曲线。可以看出,约 25% 结合是非特异性结合,且 75% 是分子与受体的特异性结合。分子对受体的亲和力是适宜的,为 6.5nM。Bmax 表明在 SK12 细胞上,每个细胞具有 23fmol KOR-1 受体。

[0490] 除非另外指明,否则说明书和权利要求书中使用的表示成分、特性(如分子量)、反应条件等的量的所有数字都应理解为在所有情况下用术语“约”修饰。因此,除非有相反的说明,否则本说明书和所附权利要求书中陈述的数字参数都是近似值,都可视本发明设法获得的所需特性而变化。在最低限度上,且打算将等效原则的应用局限于权利要求书的范围,各数字参数应至少依据所报告的有效数字的数目并应用一般舍入技术来解释。尽管提出本发明的较宽范围的数字范围和参数是近似值,但在具体实施例中尽可能精确地报告所列的数值。然而,任何数值固有地含有由其各自的测试测量值中所见的标准偏差必然引起的某些误差。

[0491] 除非本文中另外指明或上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中(尤其是以上权利要求书的上下文中)使用的术语“一个(种)”、“所述”和指代词语应解释为涵盖单数和复数。本文中值的范围的列举仅旨在用作单独提及该范围内的各单独值的简写方法。除非本文中另外指明,否则各单独值都并入本说明书中,如同在本文中对其单独列举一样。除非本文中另外指明或上下文明显矛盾,否则描述的所有方法可按任何适合的次序进行。对本文中提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如,“如”)的使用都仅旨在更好阐述本发明,而不是对本发明或权利要求的范围构成限制。本说明书中所用的任何语言都不应解释为指示对实施本发明所必需的任何非权利要求的要素。

[0492] 本文中公开的替代性要素或实施方案的分组不应解释为限制。各个组成员都可单独地或与该组其它组成员或者本文中所见的其它要素的任何组合被提及和请求保护。出于便利和/或可专利性的原因,预期一个或多个成员可包含在一组中或从改组中删除。当任何此类包含或删除发生时,说明书在此被看作为含有经修改的组,从而满足所附权利要求书中所用的所有马库什组 (Markush group) 的书面陈述。

[0493] 本文描述了本发明的某些实施方案,包括为本发明人所知用于实施本发明的最佳方式。当然,在阅读了上述描述后,这些所述实施方案的变化对本领域的技术人员将显而易见。本发明人预期本领域的熟练技术人员会适时采用此类变化,而且本发明人预期能以除了本文具体描述的方式之外的方式来实现。因此,在适用法律允许的情况下,本发明包括对本文所附权利要求书中陈述的主题进行的所有修改和等同物。此外,除非本文另外指明或上下文明显矛盾,否则其所有可能变化的任何上述要素组合都涵盖在本发明内。

[0494] 本文公开的具体实施方案可进一步限制于使用“由... 组成”或“基本上由... 组成”的权利要求中。当在权利要求中使用(无论每次修改进行提交或增加),连接词“由... 组成”不包括权利要求中未具体说明的任何要素、步骤或成分。连接词“基本上由... 组成”将权利要求的范围局限于具体说明的材料或步骤,以及实质上不会影响基本特征和新颖特征的材料或步骤。本文中固有地或明确地描述了如此要求的本发明的实施方案并使它们可以实施。

[0495] 此外,整个本说明书对专利和印刷的出版物做了很多引用。上文引用的各参考文献和印刷的出版物的全部内容都单独以引用的方式并入本文。

[0496] 最后,应了解,本文公开的本发明的实施方案是对本发明原理的说明。其它可采用的修改在本发明的范围内。因此,例如(但不限于),根据本文中的教导,可以利用本发明的替代性配置。因此,本发明不限于明确所示和描述的内容。

[0001]

序列表

<110> 阿勒根公司

<120> 基于免疫的重靶向内肽酶活性测定

<130> 18496 (BOT)

<150> US 61/160,217

<151> 2009-03-13

<160> 153

<170> FastSEQ 4.0 版 (Windows系统)

<210> 1

<211> 903

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重靶向内肽酶

<400> 1

```

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

```

[0002]

370	375	380
Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu		
385	390	395
Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe		400
	405	410
Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu		415
	420	425
Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Asp Asp Asp Asp		430
	435	440
Lys Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys Arg Lys		445
	450	455
Asn Gln Ala Leu Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		460
465	470	475
Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp		480
	485	490
Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn		495
	500	505
Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu		510
	515	520
Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe		525
530	535	540
Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile		545
545	550	555
Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly		560
	565	570
Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala		575
	580	585
Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val		590
	595	600
Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser		605
610	615	620
Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu		625
625	630	635
Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu		640
	645	650
Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr		655
	660	665
Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe		670
	675	680
Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile		685
690	695	700
Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr		705
705	710	715
Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser		720
	725	730
Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn		735
	740	745
Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met		750
	755	760
Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn		765
	770	775
Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe		780
785	790	795
Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala		800
	805	810
Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu		815
	820	825
Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp		830
	835	840
Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly		845
850	855	860
Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr		865
865	870	875
Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln		880
	885	890
Arg Leu Leu Ser Thr Leu Asp		895
	900	

<210> 2
<211> 908

[0003]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重靶向内肽酶

<400> 2

```

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

```

[0004]

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

<210> 3

<211> 906

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重靶向内肽酶

<400> 3

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

[0005]

Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Glu	Lys	Asp	Asn	Tyr	Leu	Lys	Gly
				85					90					95	
Val	Thr	Lys	Leu	Phe	Glu	Arg	Ile	Tyr	Ser	Thr	Asp	Leu	Gly	Arg	Met
			100					105					110		
Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Val	Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Trp	Gly	Gly	Ser	Thr
		115					120					125			
Ile	Asp	Thr	Glu	Leu	Lys	Val	Ile	Asp	Thr	Asn	Cys	Ile	Asn	Val	Ile
	130					135					140				
Gln	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr	Arg	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Val	Ile	Ile
	145				150					155					160
Gly	Pro	Ser	Ala	Asp	Ile	Ile	Gln	Phe	Glu	Cys	Lys	Ser	Phe	Gly	His
			165						170					175	
Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Thr	Arg	Asn	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Tyr	Ile
			180					185					190		
Arg	Phe	Ser	Pro	Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Phe	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Val
	195						200					205			
Asp	Thr	Asn	Pro	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Lys	Phe	Ala	Thr	Asp	Pro	Ala
	210					215					220				
Val	Thr	Leu	Ala	His	Glu	Leu	Ile	His	Ala	Gly	His	Arg	Leu	Tyr	Gly
	225				230					235					240
Ile	Ala	Ile	Asn	Pro	Asn	Arg	Val	Phe	Lys	Val	Asn	Thr	Asn	Ala	Tyr
			245					250					255		
Tyr	Glu	Met	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Ser	Phe	Glu	Glu	Leu	Arg	Thr	Phe
		260						265					270		
Gly	Gly	His	Asp	Ala	Lys	Phe	Ile	Asp	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn	Glu	Phe
		275					280					285			
Arg	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Lys	Phe	Lys	Asp	Ile	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn
	290				295					300					
Lys	Ala	Lys	Ser	Ile	Val	Gly	Thr	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Tyr	Met	Lys
	305				310					315					320
Asn	Val	Phe	Lys	Glu	Lys	Tyr	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Gly	Lys
			325						330				335		
Phe	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Lys	Met	Leu	Thr
			340					345					350		
Glu	Ile	Tyr	Thr	Glu	Asp	Asn	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Lys	Val	Leu	Asn
		355					360					365			
Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Lys	Ile	Asn	Ile
	370					375					380				
Val	Pro	Lys	Val	Asn	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn
	385				390					395					400
Thr	Asn	Leu	Ala	Ala	Asn	Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn
			405					410					415		
Met	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu	Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Tyr
		420						425					430		
Lys	Leu	Leu	Cys	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu
		435					440					445			
Ile	Glu	Gly	Arg	Asn	Lys	Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Ile	Lys	Val	Asn
	450					455					460				
Asn	Trp	Asp	Leu	Phe	Phe	Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Asn	Asp
	465				470				475						480
Leu	Asn	Lys	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala
			485					490					495		
Glu	Glu	Asn	Ile	Ser	Leu	Asp	Leu	Ile	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Phe
		500						505					510		
Asn	Phe	Asp	Asn	Glu	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser
	515						520					525			
Asp	Ile	Ile	Gly	Gln	Leu	Glu	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Pro
	530					535					540				
Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	Leu
	545				550					555					560
Arg	Ala	Gln	Glu	Phe	Glu	His	Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn
			565						570					575	
Ser	Val	Asn	Glu	Ala	Leu	Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe
		580						585					590		
Ser	Ser	Asp	Tyr	Val	Lys	Lys	Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Met
	595						600					605			
Phe	Leu	Gly	Trp	Val	Glu	Gln	Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Thr
	610					615					620				
Ser	Glu	Val	Ser	Thr	Thr	Asp	Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Ile	Ile
	625				630					635					640
Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	Asn	Ile	Gly	Asn	Met	Leu	Tyr	Lys	Asp

[0006]

```

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

```

<210> 4

<211> 919

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重靶向内肽酶

<400> 4

```

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

```

[0007]

210	215	220
Leu Ile His Ala Gly	His Arg Leu Tyr Gly	Ile Ala Ile Asn Pro Asn
225	230	235
Arg Val Phe Lys Val	Asn Thr Asn Ala Tyr	Tyr Glu Met Ser Gly Leu
245	250	255
Glu Val Ser Phe Glu	Glu Leu Arg Thr Phe	Gly Gly His Asp Ala Lys
260	265	270
Phe Ile Asp Ser Leu	Gln Glu Asn Glu Phe	Arg Leu Tyr Tyr Asn
275	280	285
Lys Phe Lys Asp Ile	Ala Ser Thr Leu Asn	Lys Ala Lys Ser Ile Val
290	295	300
Gly Thr Thr Ala Ser	Leu Gln Tyr Met Lys	Asn Val Phe Lys Glu Lys
305	310	315
Tyr Leu Leu Ser Glu	Asp Thr Ser Gly Lys	Phe Ser Val Asp Lys Leu
325	330	335
Lys Phe Asp Lys Leu	Tyr Lys Met Leu Thr	Glu Ile Tyr Thr Glu Asp
340	345	350
Asn Phe Val Lys Phe	Phe Lys Val Leu Asn	Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
355	360	365
Phe Asp Lys Ala Val	Phe Lys Ile Asn Ile	Val Pro Lys Val Asn Tyr
370	375	380
Thr Ile Tyr Asp Gly	Phe Asn Leu Arg Asn	Thr Asn Leu Ala Ala Asn
385	390	395
Phe Asn Gly Gln Asn	Thr Glu Ile Asn Asn	Met Asn Phe Thr Lys Leu
405	410	415
Lys Asn Phe Thr Gly	Leu Phe Glu Phe Tyr	Lys Leu Leu Cys Val Asp
420	425	430
Gly Ile Ile Thr Ser	Lys Thr Lys Ser Asp	Asp Asp Lys Tyr Gly
435	440	445
Gly Phe Met Thr Ser	Glu Lys Ser Gln Thr	Pro Leu Val Thr Leu Phe
450	455	460
Lys Asn Ala Ile Ile	Lys Asn Ala Tyr Lys	Lys Gly Glu Ala Leu Ala
465	470	475
Gly Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Gly Ser Ala
485	490	495
Leu Val Leu Gln Cys	Ile Lys Val Asn Asn	Trp Asp Leu Phe Phe Ser
500	505	510
Pro Ser Glu Asp Asn	Phe Thr Asn Asp Leu	Asn Lys Gly Glu Glu Ile
515	520	525
Thr Ser Asp Thr Asn	Ile Glu Ala Ala Glu	Glu Asn Ile Ser Leu Asp
530	535	540
Leu Ile Gln Gln Tyr	Tyr Leu Thr Phe Asn	Phe Asp Asn Glu Pro Glu
545	550	555
Asn Ile Ser Ile Glu	Asn Leu Ser Ser Asp	Ile Ile Gly Gln Leu Glu
565	570	575
Leu Met Pro Asn Ile	Glu Arg Phe Pro Asn	Gly Lys Lys Tyr Glu Leu
580	585	590
Asp Lys Tyr Thr Met	Phe His Tyr Leu Arg	Ala Gln Glu Phe Glu His
595	600	605
Gly Lys Ser Arg Ile	Ala Leu Thr Asn Ser	Val Asn Glu Ala Leu Leu
610	615	620
Asn Pro Ser Arg Val	Tyr Thr Phe Phe Ser	Ser Asp Tyr Val Lys Lys
625	630	635
Val Asn Lys Ala Thr	Glu Ala Ala Met Phe	Leu Gly Trp Val Glu Gln
645	650	655
Leu Val Tyr Asp Phe	Thr Asp Glu Thr Ser	Glu Val Ser Thr Thr Asp
660	665	670
Lys Ile Ala Asp Ile	Thr Ile Ile Ile Pro	Tyr Ile Gly Pro Ala Leu
675	680	685
Asn Ile Gly Asn Met	Leu Tyr Lys Asp Asp	Phe Val Gly Ala Leu Ile
690	695	700
Phe Ser Gly Ala Val	Ile Leu Leu Glu Phe	Ile Pro Glu Ile Ala Ile
705	710	715
Pro Val Leu Gly Thr	Phe Ala Leu Val Ser	Tyr Ile Ala Asn Lys Val
725	730	735
Leu Thr Val Gln Thr	Ile Asp Asn Ala Leu	Ser Lys Arg Asn Glu Lys
740	745	750
Trp Asp Glu Val Tyr	Lys Tyr Ile Val Thr	Asn Trp Leu Ala Lys Val
755	760	765
Asn Thr Gln Ile Asp	Leu Ile Arg Lys Lys	Met Lys Glu Ala Leu Glu
770	775	780

[0008]

```

Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln
785          790          795          800
Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu
          805          810          815
Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn
          820          825          830
Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile
          835          840          845
Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp
          850          855          860
Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln
          865          870          875          880
Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile
          885          890          895
Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr
          900          905          910
Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
          915

```

<210> 5
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> 智人

```

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

```

<210> 6
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 6
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1          5          10          15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
          20          25          30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
          35          40          45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
          50          55          60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
          65          70          75          80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys

```

[0009]

```

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

```

<210> 7
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> 猕猴

```

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

```

<210> 8
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠

```

<400> 8
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
  1      5      10      15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
      20      25      30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
      35      40      45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
      50      55      60
Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
      65      70      75      80
Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
      85      90      95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
      100      105      110

```

[0010]


```

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

```

<210> 9
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠

```

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

```

<210> 10
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

```

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

```

[0011]

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

<210> 11
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> 原鸡

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

<210> 12
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> 鲫鱼

<400> 12
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Ser Asp Met Gln Gln
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn Leu Asn Asp
65 70 75 80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys Asn Lys Met Lys
85 90 95
Ser Gly Gly Ser Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala
100 105 110
Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser
115 120 125
Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met
130 135 140
Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu Arg His
145 150 155 160

[0012]

Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile
 165 170 175
 Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu
 180 185 190
 Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
 195 200

<210> 13
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> 鲫鱼

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

<210> 14
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼

<400> 14
 Met Ala Glu Asp Ser Asp Met Arg Asn Glu Leu Ala Asp Met Gln Gln
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20 25 30
 Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
 35 40 45
 Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
 50 55 60
 Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn Leu Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys Asn Lys Met Lys
 85 90 95
 Ser Gly Ala Ser Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala
 100 105 110
 Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser
 115 120 125
 Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met
 130 135 140
 Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu Arg His
 145 150 155 160
 Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile
 165 170 175
 Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu

[0013]

Ala	Asn	Gln	Arg	Ala	Thr	Lys	Met	Leu	Gly	Ser	Gly
		180					185				190
		195					200				

<210> 15
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼

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

<210> 16
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> 石纹电鳐

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

[0014]

Met Leu
210

<210> 17
<211> 206
<212> PRT
<213> 非洲爪蛙

<400> 17
Met Ala Asp Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Tyr Val Glu Gly Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
65 70 75 80
Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
85 90 95
Ser Ser Gly Ala Tyr Asn Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
100 105 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
115 120 125
Ile Ser Gly Gly Phe Val Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Thr
130 135 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145 150 155 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
165 170 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Ala Arg Ile
180 185 190
Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200 205

<210> 18
<211> 206
<212> PRT
<213> 非洲爪蛙

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

[0015]

<210> 19
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> 紫海胆

<400> 19
 Met Glu Asp Gln Asn Asp Met Asn Met Arg Ser Glu Leu Glu Glu Ile
 1 5 10 15
 Gln Met Gln Ser Asn Met Gln Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg
 20 25 30
 Arg Met Leu Gln Met Ala Glu Glu Ser Gln Asp Met Gly Ile Lys Thr
 35 40 45
 Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu Glu
 50 55 60
 Gly Met Asp Gln Ile Asn Thr Asp Met Arg Glu Ala Glu Lys Asn Leu
 65 70 75 80
 Thr Gly Leu Glu Lys Cys Cys Gly Ile Cys Val Cys Pro Trp Lys Lys
 85 90 95
 Leu Gly Asn Phe Glu Lys Gly Asp Asp Tyr Lys Lys Thr Trp Lys Gly
 100 105 110
 Asn Asp Asp Gly Lys Val Asn Ser His Gln Pro Met Arg Met Glu Asp
 115 120 125
 Asp Arg Asp Gly Cys Gly Gly Asn Ala Ser Met Ile Thr Arg Ile Thr
 130 135 140
 Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met Asp Glu Asn Leu Thr Gln Val Ser
 145 150 155 160
 Ser Ile Val Gly Asn Leu Arg His Met Ala Ile Asp Met Gln Ser Glu
 165 170 175
 Ile Gly Ala Gln Asn Ser Gln Val Gly Arg Ile Thr Ser Lys Ala Glu
 180 185 190
 Ser Asn Glu Gly Arg Ile Asn Ser Ala Asp Lys Arg Ala Lys Asn Ile
 195 200 205
 Leu Arg Asn Lys
 210

<210> 20
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> 黑腹果蝇

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

[0016]

<210> 21
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> 药用水蛭

<400> 21
 Met Ala Lys Asp Ile Lys Pro Lys Pro Ala Asn Gly Arg Asp Ser Pro
 1 5 10 15
 Thr Asp Leu Gln Glu Ile Gln Leu Gln Met Asn Ala Ile Thr Asp Asp
 20 25 30
 Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ala Met Cys Glu Glu Ser Lys
 35 40 45
 Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln
 50 55 60
 Leu Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Gln Asp Met Arg
 65 70 75 80
 Asp Ala Glu Lys Asn Leu Glu Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys
 85 90 95
 Ile Leu Pro Trp Lys Arg Thr Lys Asn Phe Asp Lys Gly Ala Glu Trp
 100 105 110
 Asn Lys Gly Asp Glu Gly Lys Val Asn Thr Asp Gly Pro Arg Leu Val
 115 120 125
 Val Gly Asp Gly Asn Met Gly Pro Ser Gly Gly Phe Ile Thr Lys Ile
 130 135 140
 Thr Asn Asp Ala Arg Glu Glu Glu Met Glu Gln Asn Met Gly Glu Val
 145 150 155 160
 Ser Asn Met Ile Ser Asn Leu Arg Asn Met Ala Val Asp Met Gly Ser
 165 170 175
 Glu Ile Asp Ser Gln Asn Arg Gln Val Asp Arg Ile Asn Asn Lys Met
 180 185 190
 Thr Ser Asn Gln Leu Arg Ile Ser Asp Ala Asn Lys Arg Ala Ser Lys
 195 200 205
 Leu Leu Lys Glu
 210

<210> 22
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> 皮氏枪乌贼

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

[0017]

210

<210> 23
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 静水椎实螺

<400> 23
 Met Thr Thr Asn Gly Glu Ile Leu Pro Val Gly Glu Glu Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Gly Glu Asp Ala Leu Leu Arg Lys Gln Ile Asp Cys Asn Thr
 20 25 30
 Asn Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ser Leu Cys Glu Glu
 35 40 45
 Ser Lys Glu Ala Gly Ile Lys Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly
 50 55 60
 Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Gly Gln Ile Asn Gln Asp
 65 70 75 80
 Met Arg Asp Ala Glu Lys Asn Leu Glu Gly Leu Glu Lys Cys Cys Gly
 85 90 95
 Leu Cys Val Leu Pro Trp Lys Arg Ser Lys Asn Phe Glu Lys Gly Ser
 100 105 110
 Asp Tyr Asn Lys Thr Trp Lys Ala Ser Glu Asp Gly Lys Ile Asn Thr
 115 120 125
 Asn Gly Pro Arg Leu Val Val Asp Gln Gly Asn Gly Ser Gly Pro Thr
 130 135 140
 Gly Gly Tyr Ile Thr Arg Ile Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met
 145 150 155 160
 Glu Gln Asn Ile Gly Glu Val Ala Gly Met Val Ser Asn Leu Arg Asn
 165 170 175
 Met Ala Val Asp Met Gly Asn Glu Ile Glu Ser Gln Asn Lys Gln Leu
 180 185 190
 Asp Arg Ile Asn Gln Lys Gly Gly Ser Leu Asn Val Arg Val Asp Glu
 195 200 205
 Ala Asn Lys Arg Ala Asn Arg Ile Leu Arg Lys Gln
 210 215 220

<210> 24
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> 秀丽隐杆线虫

<400> 24
 Met Ser Gly Asp Asp Ile Pro Glu Gly Leu Glu Ala Ile Asn Leu
 1 5 10 15
 Lys Met Asn Ala Thr Thr Asp Asp Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20 25 30
 Leu Ala Leu Cys Glu Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ile Lys Thr Leu Val
 35 40 45
 Met Leu Asp Asp Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Cys Glu Gly Ala Leu
 50 55 60
 Asp Thr Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Asp His Leu Lys Gly
 65 70 75 80
 Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys Val Leu Pro Trp Asn Lys Thr Asp
 85 90 95
 Asp Phe Glu Lys Thr Glu Phe Ala Lys Ala Trp Lys Lys Asp Asp Asp
 100 105 110
 Gly Gly Val Ile Ser Asp Gln Pro Arg Ile Thr Val Gly Asp Ser Ser
 115 120 125
 Met Gly Pro Gln Gly Gly Tyr Ile Thr Lys Ile Thr Asn Asp Ala Arg
 130 135 140
 Glu Asp Glu Met Asp Glu Asn Val Gln Gln Val Ser Thr Met Val Gly
 145 150 155 160
 Asn Leu Arg Asn Met Ala Ile Asp Met Ser Thr Glu Val Ser Asn Gln
 165 170 175
 Asn Arg Gln Leu Asp Arg Ile His Asp Lys Ala Gln Ser Asn Glu Val
 180 185 190
 Arg Val Glu Ser Ala Asn Lys Arg Ala Lys Asn Leu Ile Thr Lys
 195 200 205

[0018]

<210> 25
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> 智人

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

<210> 26
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 26
 Met Glu Pro Leu Phe Pro Ala Pro Phe Trp Glu Val Ile Tyr Gly Ser
 1 5 10 15
 His Leu Gln Gly Asn Leu Ser Leu Leu Ser Pro Asn His Ser Leu Leu
 20 25 30
 Pro Pro His Leu Leu Leu Asn Ala Ser His Gly Ala Phe Leu Pro Leu
 35 40 45
 Gly Leu Lys Val Thr Ile Val Gly Leu Tyr Leu Ala Val Cys Val Gly

[0019]

```

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

```

<210> 27
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 27

```

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

```

[0020]

```

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

```

<210> 28
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> 智人

```

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

```

[0021]

```

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

```

<210> 29
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 29
Met Asp Ser Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Glu Pro Gly Pro Thr Cys
1          5          10          15
Ala Pro Ser Ala Cys Leu Pro Pro Asn Ser Ser Ala Trp Phe Pro Gly
20          25          30
Trp Ala Glu Pro Asp Ser Asn Gly Ser Ala Gly Ser Glu Asp Ala Gln
35          40          45
Leu Glu Pro Ala His Ile Ser Pro Ala Ile Pro Val Ile Ile Thr Ala
50          55          60
Val Tyr Ser Val Val Phe Val Val Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val
65          70          75          80
Met Phe Val Ile Ile Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile
85          90          95
Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Val Thr Thr Thr Met
100          105          110
Pro Phe Gln Ser Thr Val Tyr Leu Met Asn Ser Trp Pro Phe Gly Asp
115          120          125
Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr
130          135          140
Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val
145          150          155          160
Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys
165          170          175
Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Ser
180          185          190
Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile
195          200          205
Glu Cys Ser Leu Gln Phe Pro Asp Asp Tyr Ser Trp Trp Asp Leu
210          215          220
Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu
225          230          235          240
Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val
245          250          255
Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile
260          265          270
Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Val Cys Trp Thr
275          280          285
Pro Ile His Ile Phe Ile Leu Val Glu Ala Leu Gly Ser Thr Ser His
290          295          300
Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr
305          310          315          320
Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
325          330          335
Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Leu Lys Met Arg Met
340          345          350
Glu Arg Gln Ser Thr Ser Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
355          360          365
Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Gly Met Asn Lys Pro Val
370          375          380

```

<210> 30
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 智人

[0022]

<400> 30

```

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

```

<210> 31

<211> 493

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

```

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

```

[0023]

<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

162

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

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

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

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

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

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

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

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P1处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

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

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

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

[0025]

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

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

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基化羧基末端的SNAP-25抗原

<221> SITE
<222> (13)... (13)
<223> 羧基化谷氨酰胺

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

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P1处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

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

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

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

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

<400> 43
Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5

<210> 44
<211> 10

[0026]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

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

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

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

<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

<400> 46
Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 在BoNT/A裂解位点易分裂键的P1残基处具有游离羧基末端的SNAP-25抗原

<221> SITE
<222> (13)... (13)
<223> 羧基化赖氨酸

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

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SNAP-25抗原

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

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

[0027]

<220>

<223> SNAP-25抗原

<400> 49

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

<210> 50

<211> 88

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

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

<400> 50

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

<210> 51

<211> 97

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

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

<400> 51

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

<210> 52

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BirA肽

<400> 52

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

<210> 53

[0028]

<211> 7570
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC表达构建体.

<400> 53
 gacggatcgg gagatctccc gateccctat ggtcgactct cagtacaatc tgcctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggctcgt gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgtttttgcg ctgcttcgcc tcgaggccgt gccattgcat acgttgatc 240
 catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
 gattattgac tagttatlaa taglaalcaa llacgggglc attagllcal agcccatata 360
 tggagtcccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggtgaccg cccaacgacc 420
 cccgccatt gagctcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccataa gggactttcc 480
 attgacgtca atggglggag talllacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 540
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 660
 tcgclallac talggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcgggttg 720
 actcacgggg atttccaaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtgtg ttttggcacc 780
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc ccattgacg caaatgggcg 840
 glaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900
 cctggagacc ccattccacgc tgttttgacc tccatagaag acacggggac cgtaccagcc 960
 tcccgccgcc aaactgcctg ttccatggcc cggtagccga tccagatata tggcgccggc 1020
 ctacagcaagc ttccgcaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
 cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatgggtgat gttacaggcc acaagttctc 1140
 tgtcagtggg gaggglgaag glgaltgcaac atacggaaaa cltaccclga agllcatctg 1200
 cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
 tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gactttttca agagtgccat 1320
 gcccgaaagt tatgtacagg aaaggaccat ctcttccaaa gatgacggca actacaagac 1380
 acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac cctgtttaat agaactcagt taaaaggat 1440
 tgacttcagag gaagatggca acattctggg acacaaatig gaatacaact ataactaca 1500
 caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagaccg 1560
 ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620
 tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaat ctgccccttc 1680
 gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtcctctt gagtttgtta cagctgctg 1740
 gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga ggccggaggtg gaccttttgt 1800
 taataaacaa tttaattata aagatcctgt aaatgggtgt gatattgctt atataaaaaat 1860
 tccaaatgca ggacaaatgc aaccagtaaa agctttttaa attcataata aaatatgggt 1920
 tattccagaa agagatacat ttacaaatcc tgaagaagga gatttaaatc caccaccaga 1980
 agcaaaacaa gtccagttt catattatga ttcaacatat ttaagtacag alaaalgaaa 2040
 agataattat ttaaaggagg ttacaaaatt atttgagaga atttattcaa ctgactcttg 2100
 aagaatgttg ttaacatcaa tagtaagggg aataccattt tggggtggaa gtacaataga 2160
 tacagaatta aaagtatttg atactaatig tattaatgtg atacaaccag atggtagtta 2220
 tagatcagaa gaacttaate tagtaataat aggacctca gctgatatta tacagtittga 2280
 atgtaaaagc tttaggacatg aagttttgaa tcttacgcga aatggttatg gctctactca 2340
 atacattaga tttagcccg attttacatt tggttttgag gagtcacttg aagttgatac 2400
 aaatcctctt tttagtgacg gcaaatttgc tacagatcca gcagtaacat tagcacatga 2460
 acttatacat gctggacata gatttatatg aatagcaatt aatccaaata gggtttttaa 2520
 agtaaaatac aatgcctatt atgaaatgag tgggttagaa gtaagctttg aggaacttag 2580
 aacatttggg ggacatgatg caaagtttat agatagtta caggaaaacg aatttcgtct 2640
 atattattat aataagtita aagatatagc aagtacactt aalaaagcta aatcaatagt 2700
 aggtactact gcttcattac agtatatgaa aaatgtttt aaagagaaat atctcctatc 2760
 tgaagataca tctggaaaat ttccggtaga taaattaaaa ttgtataagt tatacaaaat 2820
 gttacacag atttacacag aggataattt tgttaagtt tttaaaglac ttaacagaaa 2880
 aacataattg aattttgata aagccgtatt taagataaat atagtaccta aggtaaatta 2940
 cacaatatat gatgattta atttaagaaa tacaatttta gcagcaaaact ttaatggtca 3000
 aaatacagaa attaataata tgaattttac taaactaaaa aattttactg gattgttlla 3060
 attttataag ttgctatgtg taagagggat aatcacttcg aaatgaacgc gttggcccta 3120
 llclataglg lcacclaaal gctagagctc gctgatcagc ctgactgtg cctctagt 3180
 gccagccatc tgttgtttgc cctcccccgc tgccttcctt gaccttgaa ggtgccactc 3240
 ccactgtcct ttctaataa atagaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 3300
 ctattctggg ggggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca 3360
 ggcatgctgg ggatgcggtg ggcctctatg cttctgagc ggaaagaacc agctgggct 3420
 ctagggggta tccccacgcg cctgttagcg gcgcattag cgcggcggtg gtgtgtgta 3480
 cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccttagcgcc cgtcctttc gcttcttcc 3540
 ctctctttct cgcacgttc gccggtttc cccgtcaagc tctaaatcgg ggcacccct 3600
 taggggtccg atttagtgc ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtagt 3660
 gttcacgtag tgggccatcg cctgataga cgttttttcg cctttgacg ttggagtcca 3720
 cgtttcttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggtct 3780

[0029]

```

attcttttga ttataaaggg attttgggga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 3840
tttaacaaaa atttaacggg aattaatict gtggaatgtg tgcagtttag ggtgtggaaa 3900
gtccccaggg tccccaggca ggcagaagta tgcaaagcat gcattctaat tagtcagcaa 3960
ccagggtggt aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 4020
attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccct cccgccccta actccgccc 4080
gttcgcgcca ttctccgccc catggtctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg 4140
ccgctcttgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttttga gccctaggct 4200
tttgcaaaaa gcicccggga gctttgtatat ccattttcgg atctgatcaa gagacaggat 4260
gaggatcggt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctcgc gccgcttggg 4320
tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccc 4380
tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggt 4440
ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acggcgcttc 4500
cttgccgagc tgtgtctgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattggcg 4560
aagtgcgggg gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctcc tgcgagaaa gtatccatca 4620
tggtgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tactgcccc ttcgaccacc 4680
aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcggtatgga agccggtctt gtcgcatcg 4740
atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgcagccga actgttcgcc aggtcaagg 4800
cgcgatgcc cgacgcccag gatctcgtcg tgaccatgg cgatgccgc ttgccgaata 4860
tcattggtga aaatggccgc tttcttgat tcacgactg tggccgctg ggtgtggcg 4920
accctaatga ggacatagcg ttggctaccc gtgatattg tgaagagctt ggcgcatcg 4980
gggcigaccg ctctctgtg ctttacggta tgcgcgtcc cgattcgag cgcctgcct 5040
tctatcgct tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa tgaccacca 5100
agcgacgccc aacctgccat cagagattt cgattccacc gccgcctct atgaaagggt 5160
gggcttcgga atcgttttcc gggacgccc ctggatgac ctccagcgc gggatctcat 5220
gtggagttc ttgcgccacc ccaactlgt laltgcagct tataatggtt acaataaag 5280
caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggtt 5340
gtccaaatc atcaatgtat ctatcatgt ctgtatacgc tcgacctcta gctagagctt 5400
ggcgtaatca tggctatagc tgtttcctgt gtgaaattg tatccgctca caallccaca 5460
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaagag tgagctaaact 5520
cacattaatt gcgttgccgt cactgcccgc tttccagtcg ggaacacctg cgtgccagct 5580
gcattaatga atcgcccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc 5640
ttctcgtct actgacgcg tgcgctcggt cgltcggtg cggcgagcgg tatcagctca 5700
ctcaaaaggc gtaatacgtt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacaatgt 5760
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 5820
taggtctcgc cccctgacg agcatcacaa aaalcgacgc lcaagtcaga ggtggcgaaa 5880
ccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgtctcc 5940
tgttccgacc ctgcccctta cgggataact gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 6000
gctttctcaa tgcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 6060
gggctgtgtg cagcaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 6120
tcttgagtc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 6180
gattagcaga cggaggtatg tagcggtgac tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta 6240
cggtacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcgg 6300
aaaaagagtt gtagctctt gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt 6360
tggttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 6420
ttctacggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt lggltcatgag 6480
attatcaaaa aggatcttca cctagatctt tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat 6540
ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttacca tgcttaatca gtgaggcacc 6600
tatctcagcg atctgtctat ttggttcac catagttgcc tgactcccc tcgtgtagat 6660
aaclacgala cgggagggtt taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc 6720
acgtccaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 6780
aagtggctct gcaactttat ccgctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag 6840
agtaagtagt tcgccagtt atagtttgc caacgttgtt gccattlglc caggcatcgt 6900
gggtgcacgc tcgtctgttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 6960
agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tcttccggtc ctccgatcgt 7020
tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 7080
lcllactglc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 7140
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc cggcgctcaa tacgggataa 7200
taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaaacgtt cttcggggcg 7260
aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctctgtcacc 7320
caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagcaaa aaacaggaag 7380
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataaggcg gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7440
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 7500
tgaatglall laggaaaaata acaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgc 7560
acctgacgtc 7570

```

<210> 54
 <211> 682
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0030]

<220>

<223> GFP-BoNT/A轻链氨基酸序列.

<400> 54

Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 50 55 60
 Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
 65 70 75 80
 His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85 90 95
 Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 100 105 110
 Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 115 120 125
 Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 130 135 140
 Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 145 150 155 160
 Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
 165 170 175
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 180 185 190
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
 195 200 205
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220
 Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp
 245 250 255
 Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly
 260 265 270
 Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val
 275 280 285
 Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn
 290 295 300
 Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr
 325 330 335
 Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu
 340 345 350
 Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp
 355 360 365
 Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro
 370 375 380
 Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro
 385 390 395 400
 Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val
 405 410 415
 Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe
 420 425 430
 Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr
 435 440 445
 Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr
 450 455 460
 Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala
 465 470 475 480
 Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu
 485 490 495
 Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly
 500 505 510
 His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu
 515 520 525

[0031]

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

<210> 55
 <211> 6259
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> pQBI-25/GFP表达构建体.

<400> 55
 gacggatcgg gagatctccc gateccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgtccctcg cttgtgtgtt ggaggtcgtc gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcccg gccattgcat acgttgtatc 240
 catatcataa tatgtacatt tatattggtc catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 360
 tggagtcccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggtgaccg cccaacgacc 420
 ccgcgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgcccaata gggactttcc 480
 attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 540
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
 atgcccagta catgacctta tgggaccttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca 660
 tcgtatttac catgtgatg cgggttttgc agtacctcaa tgggcgtgga tagcggtttg 720
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 780
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatggcg 840
 glaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tllagtgaa cgtcagatcg 900
 ctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccalagaag acaccgggac cgatccagcc 960
 tccgcgggcc accatggagg gcccggttac cggtaaccga tccagatata tgggcggccg 1020
 ctcagcaagc ttgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
 cactggagtt gtcccaatc ttgttgatt agatgggtgat gttacggcc acaagtctc 1140
 tgtcagtgga gaggtgaag gtgatgcaac atacggaaaa cttacctga agttcatctg 1200
 cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatgggtg 1260
 tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gactttttca agagtccat 1320
 gccgaagggt tatgtacagg aaaggacat cttcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380
 acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac ccttgtaaat agaatcgagt taaaaggat 1440
 tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
 caatgtatac atcatggcag acaacaacaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagaccg 1560
 ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620
 tggcgtatgc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaa ctgccctttc 1680
 gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gattttgtaa cagctgctgg 1740
 gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga ggcggagggt gatgaacg 1800
 ttggccctat tctatagtgt cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc 1860
 cttctagtgt ccagecatct gttgtttgcc cctccccgt gccttcttg accctggaag 1920
 gtgccactcc cactgtcctt tcttaataaa atgaggaaal tgcacgcat tgtctgagta 1980
 ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtg ggcaggacag caagggggag gattgggaag 2040
 acaatagcag gcatgctggg gatgcgggtg gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca 2100
 gctggggcic taggggggtat ccccacgcgc cctgtagcgg cgattaaagc gcggcgggtg 2160
 tgggtggtac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcggcc gctcctttcg 2220
 ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg ccggttttcc ccgtcaagct cttaactcgg 2280
 gcaccccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt 2340
 aggggtgatg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt 2400

[0032]

```

tggagtcac gtttttaat agtggaclet lgttccaaac tggacaaca ctcaacccta 2460
lctcggtcta tttttttag ttataaggga ttttggggat ttcggcctat tggtaaanaa 2520
atgagctgat ttaacaaaaa ttttaacgca attaatcttg tggaaatgtg gtcagttagg 2580
gtgtggaaag tccccagget cccagggcag gcagaagtat gcaaaagcatg catctcaatt 2640
agtcagcaac caggtgtgga aagtcceccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaaaga 2700
tgcatctcaa ttagtcagca accatagtec cgccectaac tccgcccata ccgcccctaa 2760
ctccgcccag ttcgcccata lctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatggag 2820
aggccgagge cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 2880
gcctaggttt ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatatc cattttcgga tctgatcaag 2940
agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3000
ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3060
atgccgcgtg gttccggctg tcagcgcagg ggcccccggg tctttttgtc aagaccgacc 3120
tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgttg ctggccacga 3180
cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3240
tatgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca cettgctcct gccgagaaag 3300
tatccatcat ggctgatgca atgcgggggc tgcatacgtg tgatccggct acctgcccat 3360
tcgaccacca agcgaacatc cgcctcgagc gacacgttac tggatggaa gccggctctg 3420
tcgatcagga agtatggac cgatctgacg aggggctcgc gccagccgaa ctgttgcctg 3480
ggctcaagge gcgcctgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct 3540
tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggcttg 3600
gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg tgatattgct gaagagcttg 3660
gcggcgaaat ggctgaccgc ttctcgtgct tttacgggat cgcgctccc gattcgcagc 3720
gcacgccttt ctatgccttt cttagcaggt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 3780
gaccgaccaa gcgacgcccc acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgcttctca 3840
tgaaaggttg ggcttcggaa tccgtttccg ggacgcgggc tggatgatcc tccagcgcgg 3900
ggatctcatg ctggagtctc tcgcccaccc caacttgctt attgcagctt ataattgcta 3960
caataaagc aatagcatca caaatctcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag 4020
ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgct tgtataccgt cgacctctag 4080
ctagagcttg gcgtaatcat ggctcatagc gtttcccttg tgaattgtt atccgctcac 4140
aattccacac aacatacagc ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgag 4200
gacatgaact acattaattg cgttgcgctc actcccgcct ttccagtcgg gaaacctgtc 4260
gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggccggtttg gtattggggc 4320
ctcttcgctc tctcgtctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggccgagcgt 4380
atcagctcac tcaaaaggcg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 4440
gaacatgta gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cglgtcggc 4500
gtttttccat aggttcgccc cccctgacga gcatacaaaa aatcgacgt caagtcagag 4560
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgctt ccccttgga gctcccctgt 4620
gcgctctcct gttccgaccc tgcgctttac cggatacctg tccgctttc tcccttcggg 4680
aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcgtgtg aggtcgttcg 4740
ctccaagctg gctgtgtgtc accgaacccc cgttcagccc gaccgctcgc cttatccgg 4800
taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 4860
tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgt acagagtctt tgaagtgtg 4920
gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt 4980
taccctcgga aaaagagttg gtacgtcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg 5040
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 5100
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aacacacgtt aagggtttt 5160
ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatctctac ctatagctct ttaaattaaa aatgaagttt 5220
taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcac 5280
tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcttctatcc atagtgtcct gactccccgt 5340
cgtgtagata actacgatac gggagggtct accatctggc cccagtgtg caatgatacc 5400
gcgagaccca cgtcaccggg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 5460
cgagcgagca agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgcg 5520
ggaaagctaga gtaagtgtt gcgcagttta tagtttgccg aacgttgttg ccattgctac 5580
aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgttttg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 5640
atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggctc 5700
tcgcatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact 5760
gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tclgtgactg gtgagtactc 5820
aaccaagtca ttttgagaat agtgtatgct gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgctcaat 5880
accgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 5940
ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 6000
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 6060
aacaggaagg caaaatgcgg caaaaaaggg aataaggcgc acacggaaat gttgaatact 6120
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttatlgc tcatgagcgg 6180
atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 6240
aaaagtgcc cctgacgtc 6259

```

<210> 56
<211> 245
<212> PRT

[0033]

<213> 人工序列

<220>

<223> GFP氨基酸序列.

<400> 56

```

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

```

<210> 57

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G-间隔子柔性间隔子

<400> 57

```

Gly Gly Gly Gly
 1

```

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G-间隔子柔性间隔子

<400> 58

```

Gly Gly Gly Gly Ser
 1          5

```

<210> 59

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

[0034]

<220>
<223> A-间隔子柔性间隔子

<400> 59
Ala Ala Ala Ala
1

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A-间隔子柔性间隔子

<400> 60
Ala Ala Ala Ala Val
1 5

<210> 61
<211> 3359
<212> DNA
<213> 智人

<400> 61
gtcagaggtgc tcatagtggg gccctggctc ccgggcggac ggagccgcac ggtagtagat 60
gggggtgtgg ccgtggcccc cgactctgct cggcggggcc gttcctgctt tgccatccgt 120
gtgggacttc cagcacagtg gaggcacgag agctgggccc catatgctgc ttgccagct 180
tgggaaagag gaggtctgtg caaaggaccg atcggcggtc tcgggctgcc ggctcactcg 240
gtctgtcgtc ctggtctggt gtctgtgtgag aagatcctct tctaccctgc tctgcacctg 300
tgctcgactg ccagccggct gagggcgggg gtcgccacgg lgggccagc tcccaaggag 360
gttgacagaag taacctacag aglggatttg cagggcagtg gcatggagcc cctcttcccc 420
gcgccgttcl gggaggttat ctacggcagc caccttcagg gcaacctgtc cctcctgagc 480
cccaaccaca gtctgtgtgc cccgcactct ctgtcctaat ccagccacgg cgccttctctg 540
ccctcggggc tcaaggtcac catcgtgggg ctctacctgg ccgtgtgtgt cggagggtc 600
ctgggggaact gccctgtcat gtacgtcatc ctacggcaca ccaaatgaa gacagccacc 660
aatatttaca tctttaacct ggccctggcc gacactctgg tctgtgtgac gctgcccttc 720
cagggcacgg acatcctcct gggttcttgg ccgttgggga atgcgtgtg caagacagtc 780
attgccattg actactacaa catgttcacc agcaccttca ccctaactgc catgagtgtg 840
gategetatg tagccatctg ccaccccatc cgtgccctcg acgtccgcac gtccagcaaa 900
gcccaggtcg tcaatgtggt catctgggccc ctggcctctg ttgtcggtgt tccgttggc 960
atcatgggct cggcacaggt cgaggatgaa gagatcgagt gccctgggtg gatccctacc 1020
cctcaggatt actggggccc ggtgtttgccc atctgcatct tctcttcttc ctctcatctc 1080
ccgtgtctcg tcatctctgt ctgtacacgc ctcatgatcc ggccggtccg tggagtccgc 1140
ctgtctctcg gctcccagga gaaggaccgg aacctgcccg gcatcactcg gctgggtctg 1200
gtggtagtgg ctgtgttctg gggtgtgtgg acgctgttcc aggtcttctg gctggcccaa 1260
gggtgtgggg ttccagccgag cagcgagact gccgtggcca ttctgcgtt ctgcacggcc 1320
ctgggtctac tcaacagctg cclcaacccc atctctacg ccttccctga tgagaacttc 1380
aaggctctcl tccgcaagtt ctgtgtgtga tctgcccctg gccgggacgt gcaggtgtct 1440
gaccgctgct gcagcattgc caaggacgtg gccctggcct gcaagacctc tgagacggta 1500
ccgcggcccc catgactagg cgtggacctg cccatggtgc ctgtcagccc gcagagccca 1560
tctacgcccc acacagagct cacacaggtc actgctctct aggcggacac accctgggcc 1620
ctgagcatcc agagcctggg atgggctttt cctgtgggccc cagggatgct cggctcccaga 1680
ggaggaccca gtgacatcat gggacaggtc aaagcattag ggccacctcc atggcccccag 1740
acagactaaa gctgccctcc ttggtcaggg ccgaggggac acaaggacct acctggaagc 1800
agctgacatg ctggtggacg gccgtgactg gagcccgtgc cctccctcc ccgtgcttca 1860
tgtgactctt ggctctctct ctgtgtcgtt ggcagaacct tgggtgggca ggcacccgga 1920
ggaggagcag cagctgtgtc atcctgtgccc ccccatgtgc tgtgtgtgt ttgcatggca 1980
gggctccagc tgccttcagc cctgtgacgt ctctcagggg cagctggaca ggcttggcac 2040
tgccccggaa gtgcagcagg cagcttttct ttgggggtggg acttgccttg agcttggagc 2100
tgccacctgg aggaacttgc tgttccgact ccacctgtgc agccggggcc accccaggag 2160
aaagtgtcca ggtgggggct ggcagctcct ggctgcagac cccgagctgg ccttgggcca 2220
gcgcagcttc tgaaggtttt ctgtgtgtgt cagcgtgacg gctcctcc ccactgagc 2280
ttgactctgg gcccacccc catttccctt caggagacca gcgagaggcc ctggcccatt 2340
ccctccagcg glgcaatgaa ctatcatgct gtggaccgtc aaccagccc tgccttctag 2400
tgtggggcag gtgtctcagg acgaaggcgc cgcgtgacca catgggcagc tcigilcaca 2460
aagtgcagcc ctggttttcc ttgtcttgac tgctctgttt ggggtgggaga agattctctg 2520
ggggteccca catctcccca aggtccctct cacagcctct cctttgtgtg aagccagagc 2580
tcagtggccg tgctgtgttg cgggggaagc tgtgtggaag gagaagctgg tggccacagc 2640

[0035]

```

agagtccctgc tctggggacg cctgcttcat ttacaagcct caagatggct ctgtgtaggg 2700
cctgagcttg ctgcccacg ggaggatggc ttacacagc agccagcatg aggggtgggg 2760
cctggcaggg cttgcttgag ccaactgca aaggctgtgg tggctgtgag gacactgcgg 2820
gggttggggg gggggcgctc gtacctcagg ggatgccccg ctglgttcac ccagagaatc 2880
acccttctcg gtctacagat ggaagctgca ggltgglgac ttgcaaatg cacttctac 2940
agatgaacta ttaaaagacc tgcaacallg aaaaaactca tttttccac caaaaccttg 3000
gccaggtaac claccttagg cacctgcaaa gaacagggaag tgatggctgt ctgcgaacag 3060
agccitgggt gctcctcctg ctctggggag tctaggccgt ggggactgtt ctggggaggc 3120
lcalgtctgc tccatgacgt ctgtggcagg agtccctgag gacgggagct gcttagctac 3180
agttttcttg ccaaggcgag gtgttttgtg aatctgtgct gatgtaatgt gcaccttcac 3240
gtattttatgc atgtggcaag cgttacttcc tgtgcacgta gccagccctg ggtctgtctc 3300
tggggtaatg aaaaaggacc ctaataaaca cctgctcact ggctgggtat tcttcgtaa 3359

```

<210> 62
 <211> 1134
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 62
ttgcagggca gtggcatgga gcccctcttc cccgcgcctg tctgggaggt tatctacggc 60
agccaccttc agggcaacct gtccctcctg agccccaacc acagtctgct gcccgcgat 120
ctgctgtctc atgccagcca cggcgccttc ctgcccctcg ggctcaaggt caccatctg 180
gggctctacc tggccgtgtg tgtcggaggg ciccggggga actgccttgt catgcacac 240
aaaatgaaga cagccaccaaa tatttacctc tttaacctgg ccctggccga cactctggtc 300
ctgcigacgc tgccttccca gggcacggac atcctcctgg gcttctggcc gtttgggaat 360
gcgctgtgca agacagtcac tgccattgac tactacaaca tgttaccag caccctcacc 420
ctaactgcca tgaagtgtga tcgctatgta gccatctgcc accccatccg tgcctcgcac 480
gtccgcacgt ccagcaaagc ccaggtctgtc aatgtggcca tctgggccct ggctctgtt 540
gtcgggtgtc cgtttgccat catgggctcg gcacaggtcg aggatgaaga gatcgagtgc 600
ctggttgaga tccctacccc tcaggattac tggggcccgg tgtttgcat ctgcattctc 660
ctcttctctc tcatctgccc cgtgctcgtc atctctgtct gctacagcct catgatccgg 720
cggctccgtg gagtcgcctc gctctcgggc tcccagagaa aggaccggaa cctgcggcgc 780
atcactcggc tgggtgctgt ggtagtggct gtgttcgtgg gctgctggac gcctgtccag 840
gtcttctgtc tggcccaagg gctgggggtt cagccgagca gcgagactgc cgtggccatt 900
ctgcgttctc gcacggccct gggtctacgt aacagctgcc tcaaccccat cctctacgcc 960
ttcctggatg agaacttcaa ggctgtcttc cgcgaattct gctgtgcate tgccttgcgc 1020
cgggacgtgc aggtgtctga ccgctgtgcg agcattgcc aaggacgtgg cctggcctgc 1080
aagacctctg agacggtacc gcggcccga tgaataggcg tggacctgcc catg 1134

```

<210> 63
 <211> 1774
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 63
ccgaggagcc tgcggctgct cctggctcac agcgtccgg gcgaggagag cgggaggagc 60
ccgggggctg ggccgggtgc ggccggcagg caggcggagc aggcgcagag acagcggggc 120
ggccggggcg cgccagccgg cgccgtcggg gccgcggcct ctgcccctgc gctcccctcg 180
cgtcggatcc ccgcgccag ggccgacggg ggagaggagc gcggcggagc cggccggcag 240
ccatggaacc ggcccctcc gccggcgccg agctgcagcc ccgctcttc gccaacgct 300
cggacgcta ccctagcgcc tgcgccagcg ctggcgccaa tgcgtcgggg ccgccaggcg 360
cgcggagcgc ctgctccctc gcctggcaca tcgcatcac cgcgctctac tggccgtgt 420
gcgccgtggg gctgtcgggc aacgtgcttg tcatgttcgg catcgtccgg tactactaaga 480
tgaagacggc caccaacatc tacatcttca acctggcctt agccgatgcg clggccacca 540
gcacgtgcc tttccagagt gccaaagtacc tgaatggagac gtggcccttc ggcgagctgc 600
tctgcaagge tgtgtctcc atcgactact acaatatgtt caccagcatc ttacgctca 660
ccatgatgag tgttgaccgc tacatcgctg tctgccacc tgtaaggcc ctggacttcc 720
gcacgcctgc caaggccaag ctgatcaaca tctgtatctg ggtcctggcc tcaggcgttg 780
gcgtgcccat catgtcatg gctgtgaccc gtcccgggga cggggcagtg gtgtgcatgc 840
tccagttccc cagcccagc tgggtactgg acacgggtgac caagatctgc gtgttctct 900
tcgcttctgt ggtgcccac ctcacatca ccgtgtgcta tggcctcatg ctgctgcgc 960
tgcgcagtgt gcgctgtgt tcgggtccca aggagaagga ccgcagcctg cggcgcatca 1020
cgcgcagtgt gctgggtgtt gtgggcgcct tcgtggtgtg ttgggcgccc atccacatct 1080
tcgtcatcgt ctggacgtgt gtggacatcg accggcgcca ccgctggtg gtggtgcgc 1140
tgacctgtgt catcgctgt ggctacgcca atagcagcct caacccgtg ctctacgct 1200
tctcgacga gaacttcaag cgtgcttcc gccagctctg ccgcaagccc tgcggccgcc 1260
cagaccccag cagcttcagc cgcgcccgcg aagccacggc ccgcagcgt gtcaccgct 1320
gcaccccgtc cgtatgtccc ggccgtggcg ctgcccctg accaggccat ccggccccc 1380
gagcggccct cctagtgc acggaggcca catgagtcac agtgggaggc gcgagccatg 1440
atgtggagtg gggcagtaga aggtcggagg cttgggaccg ccagatgggg cctctgttc 1500
ggagacggga ccgggcccgt agatgggcat ggggtgggcc tctggtttgg ggcgaggcag 1560

```

[0036]

```

aggacagatc aatggcgcag tgcctctggt ctgggtgccc cgtccacggc tctaggtggg 1620
gcgggaaagc cagtgaactc aggagaggag cgggacctgt ggctctacaa clgaglcctt 1680
aaacaggggca tctccaggaa ggcggggccll caaccttgag acagcttcgg tttctaactt 1740
ggagccggac tttcggagtt gggggllccgg gcc 1774

```

<210> 64
 <211> 1773
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 64
ccgaggagacc tgcgtgctc ctggctcaca ggcctccggg cgaggagagc gggcggaccg 60
gggggtctgg cgggtgcggg cggcgaggca ggcggacgag gcgcagagac agcggggcgg 120
ccggggcgcg gcacgcggcg ggctcggggc ggctcttgcc ttcccgctcc ctcgcgtcg 180
gateccccgc cccaggcagc cgggtgagag ggacgcggcg gacgccggca gccatggaac 240
cggccccctc cgccggcgcc gagctgcagc ccccgtcttt cgccaacgcc tcggacgcct 300
accctagcgc ctccccage gctggcgcca atgcgtcggg gccgccagcg gcgcggagcg 360
ctcgtccct cgccctggca atcgccatca ccgcgtctta ctggccgtg tgcgcgtgg 420
ggctgctggg caacgtgctt gtcattgtcg gcctgtccg gtacactaag atgaagacgg 480
ccaccaacat ctacatcttc aacctggcct tagccgatgc gctggccacc agcacgcctg 540
cttccagag tgccaagtac ctgatggaga cgtggcccll cggcgagcig ctctgcaagg 600
ctgtgtctc catcgactac tacaalalgl lcaccagcat ctacacgctc accatgatga 660
gtgttgcccg ctacalcgl gctgccacc ctgtcaaggc cctggacttc cgcacgcctg 720
ccaaggccaa gctgatcaac atctgtatct gggtcctggc ctacggcgtt ggcgtgcccc 780
lcatggctat ggctgtgacc cgtccccggg acggggcagc ggtgtgcatg ctccagttcc 840
ccagccccag ctggtactgg gacacgggtg ccaagatctg cgtgttctc ttgccttcg 900
tgggtgccat cctcatcctc accgtgtgct atggcctcat gctgctgcgc ctgcgcagtg 960
tgcgcctgct gtcgggctcc aaggagaagg accgcagcct gcggcgcatc acgcgcagtg 1020
tgctggtggt tctgggcgcc ttcgtggtgt gttgggcgcc catccacatc ttctgcatcg 1080
tctggacgct ggtggacatc gaccggcgcg acccgtggt ggtggtgctg ctgcacctgt 1140
gcatcgcgct gggtacgccc aatagcagcc tcaaccccggt gctctacgct ttctcgacg 1200
agaacttcaa gcgtgcttc cgccagctct gcccaagcc ctgcggccgc ccagacccca 1260
gcagcttcag ccgcgcgcgc gaagccacgg cccgcgagcg tgcaccgcc tgcaccccg 1320
ccgatggtcc cggcggtggc gctgcgcct gaccaggcca tccggccccc agacggccct 1380
ccctagtgt acccgaggc ccatgagtc ccagtgggag gcgcgagcca tgatgtggag 1440
tggggccagt agataggctg gagggtttt ggaccgccag atggggcctc tgtttcggag 1500
acgggaccgg gccgctagat gggcatgggg tgggcctctg gtlggggcg aggcagagga 1560
cagatcaatg gcgcagtgcc tclggcllgg glgccccgt ccacggctct aggtggggcg 1620
ggaaagccag tgacccagg agaggagcgg gacctgtggt tctacaactg agtccttaaa 1680
cagggcaccl ccagggaagg ggggcttcaa ccttgagaca gcttcggtt ctaacttggg 1740
gccgacttt cggagttggg ggggtccggg ccc 1773

```

<210> 65
 <211> 1154
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 65
atggactccc cgatecagat ctccgcggg gagccgggcc ctacctgcgc cccgagcgcc 60
tgctgcccc ccaacagcag cgctgggttt cccggctggg ccgagcccg cagcaacggc 120
agcgcggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccgc catcccggtc 180
atcatcagc cgggtactc cgtagtgtt gtcgtgggct tgggtgggcaa ctcgtggtc 240
atgttctga tcatccgata cacaagatg aagacagcaa ccaacattt catatttaac 300
ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac ggtctacttg 360
algaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccctgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480
tgccaccccg tgaaggcttt ggacttccgc acacccttga aggcacaagat catcaatate 540
tgcatctggc tgcgtcgtc atctgttggc atctctgcaa tagtcttgg aggcacccaa 600
gtcagggaag acgtcgatgt cattgagtg tccctgcagt tcccagatga tgactactcc 660
tgggtggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcatctttg ccttcgtgat ccctgtctc 720
atcatcatcg tctgtacac cctgatgatc ctgcgtctca agagcgtccg gctccttct 780
ggctcccgag agaaagatcg caacctgcgt aggtacacca gactggtcct ggtggtggtg 840
gcagttctcg tctgtctgct gactccatt cacatattca tcttggtgga gctcttggg 900
agcacctccc acagcacage tctctctctc agctattact tctgcatcgc cttaggctat 960
accaacagta gccgaatcc cattctctc gccttctt atgaaaactt caagcggtgt 1020
ttccgggact tctgcttcc actgaagatg aggatggagc ggcagagcac tagcagagtc 1080
cgaaatacag ttcaggatcc tgcctacctg agggacatcg atgggatgaa taaaccagta 1140
tgactagtct tggg 1154

```

<210> 66
 <211> 1143

[0037]

<212> DNA
<213> 智人

<400> 66

```

atggaatccc cgattcagat cttccgcggg gagccggggc ctacctgcgc cccgagcgcc 60
tgccctgcccc ccaacagcag cgccctggtt cccggctggg ccgagcccga cagcaacggc 120
agcgccggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc catccccgtc 180
atcatcacgg cggctctact cgtagtgttc gtctgtggct tgggtgggcaa ctctgtgttc 240
atgttcgtga tcatccgata cacaagatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300
ctggcttttg cagatgcttt agttactaca accatgcctt ttcagagtac ggtctacttg 360
atgaattcct ggcccttttg ggatgtgtg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccctgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480
tgcccccgcg tgaagcttt ggacttccgc acacccttga aggcaaatg catcaatc 540
tgcatctggc tctgtctgct actgtttggc atctctgcaa tagtcttgaggaccacaaa 600
gtcagggag acgtcagtg cattgagtgc tcttgagcag tcccagatga tgactactcc 660
tggtgggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcattcttg ccttcgtgat cctgtctctc 720
atcactatcg tctgtctac cctgatgac ctgcgtctca agagcgtccg gctcctttct 780
ggctcccgag agaaagatcg caacctgcgt aggalcacca gactggctct ggtgggtgtg 840
gcagtcttgc lcgctgtgt gactccatt cacatattca tcttggtgga ggctctgggg 900
agcactctcc acagcacagc tgcctctctc agctattact tctgcacgc cttaggctat 960
accaacagta gccgtaatcc cattctctac gcccttcttg atgaaaactt caagcggtgt 1020
ttcggggact tctgctttcc actgaagatg aggatggagc ggccagagcac tagcagagtc 1080
cgaaatacag ttcaggatcc tgcctacctg agggacatcg atgggatgaa taaaccagta 1140
tga
1143

```

<210> 67

<211> 2738

<212> DNA

<213> 智人

<400> 67

```

cctgtaaaga aatgatgag ggctaaatcc atcagcacca aagctgggaa gccctccagg 60
ttcatttggg agaaaatact cctctgagct caaaggaaat gtgatctgtc acaatatgtt 120
atgcctgcac taagtttgca tcttgaatac tctactggaag ataggaaagc aagcatgaaa 180
aagcagccgg gtcagacagg cttctggatt cagtgtgttg acatgacttt gcttgcata 240
atlgccccll lctctacaa acaagagaat tgggtcaagt ggaatgtggc gaacggggc 300
gtctgtgat gatagaaaag ggctcctgct tttcctgtaa ttgcagcccc ttgttcttgt 360
ggttgcata tgcaataaat gtaattctat gagaaggacc agcccttaca tcccatcaaa 420
atgtttctcg gaaacctgga gcacagaact ctgatatcct ctacactgt ggccaggaga 480
gcagcacaa gcaaatgct gaaatagcat ggtccaggat gtgtttgcac agaagagtgc 540
ccagtgaaga gacctactcc ttggatcgct ttgcgcaaaa tccacccttt tccctctc 600
cctccttcc agcctccgaa tcccgcagtg cccacgctcc cctcctgcag cgggtcgggg 660
cagccaggag tggtttctgt aagaacagc agtagctgtg gcagcggcga aaggaagcgc 720
ctgagggcgt ttgaaaccca aaagtctcgg tgcctctggc tacctcgac agcgggtccc 780
gcccggcgt cagtaccatg gacagcagcg ctgccccac gaacgccagc aatigcactg 840
atgccttggc gtactcaagt tgcctcccag caccagcccc cggttcttggt gtaacttgt 900
cccacttaga tggcaacctg tccgacctat ggggtccgaa ccgcaccgac ctgggcggga 960
gagacagcct gtgccctccg accggcagtc cctccatgat cagggccatc acgatcatgg 1020
cctctactc catcgtgtgc gtgtgggggc tcttcggaaa cttcctgtgc atgtatgtga 1080
ttgtcagata caccaagatg aagactgcca ccaacatcta catcttcaac cttgtctctg 1140
cagatgcctt agccaccagt acctgcctt tccagagtgt gaattaccta atgggaacat 1200
ggccalllgg aaccalccll lgcaagalag tgatctccat agattactat aacatgttca 1260
ccagcatatt caccctctgc acctagatg ttgatcgata cattgcagtc tgcaccctg 1320
tcaaggcctt agatttccgt actcccga atgccaaaat tatcaatgtc tgcaactgga 1380
tctctcttc agccattggt cttcctgtaa tgttcatggc tacaacaaa tacaggcaag 1440
gttccataga ttgtacata acattctctc atccaacctg gactgggaa aacctgctga 1500
agatctgtgt ttctacttc gccctcatta tgcagtgct catcattacc gtgtgtctatg 1560
gactgatgat cttgcctc aagagtgtc gcagtctctc tggctccaaa gaaaaggaca 1620
ggaatcttcg aaggatcacc aggatgggtc tgggtgggtg ggtgtgttc atcgtctgt 1680
ggacttccat tcacatttac gtcatcatta aagccttgggt tacaatccca gaaactacgt 1740
tccagactgt ttcttggcac tctaggtta cacaacagc tgcctcaacc 1800
cagtcttita tgcatttctg gatgaaaact tcaaacgatg cttcagagag ttctgtatcc 1860
caacctctc caacattgag caacaaaact cactcgaat tctcagaac actagagacc 1920
acccctccac ggccaataca gtggatagaa ctaatcatca gctagaaaa ctggaagcag 1980
aaactgctcc gttgccttaa cagggtctca tgccattccg accttccca agcttagaag 2040
ccacctgta tgtggaagca ggttgcctca agaattgtga ggaggtctc attctctagg 2100
aaagtgcctg cttttaggtc atccaaccctc tttctctct ggccactctg ctctgcacat 2160
tagagggaca gccaaaagta agtggagcal lgggaaggaa aggaatatac cacaccgagg 2220
agtccagttt gtgcaagaca cccagtggaa cgttggtatg tgaattgaag 2280
tcatcataaa aggtgacctc tctgtctgta agattttatt ttcaagcaaa tatttatgac 2340
ctcaacaaag aagaaccatc ttttgttaag ttcaccgtag taacacataa agtaaatgct 2400

```

[0038]

```

acctctgac aaagcaccll gaatggaagg tccgagtctt tttagtgttt tgcaaggga 2460
tgaatccatt attctatitt agacttttaa cttcacctta aaattagcat ctggctaagg 2520
catcatttcc acctccattt cttggttttg tattgtttta aaaaataaca tctctttcat 2580
ctagctccat aattgcaagg gaagagatta gcatgaaagg taatctgaaa cacagtcatt 2640
tgtcagctgt agaaaggttg atttccatgc actgcaataa cttccaaaga gtcattcatg 2700
gggatttttc attcttaggc ttccagtgtt ttgttctc 2738

```

<210> 68
 <211> 2053
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 68
catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
gctgtctttc ctccccccc tgctcggcgg ctcaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca acctcccga gaagcccagg tccagagcca aacctgtcac tgacccccca 180
gccaggcgcc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agtllggctga tgaglcgctg gaaagcacc 300
gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg taccaggact ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctcgatcgtg tcgaagaagg catgaaccat atcaaccaag 420
acatgaagga ggcagagaaa aattttaaag atttagggaa atgctgtggc cttttcatat 480
gtccttgtaa caagcttaaa tcaagtgtat cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtgtt gcaagccacg cclgcclglt tagtggacga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggttt catccgcagg gtaacaaatg atgcccaga aaatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gacggcgcac atcggggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgagcccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaagtggg taagtgtgcc 840
cacccgtgtt ctctccaaa tgcgtcggg caagatagct ccttcatgct tttctcatg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtc accccattg tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct ttgttctct cttgttctct 1020
ttctttccaa aggttgtaca tagtggctcat ttggtggctc taactccttg atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcggtggc atttgtgtaa taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtec tttagtgttc aggccttgaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttcttc atggctgtla tctgtctlla lgalitcatg attagacaat ttggaattac 1320
ataacaggca ttgactataa agtgatgtga tttatgcatt tatgcattag aactaaatag 1380
atttttagat tctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcactatg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaaacac agcaacaaca acagaacaac acaaaagcat gtcagttatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact tttttcctgt 1560
caatataatg acacttctaa atcataatca tctttttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatatgtt tggtgaaat 1680
tatgtcaaat ggatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtgtggatg taaattttat aaggtgact cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtae aattctttgt tgcctaatct agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa aataatataa 1920
atgaatgaaa lalaacigt gagataaala tcattatagc atgtaattat aaattcctcc 1980
tgtctctctt gtcagtttgt gaagtgtatt acattttgta gctagtttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc 2053

```

<210> 69
 <211> 2053
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 69
catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
gctgtctttc ctccccccc tgctcggcgg ctcaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca acctcccga gaagcccagg tccagagcca aacctgtcac tgacccccca 180
gccaggcgcc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agtllggctga tgagtcgctg gaaagcacc 300
gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg taccaggact ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctggaacgca ttgaggaagg gatggacca atcaataagg 420
acatgaagga agcagaaaaa aatttgacgg acctaggaaa attclgcggg ctttgtgtgt 480
gtccccglaa caagcllaa tcaagtgtat cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtgtt gcaagccacg cctgctcgtg tagtggacga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggttt catccgcagg gtaacaaatg atgcccaga aaatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gacggcgcac atcggggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgagcccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaagtggg taagtgtgcc 840
cacccgtgtt ctctccaaa tgcgtcggg caagatagct ccttcatgct tttctcatg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtc accccattg tgaatgttgt 960

```

[0039]

```

cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttgggtctct 1020
ttctttccaa aggttgtaca tagtgggtcat ttgggtggctc taactccttg atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcggtggc atttgcgtgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gtgtattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaaactg tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtec tttagtggtc aggcctctgaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttctct atggctgtta tctgtcttta tgatttcattg attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgcactaaa agtgcattgga tttatgcatt tatgcattgag aactaaatag 1380
attttttagat tctactttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact tttttcctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tcttttttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatatgtt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740
gagcaatcct gctgtgaaac agtgtggatg taaattttat aaggctgact cttactaacc 1800
accatttccc ctglggtttg ttatcagtac aattctttgt tgcttaatcl agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatage atgtaatat aaattcctcc 1980
tgtctcctct tgcagtttgt gaagtgtatt acattttgta gctagtttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc 2053

```

<210> 70
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> 智人

```

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

```

<210> 71
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

```

<400> 71
cagggtgaagc tgcaggagtc tggcgcctgag ttgggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
tcttgcaagg cttctggcta catcttcaact gaccatgctc ttcactgggt gaggcagaag 120
cctgaacagg gcctggaatg gattgggtat atttttcccg gaaatggtaa tattgagtac 180

```

[0040]

```

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag tactgcctac 240
atgcagctca acagcctgac atctggagat tctgcaatgt atttctgtaa aaagalggac 300
tactggggcc aaggaccac ggtcaccgtc tectca 336

```

<210> 72
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

```

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

```

<210> 73
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

```

<400> 73
caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
tectgaagg cttctgggta caccctcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagaag 120
cctggacagg gcctagaatg gattggatat cttttcccg gaaatggtaa tttgaaat 180
aatgagaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
atgcacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaagatggac 300
tactggggcc aaggaccac ggtcaccgtc tectca 336

```

<210> 74
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

```

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

```

<210> 75
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

```

<400> 75
caggctcagc tgcagcagtc cgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
tctgcaggg cttctgggta caccctcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagcag 120
cctggccagg gcctggaatg gatcggaatg attttcccg gaaatggaaa tattgaatac 180
aatgacaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccgg cactgcctac 240

```

[0041]

atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300
tactgggggc aaggaacctc agtcaccgtc tcctca 336

<210> 76
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 77
<211> 336
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 77
caggtcaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
tcttgcgaagg cttctggcta cacccttact gaccattcta ttacttgggt gaagcagaag 120
cctggacagg gcttagaatg gattggatat ctttttcccg gaaatggtaa ttttgagtac 180
aatgaaaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgtctac 240
atgtacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300
tactgggggc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

<210> 78
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 79
<211> 336
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 79
caggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcttgcgaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaggcaa ggccctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240

[0042]


```

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaatggac 300
tactggggcc aagggaaccac ggtcaccgtc tectca 336

```

<210> 80
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

```

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

```

<210> 81
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

```

<400> 81
caggtaaac tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcttgcagg cttctggata cacattcact aactatgta tacactgggt gaagcaaaaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaatggag 300
tactggggcc aagggaaccac ggtcaccgtc tectca 336

```

<210> 82
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

```

<400> 82
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20     25     30
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35     40     45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50     55     60
Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65     70     75     80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85     90     95
Ala Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100    105    110

```

<210> 83
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

```

<400> 83
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgcg gatctagtcg gagcattgta catagtaatg gaaacaccta ttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatctt acaaagtctt caaccgattt 180

```

[0043]

tctgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttctt 300
 cctacgttcc gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ct 342

<210> 84
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 84
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 Arg

<210> 85
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 85
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
 atcacatgtc gaacaactga aaatatattac agttattttg tatgggtctca gcagagacag 120
 ggaaaatctc ctcagctccg ggtctataat gcaaaatcct tagcagaagg tgtgccatca 180
 agtttcaatg tcagtgtatc aggcaacacag ttttctctga agatcaatag cctgcagcct 240
 gaagattttg ggacttatca ctgtcaacac cattatggta ctccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaggc tggaaataag acgg 324

<210> 86
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

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

<210> 87
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 87
 gatgttttg atgacccaaac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca accagettcc 60
 atctcttgc aagtccagtc gaggctctta tatactaattg gaaaaaccta ttgacttg 120

[0044]

```

ttattccag aggccaggcca gtctccaaaa cgcctaattc atctgggtgc tgaattggac 180
tctggagtc cctgacaggtt cagtggcagt ggctcaggga cagatttcac actggaaaac 240
accagagtg gagctgagga ttggggagtt tattactgct tgcagagtag acattttcca 300
ttcacgttc ggctcgggcac caagctggaa atcaaacgg 339

```

<210> 88
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

```

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

```

<210> 89
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

```

<400> 89
gatgttgta tgacccaaac tccactcact ctgtcggtag ccattggaca accagcgttc 60
atctcttgca agtccagta gagcctclll aacactaatg gcaaaaccta ttgacttgg 120
ttaattcaga ggccaggcca gtctccacag cgctgatct atctgggtgc caaattggac 180
tctggcgctc cggacaggtt cagtggcagt ggctcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagagtag aggtgagga tctgggagtt tattactgcc tgcagagtag ccatittccg 300
tttacgttcg gctcgggcac caagctggaa atcaaacgg 339

```

<210> 90
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

```

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

```

<210> 91
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 91

[0045]

```

gatgttgtgc taactcagtc tctgtccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtcagt 60
ctttcctgca gggccagcca aaatatggc aactacctac actggtatca acagaaatca 120
catgagtcctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatccctcc 180
aggttcagtg gcagtggatc agtcacagat ttactctca atatcaacag tgtggagact 240
gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtgacacct ggctctcac gttcgggtgt 300
gggaccaagc lggagctgaa acgggct 327

```

<210> 92

<211> 108

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 92

```

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

```

<210> 93

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 93

```

Thr Phe Thr Asp His Ser Ile His
 1              5

```

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 94

```

Thr Phe Thr Asn Tyr Val Ile His
 1              5

```

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 95

```

Ile Phe Thr Asp His Ala Leu His
 1              5

```

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 96

```

Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Asp Lys Phe Lys
 1              5              10              15
Gly

```

[0046]

<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 98
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 100
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 100
Lys Arg Met Gly Tyr
1 5

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 101
Lys Lys Met Asp Tyr
1 5

<210> 102
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 102
Ala Arg Met Asp Tyr
1 5

<210> 103
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

[0047]

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

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 105
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 105
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 106
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 106
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 110
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 110

[0048]

Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser
1 5

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 111
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 115
Leu Gln Ser Ala His Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

[0049]

1	5
<210> 118	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> 小家鼠	
<400> 118	
Asp His Ser Ile His	
1	5
<210> 119	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> 小家鼠	
<400> 119	
Asn Tyr Val Ile His	
1	5
<210> 120	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> 小家鼠	
<400> 120	
Asp His Ala Leu His	
1	5
<210> 121	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 小家鼠	
<400> 121	
Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu	
1	5
<210> 122	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 小家鼠	
<400> 122	
Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu	
1	5
<210> 123	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 小家鼠	
<400> 123	
Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys	
1	5
<210> 124	
<211> 11	
<212> PRT	
<213> 小家鼠	
<400> 124	
His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
1	5 10

[0050]

<210> 125
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 125
 Ser Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 126
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 126
 Glu Asn Ile Tyr Ser
 1 5

<210> 127
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 127
 Thr Ser Gly Tyr Ser
 1 5

<210> 128
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 128
 Gln Asp Ile Lys Ser
 1 5

<210> 129
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 129
 Gln Asn Ile Gly Asn
 1 5

<210> 130
 <211> 911
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重靶向内肽酶

<400> 130
 Ile Ser Glu Phe Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr
 1 5 10 15
 Lys Asp Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn
 20 25 30
 Ala Gly Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile
 35 40 45
 Trp Val Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp
 50 55 60
 Leu Asn Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp
 65 70 75 80

[0051]

Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Glu	Lys	Asp	Asn	Tyr	Leu	Lys	Gly
				85					90					95	
Val	Thr	Lys	Leu	Phe	Glu	Arg	Ile	Tyr	Ser	Thr	Asp	Leu	Gly	Arg	Met
			100					105					110		
Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Val	Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Trp	Gly	Gly	Ser	Thr
		115					120					125			
Ile	Asp	Thr	Glu	Leu	Lys	Val	Ile	Asp	Thr	Asn	Cys	Ile	Asn	Val	Ile
	130					135					140				
Gln	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr	Arg	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Val	Ile	Ile
145					150					155				160	
Gly	Pro	Ser	Ala	Asp	Ile	Ile	Gln	Phe	Glu	Cys	Lys	Ser	Phe	Gly	His
			165						170					175	
Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Thr	Arg	Asn	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Tyr	Ile
			180					185					190		
Arg	Phe	Ser	Pro	Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Phe	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Val
	195						200					205			
Asp	Thr	Asn	Pro	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Lys	Phe	Ala	Thr	Asp	Pro	Ala
	210				215						220				
Val	Thr	Leu	Ala	His	Glu	Leu	Ile	His	Ala	Gly	His	Arg	Leu	Tyr	Gly
225					230					235				240	
Ile	Ala	Ile	Asn	Pro	Asn	Arg	Val	Phe	Lys	Val	Asn	Thr	Asn	Ala	Tyr
			245					250					255		
Tyr	Glu	Met	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Ser	Phe	Glu	Glu	Leu	Arg	Thr	Phe
		260						265					270		
Gly	Gly	His	Asp	Ala	Lys	Phe	Ile	Asp	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn	Glu	Phe
	275					280					285				
Arg	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Lys	Phe	Lys	Asp	Ile	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn
	290				295						300				
Lys	Ala	Lys	Ser	Ile	Val	Gly	Thr	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Tyr	Met	Lys
305					310					315				320	
Asn	Val	Phe	Lys	Glu	Lys	Tyr	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Gly	Lys
			325					330					335		
Phe	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Lys	Met	Leu	Thr
		340						345					350		
Glu	Ile	Tyr	Thr	Glu	Asp	Asn	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Lys	Val	Leu	Asn
	355					360						365			
Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Lys	Ile	Asn	Ile
	370				375						380				
Val	Pro	Lys	Val	Asn	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn
385					390					395				400	
Thr	Asn	Leu	Ala	Ala	Asn	Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn
			405					410					415		
Met	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu	Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Tyr
		420						425				430			
Lys	Leu	Leu	Cys	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu
	435					440						445			
Ile	Glu	Gly	Arg	Phe	Gly	Gly	Phe	Thr	Gly	Ala	Arg	Lys	Ser	Ala	Arg
	450				455					460					
Lys	Arg	Lys	Asn	Gln	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
465					470					475				480	
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Gln	Cys	Ile	Lys	Val
			485					490				495			
Asn	Asn	Trp	Asp	Leu	Phe	Phe	Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Asn
		500						505				510			
Asp	Leu	Asn	Lys	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Asn	Ile	Glu	Ala
	515					520						525			
Ala	Glu	Glu	Asn	Ile	Ser	Leu	Asp	Leu	Ile	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Thr
	530					535					540				
Phe	Asn	Phe	Asp	Asn	Glu	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser
545					550					555				560	
Ser	Asp	Ile	Ile	Gly	Gln	Leu	Glu	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe
			565					570				575			
Pro	Asn	Gly	Lys	Tyr	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	
		580				585					590				
Leu	Arg	Ala	Gln	Glu	Phe	Glu	His	Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr
	595					600					605				
Asn	Ser	Val	Asn	Glu	Ala	Leu	Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe
	610				615					620					
Phe	Ser	Ser	Asp	Tyr	Val	Lys	Lys	Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala
625					630					635				640	
Met	Phe	Leu	Gly	Trp	Val	Glu	Gln	Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu

[0052]

```

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

```

<210> 131
 <211> 904
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重靶向内肽酶

```

<400> 131
Met Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro
1          5          10          15
Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln
20          25          30
Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile
35          40          45
Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro
50          55          60
Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr
65          70          75          80
Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys
85          90          95
Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr
100         105         110
Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr
115         120         125
Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp
130         135         140
Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser
145         150         155         160
Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu
165         170         175
Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser
180         185         190
Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn
195         200         205
Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu

```

[0053]

210	215	220
Ala His Glu Leu Ile	His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile	
225	230	235
Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met		240
	245	250
Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His		255
	260	265
Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr		270
	275	280
Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys		285
	290	295
Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe		300
305	310	315
Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val		320
	325	330
Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr		335
	340	345
Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr		350
	355	360
Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys		365
	370	375
Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu		380
385	390	395
Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe		400
	405	410
Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu		415
	420	425
Cys Val Asp Gly Gly Gly Gly Ser Ala Asp Asp Asp Asp Lys Gly Trp		430
	435	440
Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Lcu Leu Gly Pro His Ala Val Ala Leu		445
	450	455
Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		460
465	470	475
Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe		480
	485	490
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu		495
	500	505
Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu		510
	515	520
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro		525
	530	535
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu		540
545	550	555
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu		560
	565	570
Lcu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu		575
	580	585
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu		590
	595	600
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys		605
	610	615
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu		620
625	630	635
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr		640
	645	650
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala		655
	660	665
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu		670
	675	680
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala		685
	690	695
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys		700
705	710	715
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu		720
	725	730
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys		735
	740	745
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu		750
	755	760
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn		765
	770	775
		780

[0054]

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

<210> 132
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

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

<210> 133
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 133
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 134
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 134
 Ala Arg Met Gly Tyr
 1 5

<210> 135
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 135

[0055]

Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 136
<211> 349
<212> PRT
<213> 智人

<400> 136
Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Trp Pro
1 5 10 15
Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
20 25 30
Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
35 40 45
Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
50 55 60
Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
65 70 75 80
Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
85 90 95
Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
100 105 110
Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
115 120 125
Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
130 135 140
Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp
145 150 155 160
Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu
165 170 175
Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro
180 185 190
Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly
195 200 205
Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu
210 215 220
Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala
225 230 235 240
Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Val Phe
245 250 255
Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe
260 265 270
Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala
275 280 285
His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala
290 295 300
Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys
305 310 315 320
His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu Asn Lys Ser
325 330 335
Arg Ile Asp Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val
340 345

<210> 137
<211> 349
<212> PRT
<213> 智人

<400> 137
Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Trp Pro
1 5 10 15
Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
20 25 30
Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
35 40 45
Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
50 55 60
Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala

[0056]

```

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

```

<210> 138
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 138
Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Cys Pro
1      5      10      15
Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
20     25     30
Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
35     40     45
Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
50     55     60
Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
65     70     75     80
Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
85     90     95
Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
100    105    110
Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
115    120    125
Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
130    135    140
Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp
145    150    155
Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu
165    170    175
Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro
180    185    190
Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly
195    200    205
Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu
210    215    220

```

[0057]

```

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

```

<210> 139

<211> 387

<212> PRT

<213> 智人

<400> 139

```

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

```

[0058]

370 375 380
 Asp Val Ala
 385

<210> 140
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> 智人

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

<210> 141
 <211> 1050
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 141
 atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gcccccgcc 60
 cggagcccg gcccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtgggtgttc 120
 ggccctgatct tcgcgtggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcacct gctggcgcgc 180
 agcaagccgg gcaagccgcg gacaccacc aacctgttca tcctcaacct gacatcgcc 240
 gacctggcct acctgtcttt ctgcattccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300
 tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360

[0059]

```

gtgagcatct tcacctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420
cggcgtctct cctccctcag gggtgcccgc aacgcgctgc tggcgctggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctgcgccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgc 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctgccacaa gaaggcctac 600
gtgggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtcgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagtctct gtggtggttg tgggttttgg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag tttcccgct gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaaa gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

```

<210> 142
 <211> 1050
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 142
atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gcccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgtggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcacctg gctggcgcgc 180
agcaagcccg gcaagcccg gagcaccacc aacctgttca tctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgtg 360
gtgagcatct tcacctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420
cggcgtctct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tggcgctggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctgcgccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgc 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctgccacaa gaaggcctac 600
gtgggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtcgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagtctct gtggtggttg tgggttttgg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag tttcccgct gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaaa gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa gtaaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

```

<210> 143
 <211> 1050
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 143
atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctgtccgga gcccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgtggg cgtgctgggc aacagcctag tgatcacctg gctggcgcgc 180
agcaagcccg gcaagcccg gagcaccacc aacctgttca tctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgtg 360
gtgagcatct tcacctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420
cggcgtctct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tggcgctggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctgcgccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgc 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctgccacaa gaaggcctac 600
gtgggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtcgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagtctct gtggtggttg tgggttttgg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag tttcccgct gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaaa gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

```

<210> 144
 <211> 1164
 <212> DNA
 <213> 智人

[0060]

```

<400> 144
atgaacgtct cgggctgccc aggggcccggg aacgcgagcc aggcgggaggc cgggggaggc 60
tggcaccgcc aggcgggtcat cgtgcccctg ctcttcgcgc tcalcllccct cgtgggcacc 120
gtgggcaaca cgtggtgctt ggccgtgctg ctgcgcggcg gccaggcggl cagcactacc 180
aacctgttca tccttaacct gggcgtggcc gacctgtgtt tcattcctgt ctgcglgccc 240
ttccaggcca ccatctacac cctggaacgc tgggtgttcg gctcgtgctg gtgcaaggcg 300
gtgcacttcc tcattcttct caccatgcac gccagcagct tcacgctggc cgcgctctcc 360
ctggacaggt atctggccat ccgctacccg ctgcactccc gcgagctgcg cacgcctcga 420
aacgcgctgg cagccatcgg gctcatctgg gggtgttcg tgctcttctc cgggccctac 480
ctgagctact accgccagtc gcagctggcc aacctgaccg tgtgccatcc cgcgtggagc 540
gccctcgcgc gccgcgccat ggacatctgc accttcgtct tcagctacct gcttctctgt 600
ctggttctcg gctgacctc cgcgcgcacc ttgcgctacc tctggcgccg cgtcgaccgc 660
gtggccgcgg gctcgggtgc ccggcgccgc aagcgcaagg tgacacgcat gatcctcctc 720
gtggccgcgc tcttctgcct ctgctggatg cccaccacg cgtcctcctc ctgcgtgtgg 780
ttcgccagct tcccgctcac gcgcgccact tatgcgttc gcctcctctc gcacctgtgc 840
tcctacgcc aactcctcgt caaccctatc gtttacgcgc tggctctcaa gcacttccgc 900
aaaggcttcc gcacgatctg cgcgggcctg ctgggcccgt cccaggccg agcctcgggc 960
cgtgtgtgct ctgcgcgcgc gggcaccac agtggcagcg tgttggagcg cagctcagc 1020
gacctgttgc acatgagcga ggccggcggg gcccttcgtc cctgccccgg cgttccccag 1080
ccatgcatcc tcgagccctg tcctggcccc tcclggcagg gcccaaaggc aggcgacagc 1140
atcctgacgg ttgatgtggc ctga 1164

```

```

<210> 145
<211> 1107
<212> DNA
<213> 智人

```

```

<400> 145
atggctgatg cccagaacat ttacttgac agcccaggga gtgtgggggc cgtggcagtg 60
ctgttggtct ttgccctaatt ctctctgctg ggcacagtgg gcaatgggct ggtgctggca 120
gtgctctctg agcctggccc gactgcctgg caggagcctg gcagcaccac ggacctgttc 180
atcctcaacc tggcggtggc tgacctctgc ttcatcctgt gctgcgtgcc ctccaggccc 240
accatctaca cgttggatgc ctggtctttt ggggccctcg tctgaaggc cgtgcacctg 300
ctcalclacc tcacctgta gccagcagc ttacgctgg ctgctgtctc cgtggacagg 360
tacctggcgc tgggcacccc gcgcgctcg cgcgccctgc gcagcccgcg taacgccgcg 420
gccgcagtg ggctgtgtgt gctgctggcg gcgctcllcl cggcgcccta cctcagctac 480
tacggcaccg tgcgtacagg cgcgctggag ctctgcgtgc ccgctggga ggacgcgcgc 540
cgcgcgcgc tggacgtggc cacttcgct gccggtacc tgcgtcccg ggctgtgggtg 600
agcctggcct agggcgcac gctgcgttc ctgtgggccc cgtgggtcc cgcggcgcg 660
ggcgcgccg aggcgcggcg gagggcgacg ggccgcgcgg gcgcgccat gctggcggtg 720
gccgcgctct acgcgctctg ctggggtcgg caccacgcgc tcattcctgt ctctgtgtac 780
ggccgcttcg ccttcagccc ggccacctac gcctgccgccc tggcctcaca ctgcctggcc 840
tacgccaact cctgcctcaa cccgctcgtc tacgcgctcg cctcgcgcca ctccgcgcg 900
cgttccgcc gcctgtggcc gtgcggcgcg cgacgcgcgc accgtgcccg ccgcgccttg 960
cgtcgcgtcc gccccgcgtc ctggggccca cccggtgccc ccggagagcg ccggcctagc 1020
gggaggctgc tggctggtgg cggccagggc cggagacca gggagggacc cgtccacggc 1080
ggagaggctg cccgaggacc ggaataa 1107

```

```

<210> 146
<211> 889
<212> PRT
<213> 人.序列

```

```

<220>
<223> LHN/A片段

```

```

<221> VARIANT
<222> (153)... (455)
<223> Xaa为任何氨基酸
<400> 146

```

```

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

```

[0061]

65	Asp	Asn	Glu	Lys	Asp	Asn	Tyr	Leu	Lys	Gly	Val	Thr	Lys	Leu	Phe	Glu	80
					85					90						95	
Arg	Ile	Tyr	Ser	Thr	Asp	Leu	Gly	Arg	Met	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Val		
			100					105						110			
Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Trp	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Asp	Thr	Glu	Leu	Lys		
		115				120					125						
Val	Ile	Asp	Thr	Asn	Cys	Ile	Asn	Val	Ile	Gln	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr		
		130				135					140						
Arg	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Val	Ile	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Asp	Ile		
		145				150				155					160		
Ile	Gln	Phe	Glu	Cys	Lys	Ser	Phe	Gly	His	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Thr		
			165						170					175			
Arg	Asn	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Tyr	Ile	Arg	Phe	Ser	Pro	Asp	Phe		
			180					185					190				
Thr	Phe	Gly	Phe	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Asp	Thr	Asn	Pro	Leu	Leu		
		195					200					205					
Gly	Ala	Gly	Lys	Phe	Ala	Thr	Asp	Pro	Ala	Val	Thr	Leu	Ala	His	Glu		
		210				215					220						
Leu	Ile	His	Ala	Gly	His	Arg	Leu	Tyr	Gly	Ile	Ala	Ile	Asn	Pro	Asn		
		225				230				235					240		
Arg	Val	Phe	Lys	Val	Asn	Thr	Asn	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Met	Ser	Gly	Leu		
			245						250					255			
Glu	Val	Ser	Phe	Glu	Glu	Leu	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	His	Asp	Ala	Lys		
			260					265					270				
Phe	Ile	Asp	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn	Glu	Phe	Arg	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Asn		
		275					280					285					
Lys	Phe	Lys	Asp	Ile	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn	Lys	Ala	Lys	Ser	Ile	Val		
		290				295					300						
Gly	Thr	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Tyr	Met	Lys	Asn	Val	Phe	Lys	Glu	Lys		
		305				310				315					320		
Tyr	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Gly	Lys	Phe	Ser	Val	Asp	Lys	Leu		
			325						330					335			
Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Lys	Met	Leu	Thr	Glu	Ile	Tyr	Thr	Glu	Asp		
			340					345					350				
Asn	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Lys	Val	Leu	Asn	Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn		
		355					360					365					
Phe	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Lys	Ile	Asn	Ile	Val	Pro	Lys	Val	Asn	Tyr		
		370				375					380						
Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn	Thr	Asn	Leu	Ala	Ala	Asn		
		385				390				395					400		
Phe	Asn	Gly	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Asn	Asn	Met	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu		
			405						410					415			
Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu	Leu	Cys	Val	Arg		
			420					425					430				
Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Asn		
		435					440					445					
Leu	Tyr	Phe	Gln	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Lys	Gly	Tyr		
		450				455				460							
Asn	Lys	Ala	Phe	Asn	Asp	Leu	Cys	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Trp	Asp	Leu		
		465			470					475					480		
Phe	Phe	Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Asn	Phe	Thr	Asn	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly		
				485					490					495			
Glu	Glu	Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn	Ile		
		500						505					510				
Ser	Leu	Asp	Leu	Ile	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe	Asp	Asn		
		515					520					525					
Glu	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly		
		530				535					540						
Gln	Leu	Glu	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys	Lys		
		545			550					555					560		
Tyr	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	Leu	Arg	Ala	Gln	Glu		
			565						570					575			
Phe	Glu	His	Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn	Ser	Val	Asn	Glu		
		580						585					590				
Ala	Leu	Leu	Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Asp	Tyr		
		595					600					605					
Val	Lys	Lys	Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Met	Phe	Leu	Gly	Trp		
		610				615					620						
Val	Glu	Gln	Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Thr	Ser	Glu	Val	Ser		
		625				630				635					640		

[0062]

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

<210> 147
 <211> 2661
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> LHn/A片段

<400> 147
 atgccgttgc taaacaaaca gtccaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
 tatatcaaaa tcccgaatgc gggtaaatg cagcccgta aagcatttaa aatccataac 120
 aaaatttggg tgatcccgga gcgcgatacg tlcacgaacc cggaagaagg agattttaac 180
 ccaccgctg aggctaaaca ggtcccggtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
 gacaatgaaa aggacaacia cctgaaaggt gttaccaaac tgttcgagcg cattttatcg 300
 acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgcgcg gcattccgtt ttgggggtgg 360
 agcaccatcg atacagaact caaagtgtat gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
 gatgggagct accgggtccga agagcttaac ctctgtaata ttggcccgag cgcggatatt 480
 atccaattcg aatgtaaatc ttttgggcat gaagtcctga atctgacgcg gaatggctat 540
 ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttccat ttggatttga agaaagcctc 600
 gaagttagata cgaacctctt ttttagcgcg ggaaaattcg cgacggaccc agcggtgacc 660
 ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgttctgtat gaatcgccat taacccgaac 720
 cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgtat tacgagatgt cggccttaga agtgtccttt 780
 gaagaactgc gcacgtttgg cggtcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaac 840
 gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
 aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaaa 960
 tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
 ctgtataaaa tgcacaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaat ctccaaggte 1080
 ttgaatcgga aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
 aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
 tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac algaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
 ggcttggttg aattctataa gctcciglgc gtccgcggtg ttatcaccag caaaaccaaa 1320
 tccttgggcg gtggtggcga aaacctgtac ttccagggcg gtggcggtgg tgataaggcg 1380
 tataacaagg ccttcaatga tttatgcac aaggtgaaca actgggactt gtttttctct 1440
 ccatttgaa ataatcttac taacgacttg aacaaaggag aggaatttac ttccgatacc 1500
 aacatcgaa cagcgggaaga gaatttagt ctgagatcta ttcaacaata ttacctgacc 1560
 tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcacc 1620
 ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgttttctta atggaaagaa atatgaattg 1680

[0063]

```

gacaaataca ccatgttcca ctatctccgc gcgcaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
attgctctga ccaattcggg aaacgaagcc cttttaaatc cttcgcgtgt gtacaccttt 1800
tttcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gtttttgga 1860
tgggtggaac aactggtata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920
aaaattgccg atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgcactgaa cattggtaac 1980
atgctgtata aagatgattt lglggcgccc ctgactcttt caggcgctgt taccctgctg 2040
gaatttatcc cggaaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgcgctggt gtcctatatc 2100
gcaaacaag ttttgactgt ccagacgacg gacaacgcgc tcagtaaacg taacgaaaaa 2160
tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaaa caccagatt 2220
gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280
attatcaact atcaalataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caacttcaac 2340
atcgacgact tatcttcaaa gctgaatgaa tctatlaaca aagcgatgat taatattaac 2400
aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacggtgtg 2460
aaacgtctgg aagacttcca tgcaagcctt aaagatgccc ttctgaagta tatttacgat 2520
aatcgcgga cttctatttg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580
agtacagaca tcccttttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgctt gctgtccacg 2640
caccatcacc atcaccacia a 2661

```

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ORL-1正向寡核苷酸引物

<400> 148

cactcggctg gtgctgggtg

20

<210> 149

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ORL-1反向寡核苷酸引物

<400> 149

aatggccacg gcagttctgc

20

<210> 150

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 甘丙肽受体1正向寡核苷酸引物

<400> 150

cccatcatg tcatccacct

20

<210> 151

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 甘丙肽受体1反向寡核苷酸引物

<400> 151

atggggttca ccgaggagtt

20

<210> 152

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0064]

<223> 甘丙肽受体2正向寡核苷酸引物

<400> 152

catcgtggcg gtgctttt

18

<210> 153

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 甘丙肽受体2反向寡核苷酸引物

<400> 153

agcgggaagc gaccaaac

18

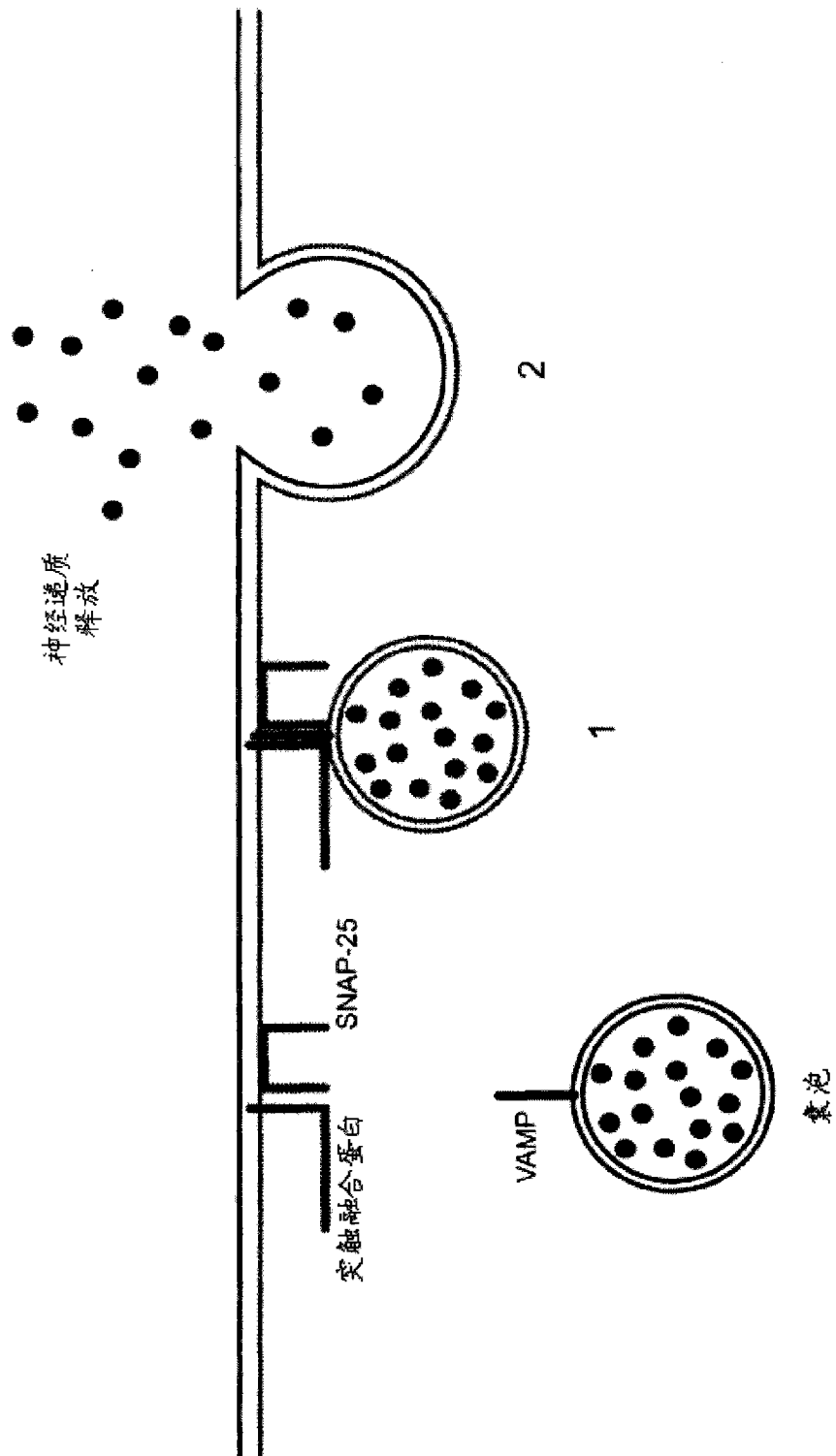


图 1A

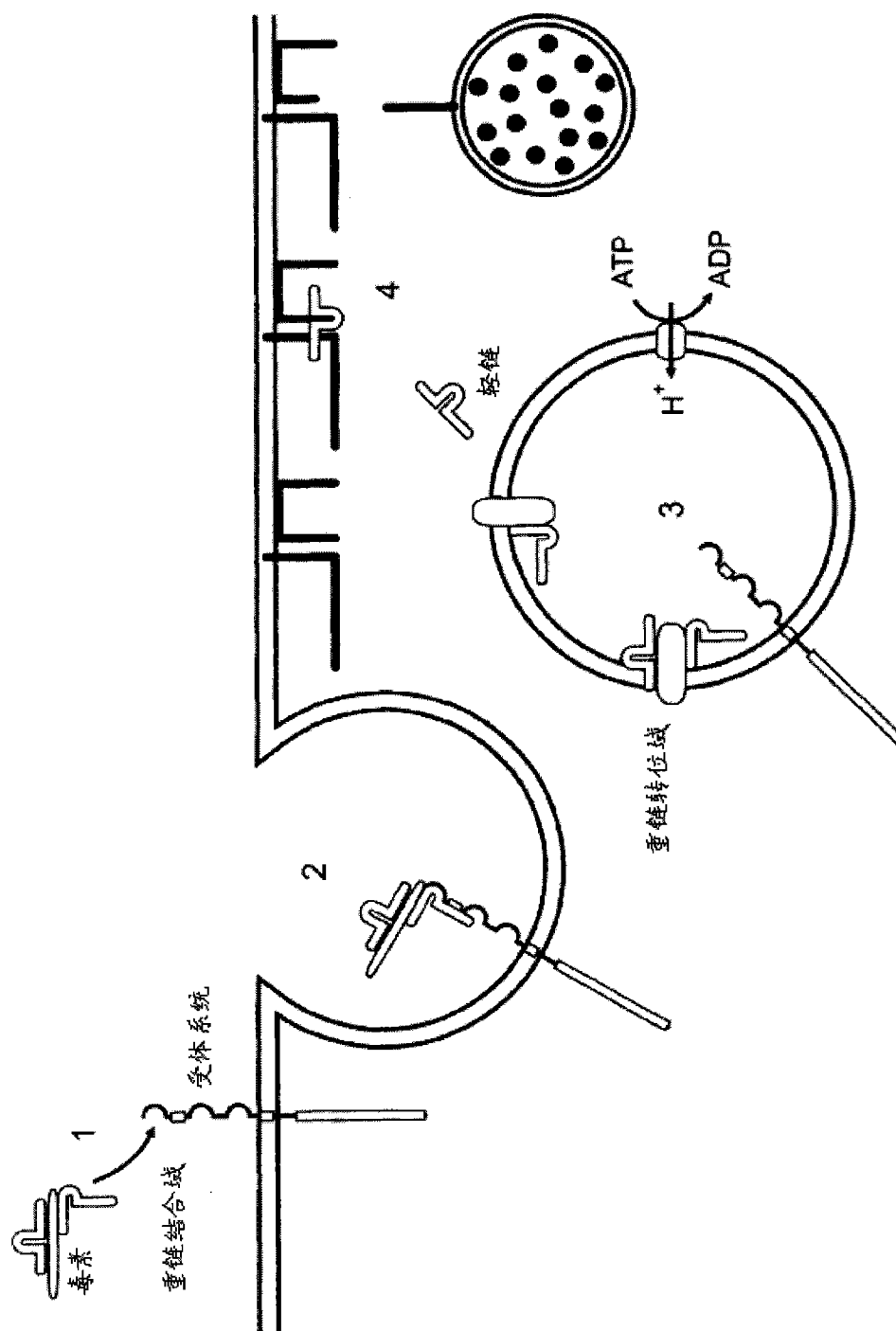


图 1B

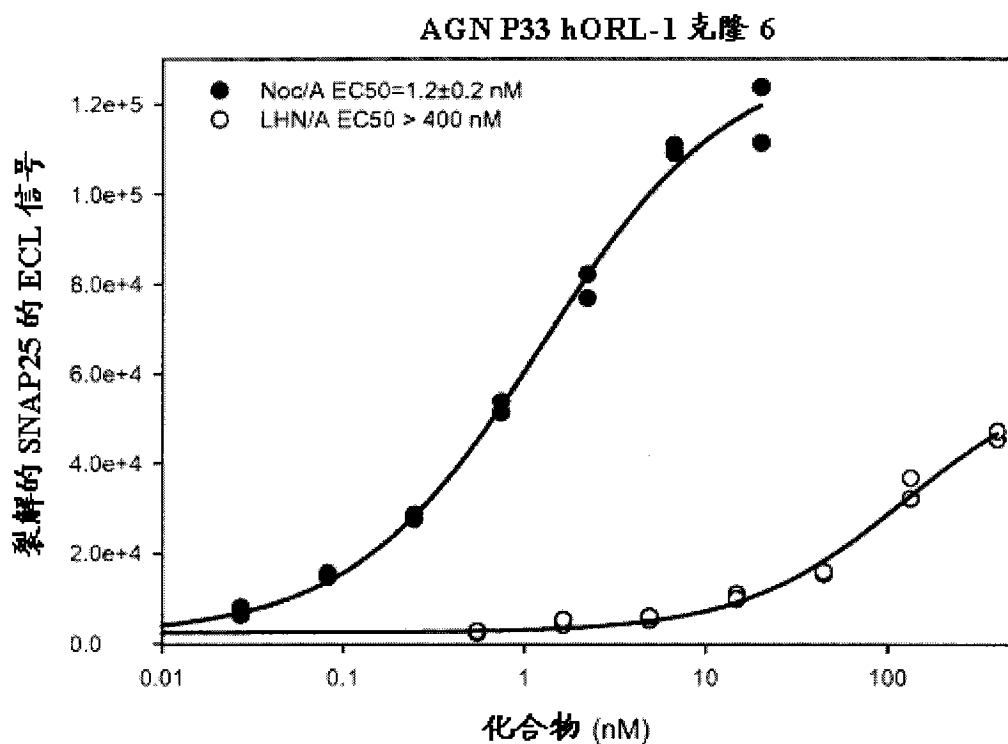


图 2

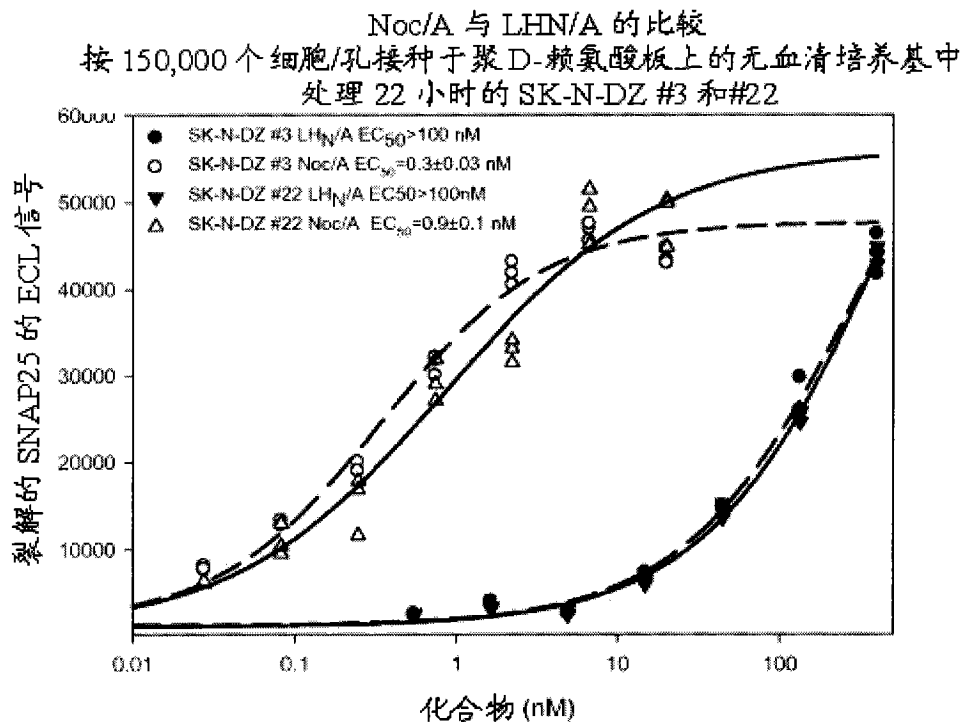


图 3

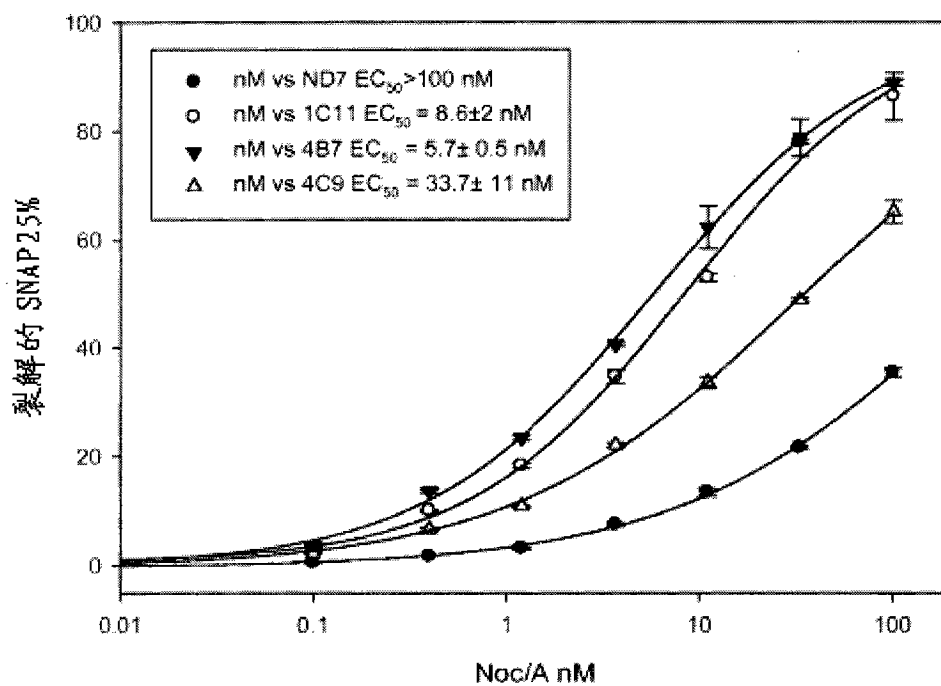


图 4

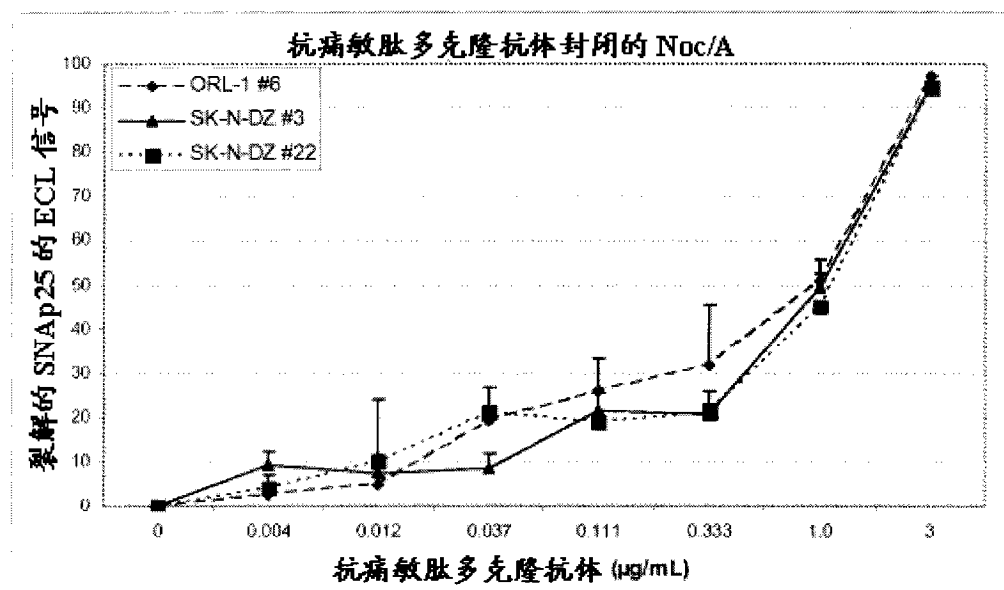


图 5

I

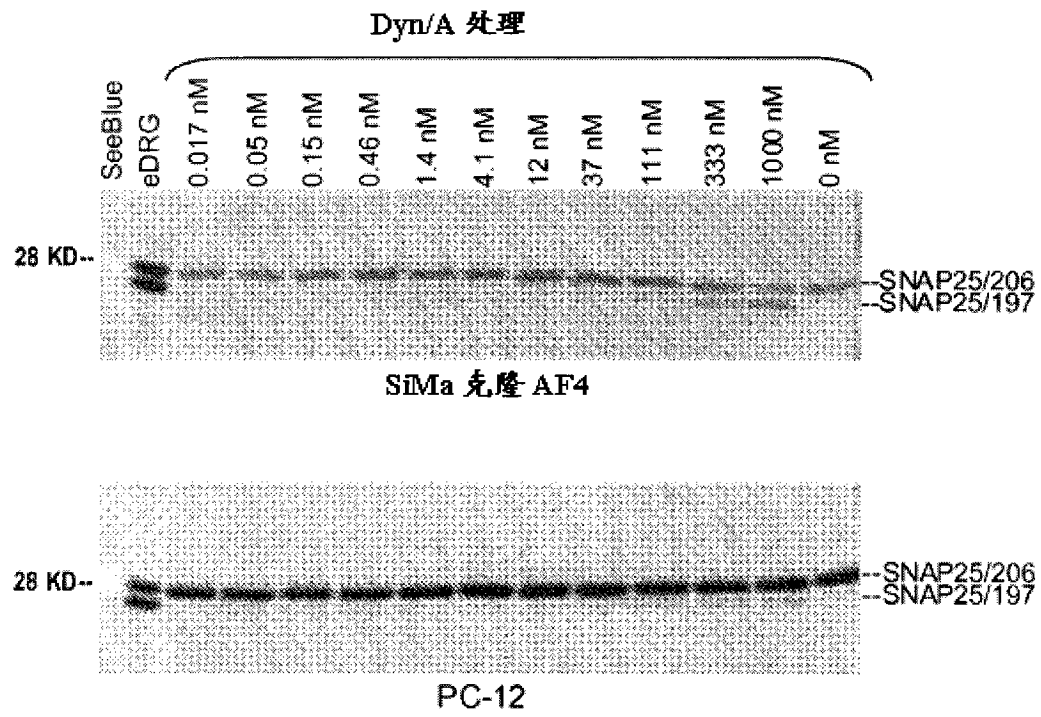


图 6

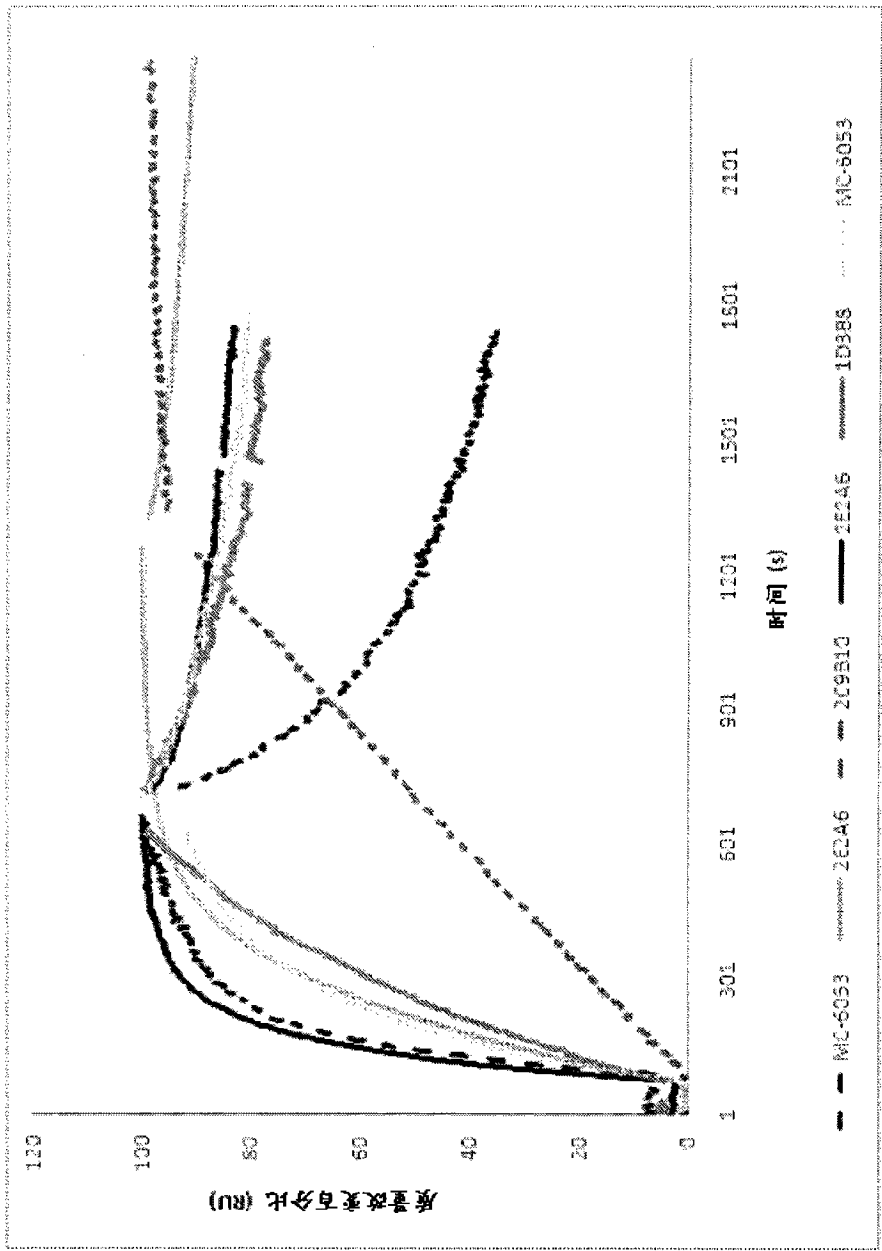


图 7A

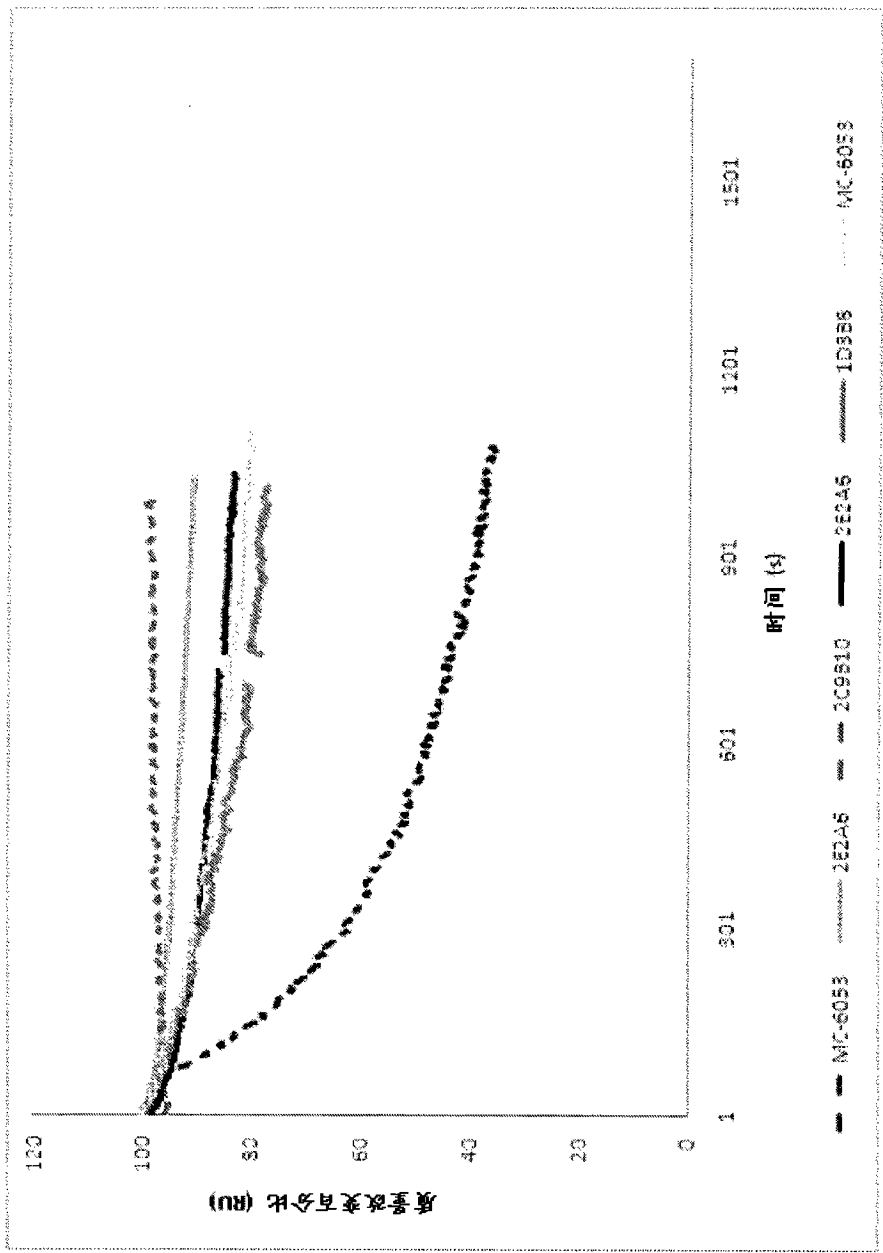


图 7B