

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011140251/15, 12.03.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.03.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.03.2009 US 61/160,217

(43) Дата публикации заявки: 20.04.2013 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 10.03.2015 Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: JONES R.G.A. et al. Development of improved SNAP25 endopeptidase immunoassays for botulinum type A and E toxins. Journal of Immunological Methods. 2008 Jan 1; 329 (1-2): 92-101. WO 95/33850 A1, 14.12.1995. US 20050100973 A1, 12.05.2005. RU 2230325 C2, 10.06.2004

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 13.10.2011

(86) Заявка РСТ:
US 2010/027244 (12.03.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/105236 (16.09.2010)

Адрес для переписки:

191002, Санкт-Петербург, а/я 5, Общество с ограниченной ответственностью "Ляпунов и партнеры"

(72) Автор(ы):

ВАНГ Джоанн (US),
ЖУ Хонг (US),
ХОДЖЕС Д. Дайана (US),
ФЕРНАНДЕС-САЛАС Эстер (US)

(73) Патентообладатель(и):

Аллерган, Инк. (US)

(54) ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ НА АКТИВНОСТЬ ЭНДОПЕПТИДАЗ С ИЗМЕНЕННОЙ НАЦЕЛЕННОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью. Способ по изобретению включает этап обработки клетки из стабильной клеточной линии образцом, содержащим эндопептидазу с измененной нацеленностью, выделения из обработанной клетки компонента SNAP-25, содержащего

продукт расщепления SNAP-25₁₉₇, карбоксильный конец которого соответствует остатку R₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, осуществление контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, иммобилизованным на твердофазной подложке, и детектирование присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25

антитело и продукт расщепления SNAP-25₁₉₇.
Детектирование продукта расщепления SNAP-25₁₉₇ с помощью указанного комплекса антитело-антиген является показателем того, что

эндопептидаза с измененной нацеленностью активна. Изобретение обеспечивает эффективное детектирование активности эндопептидаз с измененной нацеленностью. 5 з.п. ф-лы, 9 ил., 33 табл., 17 пр.

R U 2 5 4 3 6 5 0 C 2

R U 2 5 4 3 6 5 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011140251/15, 12.03.2010**

(24) Effective date for property rights:
12.03.2010

Priority:

(30) Convention priority:
13.03.2009 US 61/160,217

(43) Application published: **20.04.2013** Bull. № 11

(45) Date of publication: **10.03.2015** Bull. № 7

(85) Commencement of national phase: **13.10.2011**

(86) PCT application:
US 2010/027244 (12.03.2010)

(87) PCT publication:
WO 2010/105236 (16.09.2010)

Mail address:

**191002, Sankt-Peterburg, a/ja 5, Obshchestvo s
ogranichennoj otvetstvennost'ju "Ljapunov i
partnery"**

(72) Inventor(s):

**VANG Dzhoann (US),
ZhU Khong (US),
KhODZhES D. Dajana (US),
FERNANDES-SALAS Ehster (US)**

(73) Proprietor(s):

Allergan, Ink. (US)

(54) **TARGET-MODIFIED ENDOPEPTIDASE ACTIVITY IMMUNOASSAYS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine and aims at detecting target-modified endopeptidase activity. A method according to the invention involves the stage of processing a cell of a stable cell line with a sample containing target-modified endopeptidase, recovering SNAP-25 component containing SNAP-25₁₉₇ splitting product a carboxyl terminal of which correlates with P₁ residue of a split bond in a BoNT/A-toxin restriction site, from the processed cell, contacting the SNAP-25

component and anti-SNAP-25 antibody immobilised on a solid-phase substrate, and detecting the presence of the antibody-antigen complex including the anti-SNAP-25 antibody and SNAP-25₁₉₇ splitting product. Detecting the SNAP-25₁₉₇ splitting product by the above antibody-antigen complex is indicative if the target-modified endopeptidase is active.

EFFECT: invention provides detecting the target-modified endopeptidase activity effectively.

6 cl, 9 dwg, 33 tbl, 17 ex

[01] Настоящая заявка на патент испрашивает приоритет в соответствии с §119(e) раздела 35 Свода законов США согласно предварительной заявке на патент США №61/160217, поданной 13 марта 2009 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

5 [02] Последовательности, охарактеризованные в настоящем описании, приведены в перечне последовательностей, поданном совместно с настоящей заявкой, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки.

[03] Способность токсинов клостридий, таких как, например, ботулинические нейротоксины (BoNT), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F и BoNT/G, и столбнячный нейротоксин (TeMT), ингибировать нейронную передачу сигнала находит широкое применение в терапии и косметологии, см., например, William J. Lipham, *Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin* (Slack, Inc., 2004). Токсины клостридий, коммерчески доступные в форме фармацевтических композиций, включают препараты BoNT/A, такие как, например, BOTOX[®] (Allergan, Inc., Ирвин, Калифорния), 10 DYSPORT[®]/RELOXIN[®] (Ipsen Ltd., Слай, Англия), PURTOX[®] (Mentor Corp., Санта-Барбара, Калифорния), XEOMIN[®] (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Франкфурт, Германия), NEURONOX[®] (Medy-Tox, Inc., Очанг-миеон, Южная Корея), BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Яньтай, Шаньдун, Китай); и препараты BoNT/B, такие как, например, 15 MYOBLOC[®]/NELROBLOC[®] (Solstice Neurosciences, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния). Например, BOTOX[®] в настоящее время одобрен в одной или нескольких странах для следующих показаний: ахалазия, мышечная спластичность у взрослых, анальные трещины, боль в спине, блефароспазм, бруксизм, шейная дистония, эссенциальный тремор, межбровные морщины или гиперкинетические лицевые морщины, 20 головная боль, гемифациальный спазм, гиперактивность мочевого пузыря, повышенное потоотделение, детский церебральный паралич, рассеянный склероз, миоклонические нарушения, носогубные морщины, спастическая дисфония, косоглазие и поражение VII нерва.

[04] Обработка токсином клостридий приводит к ингибированию высвобождения нейромедиаторов и нейропептидов путем нарушения процесса экзоцитоза, с помощью которого осуществляется секреция нейромедиаторов и нейропептидов в синаптическую щель. Фармацевтическая промышленность стремится расширить терапевтическое применение токсина клостридий за пределы нынешнего использования в качестве миорелаксанта и применять его для лечения заболеваний, связанных с сенсорными 25 нервами, таких как, например, различные виды хронической боли, нейрогенного воспаления и урогенитальных нарушений, а также других заболеваний, таких как, например, панкреатит. Один подход, используемый в настоящее время для расширения сферы применения способов лечения на основе токсина клостридий, включает модификацию токсина клостридий, в результате которой модифицированный токсин 30 обладает измененной нацеленностью по отношению к нервным или не относящимся к нервным клеткам, представляющим интерес. Эти молекулы, называемые эндопептидазами с измененной нацеленностью или белками-модуляторами направленного везикулярного экзоцитоза (TVEMP), осуществляют свое ингибирующее 35 действие в отношении экзоцитоза, используя рецептор-мишень, который присутствует на нервных или не относящихся к нервным клеткам-мишенях, представляющих интерес. Такое изменение специфичности по отношению к клеткам-мишеням достигается за счет замены природного домена связывания токсина клостридий на нацеливающий домен, который демонстрирует избирательную связывающую активность по отношению к 40

рецептору, отличному от рецептора токсина клостридий и присутствующему на нервных или не относящихся к нервным клеткам-мишенях, представляющих интерес. Такие модификации домена связывания приводят к тому, что молекула приобретает способность избирательно связывать рецептор, отличный от рецептора токсина клостридий и присутствующий на клетках-мишенях. Эндопептидаза с измененной нацеленностью способна связываться с рецептором-мишенью, перемещаться в цитоплазму и проявлять свой протеолитический эффект по отношению к комплексу SNARE нервных или не относящихся к нервным клеткам-мишеней, представляющих интерес.

[05] Одна группа эндопептидаз с измененной нацеленностью включает молекулы, имеющие домен связывания с опиоидными рецепторами. Эти эндопептидазы с измененной опиоидной нацеленностью включают домен связывания с опиоидными рецепторами, транслокационный домен токсина клостридий и ферментативный домен токсина клостридий. Неограничивающие примеры эндопептидаз с измененной опиоидной нацеленностью или опиоидно-TVEMP описаны, например, в Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патенте США 5989545; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, патенте США 7132259; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, патенте США 7244437; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, патенте США 7413742; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, патенте США 7415338; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, патенте США 7514088; Keith A. Foster, Fusion Proteins, публикации заявки на патент США 2008/0064092; Keith A. Foster, Fusion Proteins, публикации заявки на патент США 2009/0035822; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, публикации заявки на патент США 2009/0048431; Keith A. Foster, Non-Cytotoxic Protein Conjugates, публикации заявки на патент США 2009/0162341; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, публикации международной заявки WO 2005/023309; и Lance E. Steward, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells, публикации международной заявки WO 2008/008805; содержание каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[06] Одно из главных различий между эндопептидазами с измененной нацеленностью и токсинами клостридий заключается в том, что поскольку мотонейроны обычно не являются мишенями эндопептидаз с измененной нацеленностью, смертность, связанная с превышением дозы эндопептидаз с измененной нацеленностью, у млекопитающих значительно снижена или даже полностью исключена. Например, эндопептидазы с измененной опиоидной нацеленностью можно ввести в дозе, превышающей терапевтически эффективную дозу в 10000 раз без проявления свидетельств летальности, которая в данном случае является результатом пассивной диффузии молекулы, а не процесса интоксикации. Таким образом, эндопептидазы с измененной нацеленностью представляют собой нелетальные молекулы при любых практических применениях. Хотя это свойство отсутствия летальности имеет большие преимущества для применения в терапии, возникает проблема, связанная с производством, поскольку стандартным тестом на активность, используемым в производстве биопрепаратов на основе токсина клостридий, является биотест ЛД₅₀ на мышах, тест на летальность. S.S. Arnon et al., JAMA 285: 1059-1070 (2001). В настоящее время биотест ЛД₅₀ на мышах используется всеми производителями фармацевтической продукции для выражения активности их

препаратов на основе токсина клостридий. Фактически, единицы активности токсинов клостридий представляют собой единицы ЛД₅₀ у мышей. Однако, вследствие того, что эндопептидазы с измененной нацеленностью по существу нелегальны, биотест ЛД₅₀ на мышцах нельзя использовать для оценки активности этих молекул. Таким образом, простой, надежный, проверенный и приемлемый с точки зрения государственных органов тест на активность, позволяющий оценить надежность всех этапов, необходимых для поглощения эндопептидазы с измененной нацеленностью, имел бы значительную ценность.

[07] Согласно настоящей заявке предложены новые композиции, клетки и способы для оценки активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, подходящие для применения в различных отраслях промышленности, таких как, например, фармацевтическая и пищевая промышленность, с обеспечением связанных с этим преимуществ. Эти композиции, клетки и способы не предполагают использования живых животных или тканей, взятых у живых животных, но позволяют оценить все этапы, необходимые для действия эндопептидаз с измененной нацеленностью.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[08] На ФИГ.1 показана схема современной парадигмы высвобождения нейромедиатора и токсического действия токсина клостридий в центральном и периферическом нейроне. На ФИГ.1А показана схема механизма высвобождения нейромедиатора в центральном и периферическом нейроне. Процесс высвобождения можно описать как состоящий из двух этапов: 1) стыковки пузырька, при которой связанный с пузырьком белок SNARE пузырька, содержащего молекулы нейромедиатора, взаимодействует со связанными с мембраной белками SNARE, расположенными на плазматической мембране; и 2) высвобождения нейромедиатора, при котором пузырек сливается с плазматической мембраной и происходит экзоцитоз молекул нейромедиатора. На ФИГ.15 показана схема механизма токсического действия столбнячного и ботулинического токсинов в центральном и периферическом нейроне. Этот процесс интоксикации можно описать как состоящий из четырех этапов: 1) связывания рецептора, при котором токсин клостридий связывается с рецепторным комплексом клостридий и инициирует процесс интоксикации; 2) интернализации комплекса, при которой после связывания токсина происходит перенос пузырька, содержащего комплекс токсин/рецепторная система, в клетку путем эндоцитоза; 3) транслокации легкой цепи, при которой, как предполагают, имеет место множество событий, включая изменение рН внутри пузырька, формирование канала поры, включающего домен Н_N тяжелой цепи токсина клостридий, разделение легкой и тяжелой цепей токсина клостридий и высвобождение легкой цепи, и 4) ферментативной модификации мишени, при которой легкая цепь токсина клостридий протеолитически расщепляет свои субстраты-мишени SNARE, такие как, например, SNAP-25, VAMP или Syntaxin, таким образом предотвращая стыковку пузырька и высвобождение нейромедиатора.

[09] На ФИГ.2 показан полнодозовый ответ на эндопептидазу с измененной нацеленностью Noc/A в клональной клеточной линии ORL-1 Clone #6 с повышенной экспрессией ORL-1. Специфичное поглощение Noc/A можно наблюдать в клональной клеточной линии ORL-1 Clone #6, сверхэкспрессирующей ORL-1. Обработка Noc/A (LHN/A плюс вариант связывающего лиганда ноцицептина) и LHN/A (LC/A и Н_N без домена связывания), проведенная на клоне №6 стабильной клеточной линии ORL-1 в тесте методом твердофазного ИФА в модификации ECL на расщепленный SNAP-25₁₉₇,

продемонстрировала, что поглощение Noc/A является специфичным в этой клональной клеточной линии. Клональная клеточная линия также демонстрирует значительную чувствительность к Noc/A, характеризующуюся значением EC_{50} , равным 1,2 нМ.

5 [010] На ФИГ.3 показан полнодозовый ответ на Noc/A в клонах №3 и №22 SK-N-DZ, полученных из одной клетки. Специфичное поглощение Noc/A в клонах №3 и №22 SK-N-DZ по сравнению с LH_N/A ($n=4$ проведенных независимых эксперимента). Клетки
 10 рассеивали на 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином, в СБС RPMI+N2+B27+NGF. Обработка веществами длилась 22 часа. Тест методом твердофазного ИФА в модификации ECL на расщепленный SNAP-25₁₉₇ продемонстрировал, что поглощение
 15 Noc/A является специфичным в этих клональных клеточных линиях. Клональные клеточные линии также демонстрируют значительную чувствительность к Noc/A, характеризующуюся значением EC_{50} , равным 0,3 нМ для клона №3 и 0,9 нМ для клона №22.

15 [011] На ФИГ.4 показаны результаты анализа "сэндвич"-методом твердофазного ИФА в модификации ECL на клонах 1C11, 4 B7 и 4C9 ORL1 ND7, обработанных
 20 эндопептидазой с измененной нацеленностью Noc/A. Родительские клоны ND7 и ORL1 ND7 обрабатывали Noc/A в течение 24 часов, после чего проводили инкубацию в течение двух дней. EC_{50} для родительского ND7 невозможно было вычислить, так как
 25 расщепление SNAP-25₁₉₇ происходило лишь примерно на 50%. В клонах 4 B7 и 1C11 расщепление SNAP-25₁₉₇ происходило более чем на 80%. Вычисленные значения EC_{50}
 30 составляли соответственно $5,7 \pm 0,5$, $6,7 \pm 1$ и $8,6 \pm 2$ нМ.

[012] На ФИГ.5 показано, что поликлональные антитела против ноцицептина
 25 способны блокировать поглощение эндопептидазы с измененной нацеленностью Noc/A в клеточных линиях клона №3, клона №22 SK-N-DZ и клона №6 AGN P33 ORL-1. Клетки
 30 рассеивали на 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином, в СБС RPMI+N2+B27+NGF и обрабатывали в течение 22 часов средой без сыворотки, содержащей поликлональные антитела против ноцицептина в различных разбавлениях (0-3 мкг/мл)
 35 в 1 нМ Noc/A.

[013] На ФИГ. 6 показаны клетки клона AF4 SiMa и стабильной клеточной линии PC-12, обработанные эндопептидазой с измененной нацеленностью Dyn/A в
 40 концентрации от 0,017 нМ до 1 мкМ, как представлено на изображении Вестерн блота. У обеих клеточных линий наблюдали дозозависимое поглощение.

35 [014] На ФИГ. 7 показаны нормированные кривые анализа методом поверхностного плазмонного резонанса SPR BIAcore с использованием 7,8 нМ антител 2E2A6, 1D3B8, 3C1A5 и 2C9 B10 и коммерческих MC-6050 и MC-6053. На ФИГ.7А показаны
 40 нормированные данные по скорости ассоциации для каждого антитела. На ФИГ.7Б показаны нормированные данные по скорости диссоциации для каждого антитела.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

40 [015] Согласно настоящему изобретению предложены новые тесты для анализа присутствия или отсутствия в образце активной эндопептидазы с измененной нацеленностью и для анализа активности эндопептидазы с измененной нацеленностью. Новые клеточные тесты, описанные в настоящей заявке, основаны на клетках, реагентах
 45 и способах детектирования, благодаря которым данные тесты можно использовать для детектирования наномолярных количеств эндопептидазы с измененной нацеленностью в образце. Клеточные тесты, описанные в настоящей заявке, предназначены для анализа множественных функций эндопептидазы с измененной нацеленностью, а именно, связывания эндопептидазы с измененной нацеленностью с

рецептором на поверхности клетки, интернализации комплекса эндопептидаза-рецептор, транслокации ферментативного домена в цитоплазму и расщепления субстрата ферментативным доменом. Как более подробно обсуждается ниже, новые способы и композиции можно использовать для анализа как необработанных и объединенных образцов, так и высокоочищенных двуцепочечных эндопептидаз с измененной нацеленностью и составов на основе эндопептидаз с измененной нацеленностью, а также в формате автоматизированного высокопроизводительного анализа.

[016] Таким образом, согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены вызывающие иммунный ответ композиции для получения анти-SNAP-25 антител, избирательно связывающихся с эпитопом, содержащим продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A. Вызывающие иммунный ответ композиции могут включать адъювант и вызывающую иммунный ответ композицию, включая антиген SNAP-25, носитель, связанный с антигеном SNAP-25, или носитель, связанный с гибким спейсером, в свою очередь связанным с антигеном SNAP-25, где между антигеном SNAP-25 и носителем помещен гибкий линкер. Предполагается, что все без исключения антигены SNAP-25, которые вызывают иммунный ответ, приводящий к выработке анти-SNAP-25 антител, способных избирательно связываться с эпитопом SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, могут быть пригодны в качестве антигенов SNAP-25, включая, но не ограничиваясь перечисленными: антигены SNAP-25, полученные из природного SNAP-25, антигены SNAP-25, полученные из не встречающегося в природе SNAP-25, и антигены SNAP-25, включающие иммунореактивные фрагменты SNAP-25, SNAP-25 из природного SNAP-25 или не встречающегося в природе SNAP-25. Антигены SNAP-25, пригодные для получения анти-SNAP-25 антител, способных избирательно связываться с эпитопом SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, включают, без ограничения, антигены SNAP-25, включающие пептид SNAP-25, на C-конце которого находится карбоксилированный остаток глутамина, связанный с пептидом-носителем, включая, без ограничения, SEQ ID NO: 38. Другие вызывающие иммунный ответ композиции, пригодные для получения аНТН-SNAP-25 антител, способных избирательно связываться с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, включают, без ограничения, вызывающие иммунный ответ композиции, содержащие носитель, связанный с гибким линкером, в свою очередь связанным с антигеном SNAP-25-карбоксилированным C-концевым глутамином, причем гибкий линкер помещен между антигеном SNAP-25 и носителем. Предполагается, что в такой вызывающей иммунный ответ композиции могут применяться любые адъюванты, включая, но не ограничиваясь перечисленными: полиэтиленгликоль (ПЭГ), монометоксиполиэтиленгликоль (мПЭГ), поливинилалкоголь (ПВА), полный и неполный адъювант Фрейнда.

[017] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы получения анти-SNAP-25 антител, избирательно связывающихся с эпитопом, содержащим продукт расщепления SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P_i разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A. Аспекты настоящего способа включают этапы (а) введения животным композиции, вызывающей иммунный ответ в отношении SNAP-25, которая описана в настоящей заявке; (б) отбор у животных образца, содержащего анти-SNAP-25 антитело или клетку,

5 продуцирующую анти-SNAP-25 антитело; и (в) выделение анти-SNAP-25 антитела из образца. Описанные способы пригодны для получения моноклональных анти-SNAP-25 антител, избирательно связывающихся с эпитопом, содержащим продукт расщепления SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, или поликлональных анти-SNAP-25 антител, избирательно связывающихся с эпитопом, содержащим продукт расщепления SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A.

10 [018] Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложены анти-SNAP-25 антитела, избирательно связывающиеся с эпитопом, содержащим SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A. Такие анти-SNAP-25 антитела включают как природные антитела, так и не встречающиеся в природе антитела, а также моноклональные антитела или поликлональные анти-SNAP-25 антитела. Моноклональные анти-SNAP-25 антитела, пригодные в качестве анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с антигеном SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, включают, без ограничения, моноклональные анти-SNAP-25 антитела, полученные в гибридных клеточных линиях 1D3B8, 2C9 B10, 2E2A6, 3C1A5 и 3C3E2.

15 [019] Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложены иммунологические способы детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью. Аспекты настоящего способа включают этапы (а) обработки клетки из стабильной клеточной линии образцом, содержащим эндопептидазу с измененной нацеленностью, причем клетка из стабильной клеточной линии чувствительна к активности эндопептидазы с измененной нацеленностью; (б) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A; (в) приведения компонента SNAP-25 в контакт с анти-SNAP-25 антителами, описанными в настоящей заявке; и (г) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A; при этом детектирование с использованием комплекса антитело-антиген является показателем активности эндопептидазы с измененной нацеленностью. анти-SNAP-25 антитела с этапа (в) необязательно могут быть связаны с твердофазной подложкой.

20 [020] Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложены иммунологические способы детектирования активности опиоидно-TVEMР. Аспекты настоящего способа включают этапы (а) обработки клетки из стабильной клеточной линии образцом, содержащим эндопептидазу с измененной нацеленностью, причем клетка из стабильной клеточной линии обладает способностью к поглощению эндопептидазы с измененной нацеленностью; (б) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A; (в) осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителами, описанными в настоящей заявке; и (г) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и SNAP-25, карбоксильный конец которого

соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A; при этом детектирование с использованием комплекса антитело-антиген является показателем активности эндопептидазы с измененной нацеленностью. анти-SNAP-25 антитела с этапа (в) необязательно могут быть связаны с твердофазной подложкой.

5 [021] Согласно дальнейшему аспекту настоящего изобретения предложены способы определения иммунной резистентности млекопитающих по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью. Аспекты настоящего способа включают этапы (а) добавления эндопептидазы с измененной нацеленностью к тестируемому образцу, полученному из организма млекопитающего, исследуемого на наличие или отсутствие
10 нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью; (б) обработки клетки из стабильной клеточной линии тестируемым образцом, причем клетка из стабильной клеточной линии чувствительна к активности эндопептидазы с измененной нацеленностью; (в) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, карбоксильный конец которого
15 соответствует остатку P, разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A; (г) осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителами, описанными в настоящей заявке; (д) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления
20 токсином BoNT/A; (е) повторения этапов а-д с образцом для отрицательного контроля вместо тестируемого образца; (ж) сравнения количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе (д), с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе (е), при этом детекция меньшего количества комплекса
25 антитело-антиген, детектированного на этапе (д), по сравнению с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе (е), свидетельствует о присутствии нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью. Анти-SNAP-25 антитела с этапа (г) необязательно могут быть связаны с твердофазной подложкой. Контрольный образец с этапа (е) может также включать
30 образец для положительного контроля в дополнение к образцу для отрицательного контроля.

[022] Токсины клостридий, вырабатываемые *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium baratii* и *Clostridium butyricum*, являются наиболее широко используемыми в терапевтических и косметических целях у человека и других млекопитающих. Штаммы
35 *C. botulinum* вырабатывают семь иммунологически отличных серотипов ботулинических токсинов (BoNTs), которые были обнаружены при исследовании вспышек ботулизма у человека (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E и BoNT/F), животных (BoNT/C1 и BoNT/D) или были изолированы из почвы (BoNT/G). Хотя все семь серотипов ботулинического
40 токсина обладают сходной структурой и биологическими свойствами, каждый из них также демонстрирует гетерогенные характеристики, такие как, например, различные фармакологические свойства. Напротив, токсин столбняка (TeNT) вырабатывает однородная группа *C. tetani*. Два другие вида *Clostridia*, *C. baratii* и *C. butyricum*, также вырабатывают токсины, подобные соответственно BoNT/F и BoNT/E.

[023] Каждый из токсинов клостридий транслируется в виде одной полицепи массой приблизительно 150 кДа, которая впоследствии протеолитически разрезается в пределах
45 дисульфидной петли природной протеазой, такой как, например, эндогенная протеаза токсина клостридий или природной протеазой, вырабатываемой в окружающей среде. Этот посттрансляционный процессинг приводит к образованию молекулы, состоящей из двух цепей и включающей легкую цепь (LC) массой приблизительно 50 кДа и тяжелую

цепь (НС) массой приблизительно 100 кДа, удерживаемые вместе единственной дисульфидной связью и нековалентными взаимодействиями. Каждая зрелая двуцепочечная молекула включает три функционально отличных домена: 1) ферментативный домен, расположенный в LC, который включает металлопротеазную область, имеющую цинк-зависимую эндопептидазную активность, специфической мишенью которой являются основные компоненты аппарата высвобождения нейромедиатора; 2) транслокационный домен, который содержится в пределах аминоконцевой половины НС (Н_N) и облегчает высвобождение LC из внутриклеточных пузырьков в цитоплазму клетки-мишени; и 3) связывающий домен, находящийся в пределах карбокси-концевой половины НС (Н_C), который определяет связывающую активность и специфичность связывания токсина с рецепторным комплексом, расположенным на поверхности клетки-мишени.

[024] Связывающая, транслокационная и ферментативная активности этих трех функциональных доменов необходимы для токсичности. Хотя детали этого процесса еще не известны полностью, общие механизмы клеточной интоксикации, благодаря которым токсины клостридий проникают в нейрон и ингибируют высвобождение нейромедиатора, являются сходными, независимо от серотипа или подтипа. Хотя заявители не подразумевают, что настоящее описание будет ограничивать данное изобретение, механизм интоксикации можно описать как включающий по меньшей мере четыре этапа: 1) связывание рецептора, 2) интернализация комплекса, 3) транслокация легкой цепи и 4) ферментативная модификация мишени (ФИГ. 1). Процесс начинается, когда домен НС токсина клостридий связывается с токсин-специфичной рецепторной системой, расположенной на поверхности плазматической мембраны клетки-мишени. Специфичность связывания рецепторного комплекса, как полагают, частично обеспечивается определенными комбинациями ганглиозидов и белковых рецепторов, которые, по-видимому, включают каждый отдельный рецепторный комплекс токсина клостридий. После образования комплекса токсин/рецептор он интернализируется по механизму эндоцитоза, а интернализированные пузырьки направляются по определенным внутриклеточным маршрутам. Предполагают, что этап транслокации инициируется закислением компартмента пузырька. Этот процесс, по-видимому, инициирует важные зависимые от pH структурные перестройки, которые увеличивают гидрофобность, способствуют формированию поры и облегчают разделение тяжелых и легких цепей токсина. После разделения эндопептидаза легкой цепи токсина высвобождается из внутриклеточного пузырька в цитозоль, где, как предполагают, ее специфическими мишенями являются основные компоненты аппарата высвобождения нейромедиатора. Эти основные белки, связанный с пузырьком мембранный белок (VAMP, vesicle-associated membrane protein)/синаптобrevин, связанный с синаптосомой белок массой 25 кДа (SNAP-25, synaptosomal-associated protein of 25 kDa) и Синтаксин, необходимы для стыковки синаптических пузырьков и слияния в нервном окончании и являются членами семейства растворимых белковых рецепторов прикрепления N-этилмалеимид-чувствительного фактора (SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein-receptor). BoNT/A и BoNT/E расщепляют SNAP-25 в карбокси-концевой области, высвобождая фрагмент, состоящий соответственно из девяти или двадцати шести аминокислот, а BoNT/C1 также расщепляет SNAP-25 около карбоксильного конца, высвобождая фрагмент, состоящий из восьми аминокислот. Ботулинические серотипы BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F и BoNT/G и токсин столбняка воздействуют на консервативную центральную часть VAMP и высвобождают аминоконцевую часть VAMP в цитозоль. BoNT/C1 расщепляет синтаксин в единственном

месте около поверхности цитоплазматической мембраны. Избирательный протеолиз синаптических белков SNARE приводит к блокировке высвобождения нейромедиатора, вызываемой токсинами клостридий *in vivo*. Мишени токсинов клостридий, белки SNARE, характерны для экзоцитоза во множестве типов клеток, не относящихся к нейронам; в этих клетках, как и в нейронах, пептидазная активность легкой цепи ингибирует экзоцитоз, см., например, Yann Humeau et al., How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release, 82(5) *Biochimie*. 427-446 (2000); Kathryn Turton et al., Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility, 27(11) *Trends Biochem. Sci.* 552-558. (2002); Giovanna Lalii et al., The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons, 11(9) *Trends Microbiol.* 431-437, (2003).

[025] Эндопептидазы с измененной нацеленностью обычно замещают сайт расщепления природных двуцепочечных протеаз с петлевой структурой сайтом расщепления экзогенных протеаз. См., например, Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, патент США 7419676, включенный в настоящую заявку посредством ссылки. Хотя эндопептидазы с измененной нацеленностью варьируют по общей молекулярной массе из-за размера нацеливающего домена, процесс активации и его зависимость от расщепления по экзогенному сайту расщепления с образованием двуцепочечной молекулы является, по существу, тем же самым, как и для токсинов клостридий. См., например, Steward, L.E. et al., Activatable Clostridial Toxins, публикация заявки на патент США 2009/0005313; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США 11/776,075; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translation Capabilities and Altered Targeting Activity for Clostridial Toxin Target Cells, публикация заявки на патент США 2008/0241881, содержание каждого из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[026] Часть аспектов настоящего описания включает вызывающую иммунный ответ композицию для получения анти-SNAP-25 антител, способных избирательно связываться со SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A. В настоящей заявке термин "вызывающая иммунный ответ композиция" относится к композиции, включающей антиген SNAP-25, которая при введении животному стимулирует иммунный ответ в отношении антигена SNAP-25, тем самым приводя к образованию анти-SNAP-25 антител, способных избирательно связываться со SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A. Термин "иммунный ответ" относится к любому ответу иммунной системы животного на вызывающую иммунный ответ композицию. Примеры иммунных ответов включают, но не ограничиваются перечисленными: клеточный, а также местный и системный гуморальный иммунитет, такие как, например, ответы цитолитических лимфоцитов, включая антиген-специфичную индукцию CD8+цитолитических лимфоцитов, ответы Т-клеток-хелперов, включая пролиферативные ответы Т-клеток и высвобождение цитокинов, и ответы В-клеток, включая, например, ответ образования антител. Термин "стимуляция иммунного ответа" относится к введению вызывающей иммунный ответ композиции или полинуклеотида, кодирующего вызывающую иммунный ответ композицию, при котором затронут иммунный ответ, т.е. он стимулируется, инициируется или индуцируется.

[027] Композиция, вызывающая иммунный ответ в отношении SNAP-25, включает антиген SNAP-25. В настоящей заявке термин "антиген" относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ и включает, но не ограничивается перечисленными: пептиды,

полисахариды и конъюгаты липидов, такие как, например, липопротеины и гликолипиды. В настоящей заявке термин "антиген SNAP-25" относится к любому антигену, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, способному вызывать иммунный ответ. Антиген SNAP-25, используемый в составе вызывающей иммунный ответ композиции, должен быть достаточно большим для того, чтобы его последовательность являлась по существу уникальной, чтобы обеспечить снижение вероятности получения антител, обладающих перекрестной нацеленностью в отношении антигенов, отличных от SNAP-25. Кроме того, антиген SNAP-25, используемый в составе вызывающей иммунный ответ композиции, должен быть достаточно небольшим для того, чтобы вызывать иммунный ответ существенной интенсивности только против SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, для повышения вероятности получения анти-SNAP-25 антител, способных отличать SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, от SNAP-25, на карбоксильном конце которого отсутствует остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A. Кроме того, очень желательно также получить с хорошим выходом анти-SNAP-25 антитела одной аминокислотной последовательности, которые воспроизводимо избирательны и связываются с приемлемой авидностью, чтобы сделать возможной разработку высокочувствительного теста.

[028] Последовательность, окружающая сайт расщепления BoNT/A, присутствующий в SNAP-25, обозначена как P₅-P₄-P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅', где P₁-P₁' означает разрезаемую связь. После расщепления эндопептидазой с измененной нацеленностью, образующиеся продукты расщепления содержат фрагмент, включающий последовательность P₅-P₄-P₃-P₂-P₁, и фрагмент, включающий P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅'. Таким образом, в настоящей заявке термин "SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A" относится к любому SNAP-25, у которого карбокси-концевой аминокислотой является остаток P_i. Например, Q₁₉₇-R₁₉₈ SNAP-25 человека (SEQ ID NO: 5) представляет собой разрезаемую связь P₁-P₁' сайта расщепления BoNT/A. В связи с этим "SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится глутамин разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A" является любой продукт расщепления SNAP-25, у которого карбокси-концевой аминокислотой является глутамин, причем глутамин представляет собой Q₁₉₇ разрезаемой связи. В качестве другого примера можно привести K₂₀₄-H₂₀₅ SNAP-25 *Torpedo marmorata* (SEQ ID NO: 16), который представляет собой разрезаемую связь P₁-P₁' сайта расщепления BoNT/A. В связи с этим "SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится лизин разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A" является любой продукт расщепления SNAP-25, у которого карбокси-концевой аминокислотой является лизин, причем лизин представляет собой K₂₀₄ разрезаемой связи.

[029] Антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, можно модифицировать с повышением иммуногенности антигена SNAP-25, гаптена или любого другого антигенного соединения, которое в отсутствие модификации является иммуногенным, неиммуногенным или слабоиммуногенным. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, карбокси-концевой остаток P₁ разрезаемой связи антигена SNAP-

25 может карбоксилироваться. Карбоксилирование увеличивает желаемые иммуногенные свойства антигена SNAP-25 в двух отношениях. Во-первых, поскольку заряженные аминокислоты увеличивают иммуногенность, добавление COO^- -группы к карбокси-концевому остатку увеличит общую иммуногенность антигена SNAP-25. Во-вторых, поскольку остаток P_1 разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A находится в заряженном состоянии после расщепления, добавление COO^- -группы к карбокси-концевому остатку повысит сходство данного антигена с исходным антигеном, для избирательного связывания с которым разработаны анти-SNAP-25 антитела, описанные в настоящей заявке.

[030] Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, аминоконцевой остаток антигена SNAP-25 может быть модифицирован путем добавления аминокислоты, приспособленной для присоединения антигена SNAP-25 к белку-носителю, такому как, например, гемоцианин фиссуреллы (KLH), овальбумин (OVA), тиреоглобулин (THY), бычий сывороточный альбумин (BSA), соевый ингибитор трипсина (STI) или пептид множественного прикрепления (MAP). Например, остаток цистеина может быть помещен на N-конец с тем, чтобы присоединить белок-носитель KLH.

[031] Таким образом, согласно одному варианту реализации, длина антигена SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может составлять, например, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 30 аминокислот. Согласно другому варианту реализации, длина антигена SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может составлять, например, самое большее 5, самое большее 6, самое большее 7, самое большее 8, самое большее 9, самое большее 10, самое большее 11, самое большее 12, самое большее 13, самое большее 14, самое большее 15, самое большее 16, самое большее 17, самое большее 18, самое большее 19, самое большее 20, самое большее 25 или самое большее 30 аминокислот. Согласно еще одному варианту реализации, длина антигена SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток p_i разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может находиться, например, в пределах 7-12 аминокислот, в пределах 10-15 аминокислот или в пределах 13-18 аминокислот.

[032] Согласно другому варианту реализации, антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, включает SEQ ID NO: 33. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, включает SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 39. Согласно дальнейшему варианту реализации, антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, включает SEQ ID NO: 40.

[033] Согласно еще одному варианту реализации, антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, включает SEQ ID NO: 41. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 разрезаемой связи

в сайте расщепления BoNT/A, включает SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46. Согласно дальнейшему варианту реализации, антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, включает SEQ ID NO: 47.

5 [034] Предполагается, что все без исключения антигены SNAP-25, которые вызывают иммунный ответ, приводящий к выработке aНТН-SNAP-25 антител, способных избирательно связываться со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, могут быть пригодны в качестве антигенов SNAP-25. Таким образом, варианты аминокислотных
10 последовательностей, включающие 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 или SEQ ID NO: 46, могут быть пригодны в качестве антигенов SNAP-25, которые вызывают иммунный ответ, приводящий к выработке анти-SNAP-25 антител, способных избирательно связываться
15 со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A. Таким образом, согласно одному варианту реализации, антиген SNAP-25 может содержать по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 замен, делеций или инсерций в аминокислотных последовательностях антигенов SNAP-25, включающих SEQ ID NO:
20 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 или SEQ ID NO: 46. Согласно еще одному варианту реализации, антиген SNAP-25 может быть по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот антигенам SNAP-25,
25 включающим 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 или SEQ ID NO: 46.

30 [035] Предполагается, что с антигеном SNAP-25 может быть связан один или несколько носителей, обеспечивающих повышение иммуногенности антигена SNAP-25, который является иммуногенным, неиммуногенным или слабоиммуногенным в не связанном с носителем виде. Неограничивающие примеры включают, например, гемоцианин фиссуреллы (KLH), овальбумин (OVA), тиреоглобулин (THY), бычий сывороточный альбумин (BSA), соевый ингибитор трипсина (STI) или пептид
35 множественного прикрепления (MAP). Как хорошо известно в данной области техники, неантигенный или слабоантигенный антиген может быть превращен в антигенный путем связывания антигена с носителем. Множество других носителей и способов связывания антигена с носителем хорошо известны в данной области техники. См., например, Harlow and Lane, см. выше, 1998a; Harlow and Lane, см. выше, 1998b; и David W. Waggoner, Jr. et al., Immunogenicity-enhancing carriers and compositions thereof and methods of using the same, публикация заявки на патент США №20040057958 (25 марта 2004 г.). Эпитоп также может быть получен путем экспрессии эпитопа в составе химерного
40 белка. Способы экспрессии химерных полипептидов хорошо известны специалистам в данной области техники, как описано, например, в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999). Поскольку на карбоксильном конце антигена SNAP-25 должен находиться остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, носитель должен быть присоединен к N-концу

антигена SNAP-25.

[036] Предполагается, что с антигеном SNAP-25 может быть связан один или несколько гибких спейсеров, повышающих иммуногенность антигена SNAP-25, который является иммуногенным, неиммуногенным или слабоиммуногенным в не связанном с гибкими линкерами виде. Гибкий спейсер увеличивает общую длину пептида антигена SNAP-25 и обеспечивает гибкость, тем самым облегчая надлежащую презентацию антигена SNAP-25 иммунным клеткам. В качестве неограничивающего примера, композиция, вызывающая иммунный ответ в отношении SNAP-25, может включать антиген SNAP-25, связанный с одним или несколькими гибкими спейсерами в тандеме для лучшей презентации антигена SNAP-25 иммунным клеткам, тем самым облегчая иммунный ответ.

[037] Гибкий спейсер, содержащий пептид, составляет в длину по меньшей мере одну аминокислоту и включает незаряженные аминокислоты с небольшими группами боковых цепей (R), такие как, например, глицин, аланин, валин, лейцин или серин. Таким образом, согласно одному варианту реализации, длина гибкого спейсера может составлять, например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 аминокислот. Согласно другому варианту реализации, длина гибкого спейсера может составлять, например, по меньшей мере 1, самое большее 2, самое большее 3, самое большее 4, самое большее 5, самое большее 6, самое большее 7, самое большее 8, самое большее 9 или самое большее 10 аминокислот. Согласно еще одному варианту реализации, длина гибкого спейсера может находиться, например, в пределах 1-3 аминокислот, в пределах 2-4 аминокислот, в пределах 3-5 аминокислот, в пределах 4-6 аминокислот или в пределах 5-7 аминокислот. Неограничивающие примеры гибкого спейсера включают, например, G-спейсеры, такие как GGG, GGGG (SEQ ID NO: 57) и GGGGS (SEQ ID NO: 58), или F-спейсеры, такие как AAA, AAAA (SEQ ID NO: 59) и AAAAV (SEQ ID NO: 60). Гибкий спейсер связан с антигеном SNAP-25 в одной рамке считывания в составе химерного белка.

[038] Как отмечалось выше, гибкий спейсер отчасти используют для увеличения общей длины пептида антигена SNAP-25. Например, общую длину антигена SNAP-25 из 5-10 аминокислот можно увеличить путем присоединения гибкого спейсера длиной 3-5 аминокислот к N-концу антигена SNAP-25. В качестве другого примера, общую длину антигена SNAP-25 из 5-10 аминокислот можно увеличить путем присоединения гибкого спейсера длиной 4-6 аминокислот к N-концу антигена SNAP-25. В качестве другого примера, общую длину антигена SNAP-25 из 5-10 аминокислот можно увеличить путем присоединения гибкого спейсера длиной 7-10 аминокислот к N-концу антигена SNAP-25. В качестве другого примера, общую длину антигена SNAP-25 из 7-12 аминокислот можно увеличить путем присоединения гибкого спейсера длиной 1-3 аминокислот к N-концу антигена SNAP-25. В качестве другого примера, общую длину антигена SNAP-25 из 7-12 аминокислот можно увеличить путем присоединения гибкого спейсера длиной 4-6 аминокислот к N-концу антигена SNAP-25. Увеличение длины, обеспечиваемое гибким спейсером, позволяет выбрать антиген SNAP-25 небольшого размера, тем самым увеличивая вероятность того, что антиген SNAP-25 вызовет иммунный ответ существенной интенсивности только против SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, таким образом повышая возможность получения анти-SNAP-25 антител, способных отличать SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, от SNAP-25, на карбоксильном конце которого отсутствует остаток P₁ разрезаемой связи в сайте

расщепления ВоNT/A.

[039] Предполагается, что композиция, вызывающая иммунный ответ в отношении SNAP-25, которая описана в настоящей заявке, может включать антиген SNAP-25, описанный в настоящей заявке, и один или несколько адъювантов. В настоящей заявке термин "адъювант" применительно к композиции, вызывающей иммунный ответ в отношении SNAP-25, относится к любому веществу или смеси веществ, которые увеличивают или разнообразят иммунный ответ на антиген SNAP-25. Вызывающий иммунный ответ адъювант может, например, служить для снижения числа иммунизации или количества антигена, необходимого для защитной иммунизации. Хорошо известно использование вызывающих иммунный ответ адъювантов в составе вызывающей иммунный ответ композиции. Основное назначение этих адъювантов состоит в увеличении иммунного ответа. Неограничивающие примеры адъювантов включают, например, липосомы, масляные фазы, включая, без ограничения, адъюванты типа Фрейнда, такие как, например, полный адъювант Фрейнда (ПАФ); неполный адъювант Фрейнда (НАФ); гликозиды сапогемима, такие как, например, сапонины; карбопол; N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (обычно называемый мурамилдипептид или "МДП"); и липополисахариды (ЛПС). Такие адъюванты обычно используют в форме эмульсии, содержащей водную фазу, или чаще могут состоять из не растворимых в воде неорганических солей. Эти неорганические соли могут состоять, например, из гидроксида алюминия, сульфата цинка, коллоидного гидроксида железа, фосфата кальция или хлорида кальция. Гидроксид алюминия ($Al(OH)_3$) является широко используемым адъювантом. В настоящее время единственным адъювантом, одобренным FDA для использования у людей, являются соли алюминия (Alum), которые используются для "депонирования" антигенов посредством их преципитации. Указанные выше адъюванты приведены просто в качестве примеров. Фактически, любой вызывающий иммунный ответ адъювант можно использовать в составе вызывающей иммунный ответ композиции, описанной в настоящей заявке, при условии, что адъювант обладает характеристиками, необходимыми для того, чтобы вызвать иммунный ответ.

[040] Носитель, описанный в настоящей заявке, может также действовать в качестве адъюванта. Конкретные адъюванты и способы их получения и использования описаны, например, в Gupta et al. Vaccine, 11: 993-306, 1993; Arnon, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987; и David W. Waggoner, Jr. et al., Immunogenicity-Enhancing Carriers and Compositions Thereof and Methods of Using the Same, публикация патента США №20040057958 (25 марта 2004 г.). Дополнительные адъюванты включают любые соединения, описанные в 7 главе (стр.141-227) "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell, M.F. and Newman, M.J.) Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Plenum Press (New York). Примеры из этого справочника включают мурамилдипептид (МДП) и Монтанид 720. Молекулы, такие как полиинозин:цитозин (polyI:C) или плазмидная ДНК, содержащая мотивы CpG, можно также вводить в качестве адъювантов в комбинации с антигенами, заключенными в микрочастицы. В другом примере адъювант представляет собой агент, который облегчает проникновение антигенного соединения в цитоплазму клетки, такой как листериолизин, стрептолизин или их смесь.

[041] Таким образом, согласно одному варианту реализации, композиция, вызывающая иммунный ответ в отношении SNAP-25, включает антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится карбоксилированный остаток глутамина, связанный с пептидом-носителем. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится карбоксилированный

остаток глутамина, включает 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 или SEQ ID NO: 39. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, антиген SNAP-25 включает SEQ ID NO: 40. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, пептид-носитель

5 представляет собой гемоцианин фиссуреллы (KLH), овальбумин (OVA), тиреоглобулин (THY), бычий сывороточный альбумин (BSA), соевый ингибитор трипсина (STI) или пептид множественного прикрепления (MAP).

[042] Согласно другому варианту реализации, композиция, вызывающая иммунный ответ в отношении SNAP-25, включает антиген SNAP-25, на карбоксильном конце

10 которого находится карбоксилированный остаток лизина, связанный с пептидом-носителем. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится карбоксилированный остаток лизина, включает SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 или SEQ ID NO: 46. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, антиген

15 SNAP-25 включает SEQ ID NO: 47. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, пептид-носитель представляет собой гемоцианин фиссуреллы (KLH), овальбумин (OVA), тиреоглобулин (THY), бычий сывороточный альбумин (BSA), соевый ингибитор трипсина (STI) или пептид множественного прикрепления (MAP).

[043] Согласно еще одному варианту реализации, композиция, вызывающая иммунный

20 ответ в отношении SNAP-25, включает антиген SNAP-25, на С-конце которого находится карбоксилированный остаток глутамина, связанный с одним или несколькими гибкими линкерами и пептидом-носителем, причем гибкие линкеры помещены между антигеном SNAP-25 и пептидом-носителем. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится карбоксилированный

25 остаток глутамина, включает 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 или SEQ ID NO: 39. Согласно другому варианту реализации, антиген SNAP-25 включает SEQ ID NO: 46. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, пептид-носитель представляет собой гемоцианин фиссуреллы (KLH), овальбумин (OVA), тиреоглобулин (THY), бычий

30 сывороточный альбумин (BSA), соевый ингибитор трипсина (STI) или пептид множественного прикрепления (MAP). Согласно аспектам настоящего варианта реализации, гибкий линкер представляет собой G-спейсер или A-спейсер, [044] Согласно еще одному варианту реализации, композиция, вызывающая иммунный ответ в отношении SNAP-25, включает антиген SNAP-25, на С-конце которого находится

35 карбоксилированный остаток лизина, связанный с гибким линкером и пептидом-носителем, причем гибкий линкер помещен между антигеном SNAP-25 и пептидом-носителем. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, антиген SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится карбоксилированный остаток лизина, включает SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45

40 или SEQ ID NO: 46. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, антиген SNAP-25 включает SEQ ID NO: 47. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, пептид-носитель представляет собой гемоцианин фиссуреллы (KLH), овальбумин (OVA), тиреоглобулин (THY), бычий сывороточный альбумин (BSA), соевый ингибитор трипсина (STI) или пептид множественного прикрепления (MAP). Согласно аспектам

45 настоящего варианта реализации, гибкий линкер представляет собой G-спейсер или A-спейсер.

[045] Часть аспектов настоящего описания включает способ получения анти-SNAP-25 антител, способных избирательно связываться с SNAP-25, на карбоксильном конце

которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A. Анти-SNAP-25 антитела, избирательно связывающиеся с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, можно получить множеством способов, хорошо известных в данной области техники. Конкретные протоколы для получения и использования антител, а также для детектирования и измерения специфичности связывания, аффинности связывания и avidности связывания антител известны в данной области техники. См., например, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998a); и *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; и *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004; David Anderson et al., *Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use*, патент США 7034132 (25 апреля 2005 г.); и Beatriz M. Carreno et al., *Antibodies Against CTLA4*, патент США 7034121 (25 апреля 2006 г.).

[046] В качестве неограничивающего примера можно привести поликлональные анти-SNAP-25 антитела, избирательно связывающиеся со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, которые могут быть получены путем введения животным, таким как, например, кролик, коза, мышь или другие млекопитающие, одной или нескольких инъекций вызывающей иммунный ответ композиции, описанной в настоящей заявке. В качестве другого неограничивающего примера можно привести поликлональные aНТН-SNAP-25 антитела, избирательно связывающиеся со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoMT/A, которые могут быть получены путем введения в яйцо, такое как, например, куриное яйцо, одной или нескольких инъекций вызывающей иммунный ответ композиции, описанной в настоящей заявке. Титр антител у иммунизированного животного можно контролировать с течением времени стандартными методами, такими как твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) с использованием иммобилизованного антигена или тест на активность в клетках. При желании, в качестве анти-SNAP-25 антител, избирательно связывающихся с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, можно использовать поликлональные антитела, которые можно выделить из млекопитающих (например, из крови) и далее очистить с использованием хорошо известных методов, таких как аффинная хроматография с помощью белка А для получения фракции IgG, или с использованием аффинной очистки с помощью пептида, используемого для получения антител.

[047] В качестве другого неограничивающего примера можно привести моноклональные анти-SNAP-25 антитела, избирательно связывающиеся со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, которые можно получить с использованием гибридомного способа. См., например, Chapter 6 *Monoclonal Antibodies*, pp.196-244, Harlow & Lane, см. выше, 1998a; и Chapter 7 *Growing Hybridomas*, pp.245-282, Harlow & Lane, см. выше, 1998a; и Coding, pp.59-103, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986). Согласно этому способу, животное-хозяин, такое как, например, мышь, хомяк или другое подходящее животное-хозяин, обычно подвергают одной или нескольким инъекциям антигена SNAP-25, описанного в настоящей заявке, для стимуляции образования лимфоцитов, которые производят или способны производить анти-SNAP-

25 антитела, избирательно связывающиеся со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A. Титр антител у иммунизированного животного можно контролировать с течением времени стандартными методами, такими как твердофазный иммуноферментный анализ (5 твердофазный ИФА) с использованием иммобилизованного антигена или тест на активность в клетках. В качестве альтернативы, лимфоциты можно иммунизировать in vitro с использованием подходящей линии клеточной культуры. В подходящее время после иммунизации, например, когда титр антител является наивысшим, клетки, производящие антитела, выделяют из животного. В целом, используют либо лимфоциты (10 периферической крови, если требуются клетки человеческого происхождения, либо клетки селезенки или клетки лимфатического узла, если в качестве источников необходимы млекопитающие, отличные от человека. Выделенные клетки, производящие антитела, объединяют с иммортализованной клеточной линией, используя подходящий агент, стимулирующий слияние клеток, такой как полиэтиленгликоль, с получением (15 клетки гибридомы. Иммортализованные клеточные линии обычно представляют собой трансформированные клетки млекопитающих, в частности клетки миеломы грызунов, крупного рогатого скота и человека. Как правило, клеточную линию миеломы мыши объединяют со спленоцитами, собранными из соответствующим образом иммунизированной мыши, для получения гибридомы. Предпочтительные (20 иммортализованные клеточные линии представляют собой клеточные линии миеломы мыши, которые чувствительны к культуральной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ). Любую из множества клеточных линий миеломы можно использовать в качестве партнера для слияния согласно стандартным методам, например, линии миеломы P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 или Sp2/O-Ag14. Клетки (25 гибридомы, образующиеся в результате слияния, затем отбирают с помощью среды ГАТ, на которой погибают клетки миеломы, которые не прошли слияние или прошли непродуктивное слияние (не прошедшие слияние спленоциты погибают в культуре после нескольких дней, поскольку они не трансформированы). Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, можно затем протестировать на присутствие (30 моноклональных анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoMT/A. Например, можно провести скрининг супернатантов гибридомы с использованием α-SNAP-25-позитивных сред путем иммунопреципитации, анализа связывания in vitro, такого как, например, радиоиммунологический анализ (РИА) или (35 твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА), или теста на активность в клетках. Подобные методы и тесты известны в данной области техники. См., например, Chapter 11 Immunoprecipitation, pp.421-470, Harlow & Lane, см. выше, 1998a; Chapter 12 Immunoblotting, pp.471-510, Harlow & Lane, см. выше, 1998a; Chapter 14 Immunoassays, pp.553-612, Harlow & Lane, см. выше, 1998a. Затем можно провести дополнительные (40 исследования, чтобы определить, отсутствует ли у антител реактивность также по отношению к SNAP-25, на карбоксильном конце которого отсутствует остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoMT/A. Можно также определить аффинность связывания моноклональных анти-SNAP-25 антител, например, с помощью анализа Скэтчарда. См., например, Peter J. Munson and David Rodbard, Ligand: A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand-Binding Systems, 107(1) Anal. Biochem, 220-239 (1980). После идентификации искомым клеток гибридомы используют метод предельных разведений для изоляции клонов, происходящих из единственной клетки, (45

до получения клональной клеточной линии, экспрессирующей требуемые моноклональные антитела. Эти антитела, которые проявляют существенную избирательность в отношении SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, и связываются с достаточно

5

высокой авидностью, отбирают для дальнейшей характеристики и исследования. [048] Другой альтернативой для получения моноклональных анти-8BAP-25 антител, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого

10

находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, является скрининг рекомбинантной комбинаторной библиотеки иммуноглобулинов, такой как, например, библиотека антител на основе фагового дисплея, с помощью пептида SNAP-25 и идентификация компонентов библиотеки иммуноглобулинов, которые связываются со

15

SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A. Наборы для конструирования и скрининга библиотек на основе фагового дисплея коммерчески доступны, например, Рекомбинантная Фаговая Система Антител (Amersham GE Healthcare, Пискэтэуэй, Нью-Джерси) и Набор для Фагового Дисплея SurfZAP™ (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния). Кроме того, примеры способов и реагентов, подходящих для получения и скрининга библиотеки антител на основе дисплея, можно найти, например, в Ladner et al., патент США 5223409; Borrebaeck et al., патент США 5712089; Griffiths et al., патент США 5885793; Griffiths et al., патент США 5962255; McCafferty et al., патент США 5969108; Griffiths et al., патент США 6010884; Jespers et al., патент США 6017732; Borrebaeck et al., патент США 6027930; Johnson et al., патент США 6140471; McCafferty et al., патент США 6172197, содержание каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

25

[049] Часть аспектов настоящего описания включает сбор образца, содержащего анти-SNAP-25 антитела или клетки, производящие анти-SNAP-25 антитела. В настоящей заявке термин "образец, содержащий анти-SNAP-25 антитела или клетки, производящие анти-SNAP-25 антитела", относится к любому биологическому материалу, который содержит или потенциально содержит по меньшей мере одно антитело α -SNAP-25, которое избирательно связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце

30

которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A. Предполагается, что все без исключения образцы, которые могут содержать анти-SNAP-25 антитела, избирательно связывающиеся с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном

35

конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, можно использовать в этом способе, включая, без ограничения, кровь, плазму, сыворотку и лимфатическую жидкость. Также предполагается, что любая клетка, способная вырабатывать анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁

40

разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, можно использовать в этом способе, включая, без ограничения, клетки CD8, клетки ЦТЛ, Т-клетки-хелперы и В-клетки. Для получения из особи образца, содержащего анти-SNAP-25 антитела или клетки, производящие анти-SNAP-25 антитела, можно использовать множество хорошо известных способов, см., например, Harlow & Lane, см. выше, 1998a; и Harlow & Lane, см. выше, 1998b. Сходным образом, множество хорошо известных способов можно

45

использовать для обработки образца с целью выделения анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A. Процедуру сбора образца можно выбрать исходя из типа антител, которые необходимо выделить. В

качестве неограничивающего примера, при выделении поликлональных анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, подходящий образец может представлять собой образец крови, содержащий такие анти-SNAP-25 антитела, тогда как при выделении моноклональных анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, подходящий образец может представлять собой клетку, производящую aНТН-SNAP-25 антитела, такую как клетка селезенки или гибридома.

[050] Часть аспектов настоящего описания включает выделение из образца анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A. Способы выделения таких анти-SNAP-25 антител, таких как, например, поликлональные анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, или моноклональные анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления VoMT/A, хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Harlow and Lane, см. выше, 1998a; и Harlow and Lane, см. выше, 1998b. Например, такие поликлональные анти-SNAP-25 антитела можно выделить из образца с помощью хорошо известных методов, таких как, например, аффинная хроматография с использованием белка А или белка G, которая позволяет выделить главным образом фракцию IgG иммунной сыворотки. Впоследствии, или в качестве альтернативы, конкретный антиген SNAP-25 можно иммобилизовать на колонке или магнитных шариках для очистки поликлональных анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, с помощью иммуноаффинной хроматографии. Моноклональные анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, можно выделить из культуральной среды или асцитной жидкости с помощью обычных процедур для очистки иммуноглобулинов, таких как, например, белок А-сефароза, хроматография с гидроксиллапатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

[051] Таким образом, согласно одному варианту реализации, способ получения анти-SNAP-25 антител, которые способны избирательно связываться со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, включает этапы (а) введения животному композиции, вызывающей иммунный ответ в отношении SNAP-25, которая включает антиген SNAP-25, на С-конце которого находится карбоксилированный остаток глутамина, связанный с пептидом-носителем; (б) отбор у животного образца, содержащего анти-SNAP-25 антитела или клетки, производящие анти-SNAP-25 антитела; и (в) выделение компонентов анти-SNAP-25 антител из образца. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые способны избирательно связываться со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, являются поликлональными антителами. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые способны

избирательно связываться со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, являются моноклональными антителами. Согласно дальнейшему аспекту настоящего варианта реализации, получаемые моноклональные анти-SNAP-25 антитела, которые способны избирательно связываться со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoMT/A, относятся к подтипу IgG. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, композиция, вызывающая иммунный ответ в отношении SNAP-25, дополнительно содержит адъювант, такой как, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), монометоксиполиэтиленгликоль (мПЭГ) или поливинилалкоголь (ПВА).

[052] Согласно другому варианту реализации, способ получения анти-SNAP-25 антител, которые способны избирательно связываться со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, включает этапы (а) введения животному композиции, вызывающей иммунный ответ в отношении SNAP-25, которая включает пептид SNAP-25, на С-конце которого находится карбоксилированный остаток глутамина, связанный с гибким линкером и пептидом-носителем, причем гибкий линкер помещен между пептидом SNAP-25 и пептидом-носителем; (б) отбор у животного образца, содержащего анти-SNAP-25 антитела или клетки, производящие анти-SNAP-25 антитела; и (в) выделение анти-SNAP-25 антител из образца. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые способны избирательно связываться со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, являются поликлональными антителами. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые способны избирательно связываться со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, являются моноклональными антителами. Согласно дальнейшему аспекту настоящего варианта реализации, получаемые моноклональные анти-SNAP-25 антитела, которые способны избирательно связываться со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, относятся к подтипу IgG. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, композиция, вызывающая иммунный ответ в отношении SNAP-25, дополнительно содержит адъювант, такой как, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), монометоксиполиэтиленгликоль (мПЭГ) или поливинилалкоголь (ПВА).

[053] Часть аспектов настоящего описания включает изолированные aНТН-SNAP-25 антитела которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A. В настоящей заявке термин "антитело" относится к молекуле, вырабатываемой иммунной системой, которая продуцируется в ответ на определенный антиген и которая специфично связывается с этим антигеном, и охватывает как природные антитела, так и не встречающиеся в природе антитела. В настоящей заявке термин "изолированный" относится к выделению молекулы из ее естественного окружения в результате вмешательства человека. Например, антитело может быть поликлональным антителом, моноклональным антителом, димером, мультимером, мультиспецифическим антителом, гуманизированным антителом, химерным антителом, бифункциональным антителом, связанным с клеткой антителом, как ИГ рецептор, линейным антителом, диателом или миниантителом, если фрагмент демонстрирует желаемую биологическую активность,

и их производными, состоящими из одной цепи. Антитело может представлять собой полноразмерную молекулу иммуноглобулина, включая домены V_H и V_L , а также константный домен легкой цепи (C_L) и константные домены тяжелой цепи, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} , или иммунологически активный фрагмент полноразмерной молекулы иммуноглобулина, такой как, например, Fab-фрагмент, $F(ab')_2$ -фрагмент, Fc-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент. Антитело может быть получено от любых видов позвоночных (например, человека, козы, лошади, осла, мыши, крысы, кролика или курицы) и может принадлежать к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), классу (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) или подклассу (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2). Общее описание структуры природных антител, не встречающихся в природе антител и их фрагментов, связывающих соединения антигенов можно найти, например, у Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg и Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2d ed. (Oxford University Press 1995), содержание каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[054] Природные антитела обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой около 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, при этом число дисульфидных связей варьирует для тяжелых цепей различных иммуноглобулиновых изотипов. Каждая тяжелая и легкая цепь также содержит расположенные с равными интервалами дисульфидные мостики внутри цепи. На одном конце каждой тяжелой цепи находится переменный домен (V_H), за которым следует несколько константных доменов. У каждой легкой цепи на одном конце находится переменный домен (V_L), а на другом конце - константный домен. Константный домен легкой цепи расположен напротив первого константного домена тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи расположен напротив переменного домена тяжелой цепи. Определенные остатки аминокислот, как полагают, формируют область контакта между переменными доменами легкой и тяжелой цепи.

[055] Полные антигенраспознающая и антигенсвязывающая области содержатся в пределах переменных доменов антитела, т.е. Fv-фрагмента. Этот фрагмент включает димер одного переменного домена тяжелой цепи (V_H) и одного переменного домена легкой цепи (V_L), которые находятся в плотном нековалентном взаимодействии. Каждый домен включает четыре каркасные области (FR), которые в значительной степени принимают конфигурацию β -слоев, связанные тремя гиперпеременными участками, которые формируют петли, соединяющие и в некоторых случаях являющиеся частью β -слоистой структуры. Каждый гиперпеременный участок включает последовательность аминокислот, соответствующую участку, определяющему комплиментарность (CDR). В совокупности, эта трехмерная конфигурация шести CDR формирует антигенсвязывающий участок на поверхности димера V_H - V_L , который определяет специфичность связывания антигена. См., например, Cyrus Chothia, et al., *Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions*, *Nature* 342(6252): 877-883 (1989); Elvin A. Kabat, et al *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Константные домены антител непосредственно не участвуют в связывании антитела с антигеном, но демонстрируют

различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности.

[056] Антиген-мишень обычно имеет один или несколько участков связывания, также называемых эпитопами, которые распознаются антигенсвязывающими участками, образованными CDR. В настоящей заявке термин "эпитоп" является синонимом термина "антигенная детерминанта" и относится к участку антигена-мишени, такого как, например, пептида, полисахарида или липидсодержащей молекулы, способному специфически связываться с иммуноглобулином или рецептором Т-лимфоцитов или иным образом взаимодействующему с молекулой. Антитела, которые специфически связываются с различными эпитопами, имеют различную структуру. Таким образом, одному антигену может соответствовать более одного антитела.

[057] Термин «поликлональные антитела» относится к гетерогенной популяции молекул антител, которая содержит по меньшей мере два вида антител, способных связываться с конкретным антигеном. По определению, поликлональные антитела включают два различных антитела, которые связываются по меньшей мере с двумя различными эпитопами. В настоящей заявке термины "моноклональное антитело" или "моноклональные антитела" относятся к по существу гомогенной степени популяции молекул антител, которая содержит только один вид антител, способных связываться с конкретным антигеном, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в малых количествах. По определению, моноклональные антитела связываются с единственным эпитопом. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против одного участка антигена. Более того, в отличие от поликлональных антител, каждое моноклональное антитело направлено против единственной антигенной детерминанты. Помимо специфичности, преимуществом моноклональных антител является возможность синтезировать их в отсутствие загрязнения другими антителами. Определение "моноклональные" отражает особенность данных антител, заключающуюся в том, что они получены из гомогенной в значительной степени популяции антител, и не должно пониматься как требование, чтобы антитела были получены каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с настоящей заявкой можно получить гибридным способом, впервые описанным Kohler et al (1975) Nature 256:495, или с помощью способа, основанного на использовании технологий рекомбинантной ДНК (см., например, патент США №4816567; патент США №5807715). Моноклональные антитела также можно выделить из фаговых библиотек антител с использованием методов, описанных, например, в Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597.

[058] Таким образом, согласно одному варианту реализации, анти-SNAP-25 антитела включают переменный домен тяжелой цепи (V_H) и переменный домен легкой цепи (V_L), которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, переменный домен тяжелой цепи (V_H) представляет собой SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 133. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, переменный домен легкой цепи (V_L) представляет собой SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 или SEQ ID NO: 92.

[059] Согласно другому варианту реализации, последовательность нуклеиновой

кислоты кодирует анти-SNAP-25 антитела, включающие переменный домен тяжелой цепи (V_H) и переменный домен легкой цепи (V_L), которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A. Согласно одному аспекту настоящего варианта

5

реализации, переменный домен тяжелой цепи (V_H) кодирует последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 132. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, переменный домен тяжелой цепи (V_H) кодирует

10

последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO:

15

132. Согласно еще одному аспекту настоящего варианта реализации, переменный домен легкой цепи (V_L) кодирует SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 или SEQ ID NO: 91. Согласно еще одному аспекту настоящего варианта реализации, переменный домен легкой цепи (V_L) кодирует последовательность

20

нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 или SEQ ID NO: 91.

25

[060] Согласно другому варианту реализации, анти-SNAP-25 антитела включают участки CDR1, CDR2 и CDR3 переменного домена тяжелой цепи (V_H) или любые их комбинации, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A.

30

Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, участок CDR1 переменного домена тяжелой цепи (V_H) представляет собой SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 или SEQ ID NO: 120. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, участок CDR2 переменного домена тяжелой цепи (V_H) представляет собой SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98,

35

SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 или SEQ ID NO: 123. Согласно еще одному аспекту настоящего варианта реализации, участок CDR3 переменного домена тяжелой цепи (V_H) представляет собой SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 134 или SEQ ID NO: 135.

40

[061] Согласно другому варианту реализации, анти-SNAP-25 антитела включают участки CDR1, CDR2 и CDR3 переменного домена легкой цепи (V_L) или любые их комбинации, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A.

45

Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, участок CDR1 переменного домена легкой цепи (V_L) представляет собой 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 или SEQ ID NO: 129. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, участок CDR2 переменного домена легкой цепи (V_L) представляет собой SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO:

111 или SEQ ID NO: 112. Согласно еще одному аспекту настоящего варианта реализации, участок CDR3 переменного домена легкой цепи (V_L) представляет собой SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 или SEQ ID NO: 117.

[062] Согласно еще одному варианту реализации, анти-SNAP-25 антитела специфически связываются с эпитопом, содержащим SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A.

Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, эпитоп включает SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, эпитоп включает SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44.

[063] Как обсуждалось выше, последовательность, окружающая сайт расщепления BoNT/A, присутствующий в SNAP-25, обозначена как $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$, где P_1-P_1' означает разрезаемую связь. После расщепления BoNT/A образующиеся продукты расщепления содержат фрагмент, включающий последовательность $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$, и фрагмент, включающий $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$. В настоящей заявке термин анти-SNAP-25 антитела, которые специфически связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A" относится к антителам α -SNAP-25, которые специфически связываются с любым фрагментом продукта расщепления SNAP-25, содержащим последовательность $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$, но не с любым фрагментом продукта расщепления SNAP-25, содержащим последовательность $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$, или любым SNAP-25, у которого присутствует в интактном виде разрезаемая связь P_1-P_1' в сайте расщепления BoNT/A. В настоящей заявке термин "анти-SNAP-25 антитела₁₉₇" относится к антителам, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 , соответствующий глутамину 197 из SEQ ID NO: 5. В настоящей заявке термин "анти-SNAP-25 антитела₂₀₄" относится к антителам, которые избирательно связываются со SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_1 , соответствующий лизину 204 из SEQ ID NO: 16.

[064] В настоящей заявке термин "избирательно" относится к уникальному эффекту или влиянию или способности реагировать только одним определенным образом или только с одним определенным партнером. В настоящей заявке термин "избирательно связывается" или "избирательное связывание" в отношении антител относится к селективному связыванию антител с указанным эпитопом-мишенью, такому, что антитела существенным образом не проявляют перекрестной реактивности по отношению к эпитопам, не являющимся мишенями. Согласно настоящей заявке минимальный размер пептидного эпитопа составляет около пяти аминокислот, и пептидный эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20 аминокислот. Пептидный эпитоп может быть прерывистым, т.е. содержать остатки аминокислот, которые расположены не рядом друг с другом в первичной структуре пептида, но объединены в эпитоп посредством вторичной, третичной или четвертичной структуры пептида. Кроме того, отмечают, что эпитоп может включать часть молекулы, не являющуюся последовательностью аминокислот, как, например, углеводную группу, липидную группу, как у липопротеинов

или гликолипидов, или химически модифицированную аминокислотную группу, например, фосфорилированную аминокислоту. Согласно некоторым аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток Р, разрезаемой связи в сайте расщепления ВоNT/A, способны избирательно связываться с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток Р₁ разрезаемой связи в сайте расщепления ВоNT/A, который включает по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20 аминокислот. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток Р₁ разрезаемой связи в сайте расщепления ВоMT/A, способны избирательно связываться с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток Р₁ разрезаемой связи в сайте расщепления ВоNT/A, который включает самое большее 5, самое большее 6, самое большее 7, самое большее 8, самое большее 9, самое большее 10, самое большее 15 или самое большее 20 аминокислот.

[065] Избирательное связывание включает такие свойства связывания, как например аффинность связывания, специфичность связывания и авидность связывания. См. David J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, pp.240 (1998). Аффинность связывания относится к длительности нахождения антитела в сайте связывания соответствующего эпитопа, и ее можно рассматривать как силу, с которой антитело связывается со своим эпитопом. Аффинность связывания можно описать с помощью равновесной константы диссоциации антитела (KD), которая определяется как отношение Kd/Ka в состоянии равновесия, где Ka представляет собой константу скорости ассоциации антитела, а Kd - константу скорости диссоциации антитела. Аффинность связывания определяется как ассоциацией, так и диссоциацией, и по отдельности ни высокая степень ассоциации, ни низкая степень диссоциации не может гарантировать высокую аффинность. Константа скорости ассоциации (Ka), или константа скорости прямой реакции (Kon), является мерой числа событий связывания за единицу времени или склонности антитела и антигена подвергаться обратимой ассоциации с образованием комплекса антитело-антиген. Константа скорости ассоциации выражается в М⁻¹с⁻¹ и обозначается следующим образом: [Ab]×[Ag]×Kon. Чем больше константа скорости ассоциации, тем быстрее антитело связывается с антигеном или тем выше аффинность связывания между антителом и антигеном. Константа скорости диссоциации (Kd), или константа скорости обратной реакции (Koff), является мерой числа событий диссоциации за единицу времени или склонности комплекса антитело-антиген обратимо разделяться (диссоциировать) на молекулярные компоненты, а именно антитело и антиген.

Константа скорости диссоциации выражается в с⁻¹ и обозначается следующим образом: [Ab+Ag]×Koff. Чем меньше константа скорости диссоциации, тем более прочно антитело связано с антигеном или тем выше аффинность связывания между антителом и антигеном. Равновесная константа диссоциации (KD) является мерой скорости, с которой образуются новые комплексы антитело-антиген, равной скорости, с которой комплексы антитело-антиген подвергаются диссоциации, в равновесном состоянии. Равновесная константа диссоциации выражается в М и определяется как Koff/Kon=[Ab]×[Ag]/[Ab+Ag], где [Ab] соответствует молярной концентрации антитела, [Ag] соответствует молярной концентрации антигена, а [Ab+Ag] соответствует молярной концентрации комплекса антитело-антиген, при этом все концентрации соответствуют равновесному

состоянию. Чем меньше равновесная константа диссоциации, тем более прочно антитело связано с антигеном или тем выше аффинность связывания между антителом и антигеном.

[066] Таким образом, согласно одному варианту реализации, аффинность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoMT/A, может характеризоваться константой скорости ассоциации, которая составляет, например, менее $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менее $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менее $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или менее $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Согласно другому варианту реализации, аффинность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться константой скорости ассоциации, которая составляет, например, более $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, более $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, более $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или более $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Согласно другим аспектам, аффинность связывания аНТН-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P, разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться константой скорости ассоциации, которая находится в диапазоне от $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, от $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, от $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или от $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

[067] Согласно другому варианту реализации, аффинность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться константой скорости диссоциации, которая составляет менее $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, менее $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ или менее $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, аффинность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться константой скорости диссоциации, которая составляет, например, менее $1,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менее $2,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менее $3,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менее $4,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менее $5,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менее $6,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менее $7,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, менее $8,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ или менее $9,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$. Согласно другому варианту реализации, аффинность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться константой скорости диссоциации, которая составляет, например, более $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, более $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ или более $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, аффинность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться константой скорости диссоциации, которая составляет, например, более $1,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, более $2,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, более $3,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, более $4,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, более $5,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, более $6,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, более $7,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, более $8,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ или более $9,0 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$.

[068] Согласно другому варианту реализации, аффинность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном

конец которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться равновесной константой диссоциации, которая составляет менее 0,500 нМ. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, аффинность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться равновесной константой диссоциации, которая составляет, например, менее 0,500 нМ, менее 0,450 нМ, менее 0,400 нМ, менее 0,350 нМ, менее 0,300 нМ, менее 0,250 нМ, менее 0,200 нМ, менее 0,150 нМ, менее 0,100 нМ или менее 0,050 нМ. Согласно другому варианту реализации, аффинность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться равновесной константой диссоциации, которая составляет более 0,500 нМ. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, аффинность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться равновесной константой диссоциации, которая составляет, например, более 0,500 нМ, более 0,450 нМ, более 0,400 нМ, более 0,350 нМ, более 0,300 нМ, более 0,250 нМ, более 0,200 нМ, более 0,150 нМ, более 0,100 нМ или более 0,050 нМ.

[069] Согласно еще одному варианту реализации, аффинность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться константой скорости ассоциации для интактного SNAP-25, которая составляет, например, менее $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менее $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менее $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менее $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или менее $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Согласно другому варианту реализации, аффинность связывания ам-n-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, может характеризоваться константой скорости ассоциации для интактного SNAP-25, которая составляет, например, не более $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, не более $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, не более $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, не более $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или не более $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

[070] Специфичность связывания представляет собой способность антител отличать молекулы, содержащие эпитоп данного антитела, от молекул, не содержащих этот эпитоп. Одним из способов измерения специфичности связывания является сравнение скорости ассоциации антитела K_{оп} для молекулы, содержащей эпитоп данного антитела, со скоростью ассоциации антитела K_{оп} для молекулы, которая не содержит этот эпитоп. Например, сравнение константы скорости ассоциации (K_а) анти-SNAP-25 антител для эпитопа SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, со SNAP-25, не содержащим этот эпитоп, таким как, например, эпитоп SNAP-25, на карбоксильном конце которого отсутствует остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, или эпитоп SNAP-25, содержащий интактную разрезаемую связь P₁-P₁' в сайте расщепления VoNT/A. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, характеризуются константой

5 скорости ассоциации (Ka) для SNAP-25, не содержащего соответствующий эпитоп(ы), которая составляет, например, менее $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менее $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менее $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, менее $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или менее $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, характеризуются константой скорости ассоциации (Ka) для SNAP-25, не содержащего соответствующий эпитоп(ы), которая составляет, например, не более $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, не более $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, не более $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, не более $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или не более $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

10 [071] Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, характеризуются константой скорости ассоциации (Ka) для соответствующего им эпитопа, которая, например, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз или по меньшей мере в 9 раз больше по сравнению со значением для SNAP-25, не содержащего этот эпитоп. Согласно дальнейшим аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, характеризуются константой скорости ассоциации (Ka) для соответствующего им эпитопа, которая, например, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или по меньшей мере в 10000 раз больше по сравнению со значением для SNAP-25, не содержащего этот эпитоп. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, характеризуются константой скорости ассоциации (Ka) для соответствующего им эпитопа, которая, например, не более чем однократно, не более чем в 2 раза, не более чем в 3 раза, не более чем в 4 раза, не более чем в 5 раз, не более чем в 6 раз, не более чем в 7 раз, не более чем в 8 раз или не более чем в 9 раз превышает значение для SNAP-25, не содержащего этот эпитоп. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, характеризуются константой скорости ассоциации (Ka) для соответствующего им эпитопа, которая, например, не более чем в 10 раз, не более чем в 100 раз, не более чем в 1000 раз или не более чем в 10000 раз превышает значение для SNAP-25, не содержащего этот эпитоп.

40 [072] Специфичность связывания анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, можно также охарактеризовать как отношение, с которым данные анти-SNAP-25 антитела способны отличать соответствующий им эпитоп SNAP-25 от SNAP-25, не содержащих этот эпитоп, таких как, например, эпитоп SNAP-25, на карбоксильном конце которого отсутствует остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, или эпитоп SNAP-25, содержащий интактную разрезаемую связь P₁-P₁' в сайте расщепления VoNT/A. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно

связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, характеризуются отношением специфичности связывания соответствующего эпитопа SNAP-25 по сравнению со связыванием SNAP-25, не содержащих этот эпитоп, составляющим, например, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 3:1, по меньшей мере 4:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 6:1, по меньшей мере 7:1, по меньшей мере 8:1, по меньшей мере 9:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 30:1, по меньшей мере 35:1 или по меньшей мере 40:1. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, характеризуются отношением специфичности связывания соответствующего эпитопа SNAP-25 по сравнению со связыванием SNAP-25, на карбоксильном конце которого отсутствует остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, составляющим, например, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 3:1, по меньшей мере 4:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 6:1, по меньшей мере 7:1, по меньшей мере 8:1, по меньшей мере 9:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 30:1, по меньшей мере 35:1 или по меньшей мере 40:1. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, характеризуются отношением специфичности связывания соответствующего эпитопа SNAP-25 по сравнению со связыванием SNAP-25, содержащего интактную разрезаемую связь P₁-P₁' в сайте расщепления VoNT/A, составляющим, например, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 3:1, по меньшей мере 4:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 6:1, по меньшей мере 7:1, по меньшей мере 8:1, по меньшей мере 9:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 30:1, по меньшей мере 35:1 или по меньшей мере 40:1.

[073] Авидность связывания, также известная как функциональная аффинность, относится к суммарной общей силе функционального связывания антигена мультивалентным антителом. Молекулы антитела могут иметь более одного участка связывания (например, 2 в случае IgG, 10 в случае IgM), и многие антигены содержат более одного антигенного участка. В то время как авидность антитела зависит от аффинностей связывания индивидуальных участков связывания антитела, авидность связывания превышает аффинность связывания, т.к. для полной диссоциации антитела от антигена необходим одновременный разрыв всех взаимодействий антитело-антиген. Предполагается, что анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, способны избирательно связываться всеми без исключения эпитопами, соответствующими данным антителам.

[074] Таким образом, согласно одному варианту реализации, анти-SNAP-25 антитела представляют собой анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела представляют собой анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится глутамин, или анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются

с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится лизин. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела представляют собой анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁, соответствующий глутамину 197 из SEQ ID NO: 5, или анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁, соответствующий лизину 204 из SEQ ID NO: 16. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, анти-SNAP-25 антитела представляют собой анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится последовательность аминокислот из 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 или SEQ ID NO: 46.

[075] Часть аспектов настоящего описания включает иммунологический способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью. Иммунологические способы, описанные в настоящей заявке, можно оценивать с помощью нескольких параметров, включая, например, погрешность, разброс результатов, предел детектирования (ПД), пределы количественного измерения (ПКИ), диапазон, специфичность, избирательность, линейность, надежность и пригодность системы. Погрешность способа является мерой точности аналитического метода или близости соответствия между измеренным значением и значением, которое принято в качестве действительного значения или опорного значения. Разброс результатов способа представляет собой степень соответствия между результатами индивидуальных тестов, повторно проведенных на многократных пробах, взятых из гомогенного образца. В связи с этим, рассеяние результатов является оценкой 1) изменчивости в пределах одного теста; 2) изменчивости в пределах одного дня (повторяемости); и 3) изменчивости между разными днями (внутрилабораторной погрешности); и 4) межлабораторной изменчивости (воспроизводимости). Коэффициент вариации (CV%) является количественным показателем разброса результатов, выраженным относительно наблюдаемого или теоретического среднего значения.

[076] Иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, должен быть способен детектировать присутствие комплекса антитело α -SNAP-25-антиген, включающего SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, с учетом фона. Предел детектирования (ПД) способа относится к концентрации анализируемого вещества, которое вызывает появление сигнала, значительно отличающегося от отрицательного контроля или холостой пробы и соответствующего наименьшей концентрации анализируемого вещества, которую можно отличить от фона.

[077] Таким образом, согласно одному варианту реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, способен детектировать ПД эндопептидаз с измененной нацеленностью в количестве, которое значительно отличается от отрицательного контроля или холостой пробы. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПД, например, 10 нг или менее, 9 нг или менее, 8 нг или менее, 7 нг или менее, 6 нг или менее, 5 нг или менее, 4 нг или менее, 3 нг или менее, 2 нг или менее, 1 нг или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей

заявке, характеризуется ПД, например, 900 пг или менее, 800 пг или менее, 700 пг или менее, 600 пг или менее, 500 пг или менее, 400 пг или менее, 300 пг или менее, 200 пг или менее, 100 пг или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно
 5 дальнейшим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПД, например, 90 пг или менее, 80 пг или менее, 70 пг или менее, 60 пг или менее, 50 пг или менее, 40 пг или менее, 30 пг или менее, 20 пг или менее, 10 пг или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПД, например, 9 пг или менее, 8 пг
 10 или менее, 7 пг или менее, 6 пг или менее, 5 пг или менее, 4 пг или менее, 3 пг или менее, 2 пг или менее, 1 пг или менее эндопептидазы нацеленностью с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПД, например, 0,9 пг или менее, 0,8 пг или менее, 0,7 пг или менее, 0,6 пг или менее, 0,5 пг
 15 или менее, 0,4 пг или менее, 0,3 пг или менее, 0,2 пг или менее, 0,1 пг или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью.

[078] Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПД, например, 100 нМ или менее, 90 нМ или менее, 80 нМ или менее, 70 нМ или менее, 60 нМ или менее, 50 нМ
 20 или менее, 40 нМ или менее, 30 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 9 нМ или менее, 8 нМ или менее, 7 нМ или менее, 6 нМ или менее, 5 нМ или менее, 4 нМ или менее, 3 нМ или менее, 2 нМ или менее или 1 нМ или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПД, например, 900 пМ или менее, 800 пМ или менее, 700 пМ или менее, 600 пМ или менее, 500 пМ или менее, 400 пМ или менее, 300 пМ или менее, 200 пМ или менее или 100 пМ
 25 или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПД, например, 100 пМ или менее, 90 пМ или менее, 80 пМ или менее, 70 пМ или менее, 60 пМ или менее, 50 пМ или менее, 40 пМ или менее, 30 пМ
 30 или менее, 20 пМ или менее или 10 пМ или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПД, например, 10 пМ или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью, 9 пМ или
 35 менее, 8 пМ или менее, 7 пМ или менее, 6 пМ или менее, 5 пМ или менее, 4 пМ или менее, 3 пМ или менее, 2 пМ или менее или 1 пМ или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью.

[079] Пределы количественного измерения (ПКИ) представляют собой наименьшие и наибольшие концентрации анализируемого вещества в образце или препарате, которые
 40 можно измерить с допустимым уровнем погрешности и разброса результатов. Нижний предел количественного измерения относится к наименьшей дозе, которую метод детектирования способен единообразно измерять на уровне фона. Верхний предел количественного измерения представляет собой наибольшую дозу, которую метод детектирования способен единообразно измерять до наступления насыщения сигнала.
 45 Линейный диапазон способа представляет собой область между нижним и верхним пределом количественного измерения. Линейный диапазон вычисляют путем вычитания нижнего предела количественного измерения из верхнего предела количественного измерения. В настоящей заявке термин "отношение сигнала к шуму для нижней

асимптоты" относится к сигналу, детектируемому данным способом на нижнем пределе детектирования, деленному на фоновый сигнал. В настоящей заявке термин "отношение сигнала к шуму для верхней асимптоты" относится к сигналу, детектируемому данным способом на верхнем пределе детектирования, деленному на фоновый сигнал.

5 [080] Таким образом, согласно одному варианту реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, способен детектировать ПКИ эндопептидазы с измененной нацеленностью в количестве, которое значительно отличается от отрицательного контроля или холостой пробы. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке,
10 характеризуется ПКИ, например, 10 нг или менее, 9 нг или менее, 8 нг или менее, 7 нг или менее, 6 нг или менее, 5 нг или менее, 4 нг или менее, 3 нг или менее, 2 нг или менее, 1 нг или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПКИ, например, 900 пг или менее, 800 пг или менее, 700 пг или
15 менее, 600 пг или менее, 500 пг или менее, 400 пг или менее, 300 пг или менее, 200 пг или менее, 100 пг или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно дальнейшим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПКИ, например, 90 пг или менее, 80 пг или менее, 70 пг или менее, 60 пг или менее, 50 пг или менее, 40 пг или менее, 30 пг
20 или менее, 20 пг или менее, 10 пг или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПКИ, например, 9 пг или менее, 8 пг или менее, 7 пг или менее, 6 пг или менее, 5 пг или менее, 4 пг или менее, 3 пг или менее, 2 пг или менее, 1 пг или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно
25 другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПКИ, например, 0,9 пг или менее, 0,8 пг или менее, 0,7 пг или менее, 0,6 пг или менее, 0,5 пг или менее, 0,4 пг или менее, 0,3 пг или менее, 0,2 пг или менее, 0,1 пг или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью.

30 [081] Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПКИ, например, 100 нМ или менее, 90 нМ или менее, 80 нМ или менее, 70 нМ или менее, 60 нМ или менее, 50 нМ или менее, 40 нМ или менее, 30 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 9 нМ или менее, 8 нМ или менее, 7 нМ или менее, 6 нМ или менее, 5 нМ или менее, 4 нМ или
35 менее, 3 нМ или менее, 2 нМ или менее или 1 нМ или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПКИ, например, 900 пМ или менее, 800 пМ или менее, 700 пМ или менее, 600 пМ или менее, 500 пМ или менее, 400 пМ или менее, 300 пМ или менее, 200 пМ или менее или 100 пМ
40 или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПКИ, например, 100 пМ или менее, 90 пМ или менее, 80 пМ или менее, 70 пМ или менее, 60 пМ или менее, 50 пМ или менее, 40 пМ или менее, 30 пМ или менее, 20 пМ или менее или 10 пМ или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации,
45 иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется ПКИ, например, 10 пМ или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью, 9 пМ или менее, 8 пМ или менее, 7 пМ или менее, 6 пМ или менее, 5 пМ или менее, 4 пМ или

менее, 3 пМ или менее, 2 пМ или менее или 1 пМ или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью.

[082] В иммунологическом тесте, подходящем для применения в практическом аспекте описанных способов, должен наблюдаться разброс результатов, не превышающий 50%. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, в иммунологическом тесте 5 наблюдается разброс результатов, не превышающий 50%, не превышающий 40%, не превышающий 30% или не превышающий 20%. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, в иммунологическом тесте наблюдается разброс результатов, не превышающий 15%, не превышающий 10% или не превышающий 5%. Согласно другим 10 аспектам настоящего варианта реализации, в иммунологическом тесте наблюдается разброс результатов, не превышающий 4%, не превышающий 3%, не превышающий 2% или не превышающий 1%.

[083] Иммунологический тест, подходящий для применения в осуществлении описанных способов, должен иметь точность по меньшей мере 50%. Согласно аспектам 15 настоящего варианта реализации, иммунологический тест имеет точность по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80%. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический тест имеет точность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический тест 20 имеет точность по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[084] Иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, должен характеризоваться статистически значимым отношением сигнала к шуму для нижней 25 асимптоты и статистически значимым отношением сигнала к шуму для верхней асимптоты. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, характеризуется отношением сигнала к шуму для нижней асимптоты, составляющим, например, по меньшей мере 3:1, по меньшей мере 4:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 6:1, по меньшей мере 7:1, по меньшей мере 8:1, по меньшей мере 9:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1 или по 30 меньшей мере 20:1. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, иммунологический способ характеризуется отношением сигнала к шуму для верхней асимптоты, составляющим, например, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 30:1, по меньшей мере 35:1, по меньшей мере 40:1, по меньшей мере 45:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 60:1, по меньшей мере 70:1, по меньшей мере 80:1, по меньшей мере 90:1 или по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 150:1, по меньшей мере 200:1, по меньшей мере 250:1, по 35 меньшей мере 300:1, по меньшей мере 350:1, по меньшей мере 400:1, по меньшей мере 450:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 550:1 или по меньшей мере 600:1.

[085] Специфичность способа определяет способность способа измерять 40 представляющее интерес анализируемое вещество, за исключением других сопутствующих компонентов, таких как, например, частично активное или неактивное анализируемое вещество. Селективность способа описывает способность аналитического метода различать различные вещества в образце. Линейность способа соответствует его способности давать результаты, которые напрямую, или с помощью однозначно 45 определенного математического преобразования, пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образце. Таким образом, согласно одному варианту реализации, иммунологический способ, описанный в настоящей заявке, способен отличать полностью активную эндопептидазу с измененной нацеленностью от частично

активной эндопептидазы с измененной нацеленностью, обладающей, например, 70% или менее, 60% или менее, 50% или менее, 40% или менее, 30% или менее, 20% или менее или 10% или менее активности полностью активной эндопептидазы с измененной нацеленностью.

5 [086] Надежность способа представляет собой воспроизводимость результатов теста, полученных для идентичных образцов при нормальных (но изменяющихся) условиях
теста. Устойчивость процедуры является мерой ее способности оставаться
невосприимчивой в отношении небольших, но намеренных изменений параметров
10 способа и представляет собой показатель его надежности при нормальном
использовании. Таким образом, в то время как надежность оценивает неизбежные
изменения, устойчивость оценивает намеренные изменения. Типичные параметры,
оцениваемые с помощью показателей надежности и устойчивости, включают эффекты
замораживания/оттаивания, времени инкубации, температуры инкубации, долговечности
15 реагента, приготовления образца, хранения образца, числа клеточных пассажей, партии
эндопептидазы с измененной нацеленностью, изменчивости между очистками и
изменчивости между реакциями расщепления. Параметры устойчивости для клеточных
тестов включают банк клеток (начало, середина и конец замораживания), уровень
клеточного пассажа, плотность посева клеток, плотность маточного раствора клеток
(количество дней в культуре), возраст клеток во флаконе (время ожидания до посева),
20 время инкубации, различия между планшетами, чрезмерные количества сыворотки и
источник реагентов. Пригодность системы данного способа определяет
эксплуатационные качества теста во времени, включая эксплуатационные качества
реагентов и инструментов, путем анализа эталонного стандарта или эталонной
молекулы. Пригодность системы в руководстве FDA выделена в том отношении, что
25 оборудование, электроника, эксплуатационные качества теста и образцы для анализа
составляют единую систему. Пригодность системы можно оценить путем анализа на
параллелизм, который заключается в том, что при построении графика зависимости
ответа от логарифма дозы кривые графиков серийных разведении эталона и серийных
разведении образцов должны быть параллельны.

30 [087] Часть аспектов настоящего описания относится к клетке из стабильной
клеточной линии. В настоящей заявке термин "клетка" относится к любой
эукариотической клетке, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной
нацеленностью, или любой эукариотической клетке, которая способна поглощать
эндопептидазы с измененной нацеленностью. Термин "клетка" охватывает клетки из
35 множества организмов, такие как, например, клетки мышей, крыс, свиней, крупного
рогатого скота, лошадей, приматов и человека; из множества типов клеток, таких как,
например, нервные и не относящиеся к нервным; и клетки, которые могут быть
изолированы из гетерогенной популяции клеток, ткани или организма (целого или их
части). В настоящей заявке термин "стабильная клеточная линия" является синонимом
40 терминов "иммортилизованная клеточная линия" или "трансформированная клеточная
линия" и относится к культуре клеток, отобранных для неограниченного деления из
популяции клеток, полученной из организма, ткани или органа-источника. По
определению, стабильная клеточная линия не включает клеточную культуру первичных
клеток. В настоящей заявке термин "первичные клетки" включает клетки, собранные
45 непосредственно из свежих тканей или органов и не обладающие потенциалом
неограниченного деления. Стабильная клеточная линия может включать гетерогенную
популяцию клеток или однородную популяцию клеток. Стабильная клеточная линия,
полученная из единственной клетки, называется клональной клеточной линией.

Стабильная клеточная линия может представлять собой линию клеток, которые эндогенно экспрессируют все компоненты, необходимые для функционирования всего клеточного механизма, посредством которого эндопептидаза с измененной нацеленностью протеолитически расщепляет субстрат SNAP-25 и который включает связывание эндопептидазы с измененной нацеленностью с соответствующим рецептором, интернализацию комплекса эндопептидаза/рецептор, транслокацию легкой цепи эндопептидазы с измененной нацеленностью из внутриклеточного пузырька в цитоплазму и протеолитическое расщепление SNAP-25. В качестве альтернативы, стабильная клеточная линия может представлять собой линию клеток, в которые из внешнего источника был введен по меньшей мере один компонент, необходимый для полного функционирования клеточного механизма, посредством которого эндопептидаза с измененной нацеленностью протеолитически расщепляет субстрат SNAP-25 и который включает связывание эндопептидазы с измененной нацеленностью с соответствующим рецептором, интернализацию комплекса эндопептидаза/рецептор, транслокацию легкой цепи эндопептидазы с измененной нацеленностью из внутриклеточного пузырька в цитоплазму и протеолитическое расщепление SNAP-25. Клетки такой стабильной клеточной линии, также называемой генетически модифицированной клеточной линией, могут, например, экспрессировать экзогенную эндопептидазу с измененной нацеленностью, такую как, например, экзогенный ORL1, экзогенный DOR, экзогенный KOR, экзогенный MOR, экзогенный рецептор Галанина 1, экзогенный рецептор Галанина 2, экзогенный рецептор Галанина 3 или любую их комбинацию.

[088] Часть аспектов настоящей заявки включает клетку из стабильной клональной клеточной линии, чувствительную к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью. В настоящей заявке термин "клетка(ки), чувствительные к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью", "клетка(ки), чувствительные к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью с помощью эндопептидаз с измененной нацеленностью" или "клетка(ки) из стабильной клональной клеточной линии, чувствительные к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью с помощью эндопептидаз с измененной нацеленностью" относятся к клетке(кам), в которых может полностью функционировать клеточный механизм, посредством которого эндопептидаза с измененной нацеленностью протеолитически расщепляет субстрат SNAP-25, что приводит к ингибированию экзоцитоза, и который включает связывание эндопептидазы с измененной нацеленностью с соответствующим рецептором, интернализацию комплекса эндопептидаза/рецептор, транслокацию цепи эндопептидазы с измененной нацеленностью, обеспечивающей ее активность, из внутриклеточного пузырька в цитоплазму и протеолитическое расщепление SNAP-25. По определению, клетка(ки), чувствительная(ые) к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, должна (ы) экспрессировать, или быть сконструирована(ы) с обеспечением экспрессии, по меньшей мере один рецептор эндопептидазы с измененной нацеленностью и по меньшей мере один субстрат SNAP-25. В настоящей заявке термины "клетка(ки), способная поглощать эндопептидазы с измененной нацеленностью" или "клетка(ки), включающая стабильную клональную клеточную линию, которая может поглощать эндопептидазы с измененной нацеленностью" относятся к клеткам, в которых может полностью функционировать клеточный механизм, посредством которого эндопептидаза с измененной нацеленностью протеолитически расщепляет субстрат SNAP-25, тем самым ингибируя экзоцитоз, и который включает связывание эндопептидазы с измененной нацеленностью с соответствующим рецептором, интернализацию комплекса

эндопептидаза/рецептор, транслокацию легкой цепи эндопептидазы с измененной нацеленностью из внутриклеточного пузырька в цитоплазму и протеолитическое расщепление SNAP-25. По определению, клетка(ки), способная поглощать эндопептидазы с измененной нацеленностью, должна экспрессировать, или быть сконструирована с обеспечением экспрессии, по меньшей мере один рецептор эндопептидазы с измененной нацеленностью и по меньшей мере один субстрат SNAP-25.

[089] Таким образом, согласно одному варианту реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии чувствительны к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно некоторым аспектам этого варианта реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии чувствительны к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью при концентрации эндопептидазы с измененной нацеленностью, например, около 100 нМ или ниже, около 90 нМ или ниже, около 80 нМ или ниже, около 70 нМ или ниже, около 60 нМ или ниже, около 50 нМ или ниже, около 40 нМ или ниже, около 30 нМ или ниже, около 20 нМ или ниже или около 10 нМ или ниже. Согласно другим аспектам, клетки из стабильной клональной клеточной линии чувствительны к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью при концентрации эндопептидазы с измененной нацеленностью, например, около 9 нМ или ниже, около 8 нМ или ниже, около 7 нМ или ниже, около 6 нМ или ниже, около 5 нМ или ниже, около 4 нМ или ниже, около 3 нМ или ниже, около 2 нМ или ниже или около 1 нМ или ниже. Согласно прочим аспектам, клетки из стабильной клональной клеточной линии чувствительны к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью при концентрации эндопептидазы с измененной нацеленностью, например, около 0,9 нМ или ниже, около 0,8 нМ или ниже, около 0,7 нМ или ниже, около 0,6 нМ или ниже, около 0,5 нМ или ниже, около 0,4 нМ или ниже, около 0,3 нМ или ниже, около 0,2 нМ или около 0,1 нМ или ниже. В настоящей заявке термин "около" или "приблизительно" при количественной характеристике упоминаемого объекта, числа, процента или термина относится к диапазону плюс или минус десять процентов указанного значения количественной характеристики этого объекта, процента, параметра или термина.

[090] Согласно другому варианту реализации, клетки, включающие стабильную клональную клеточную линию, способны поглощать эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно аспектам этого варианта реализации, клетки, включающие стабильную клональную клеточную линию, способны поглощать, например, около 100 нМ или меньше, около 90 нМ или меньше, около 80 нМ или меньше, около 70 нМ или меньше, около 60 нМ или меньше, около 50 нМ или меньше, около 40 нМ или меньше, около 30 нМ или меньше, около 20 нМ или меньше, около 10 нМ или меньше эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам, клетки, включающие стабильную клональную клеточную линию, обладают способностью поглощать около 9 нМ или меньше, около 8 нМ или меньше, около 7 нМ или меньше, около 6 нМ или меньше, около 5 нМ или меньше, около 4 нМ или меньше, около 3 нМ или меньше, около 2 нМ или меньше или около 1 нМ или меньше эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам, клетки, включающие стабильную клональную клеточную линию, обладают способностью поглощать около 0,9 нМ или меньше, около 0,8 нМ или меньше, около 0,7 нМ или меньше, около 0,6 нМ или меньше, около 0,5 нМ или меньше, около 0,4 нМ или меньше, около 0,3 нМ или меньше, около 0,2 нМ или меньше или около 0,1 нМ или меньше эндопептидазы с измененной нацеленностью.

[091] Часть аспектов настоящего описания относится к клеткам из стабильной

клеточной линии, демонстрирующим избирательное связывание эндопептидаз с измененной нацеленностью, описанных в настоящей заявке. В настоящей заявке термин "избирательно связывается" или "избирательное связывание" в отношении эндопептидаз с измененной нацеленностью относится к исключительному связыванию эндопептидазы с измененной нацеленностью с указанным рецептором-мишенью, такому, что эндопептидаза с измененной нацеленностью существенным образом не связывается с рецепторами, которые не являются мишенями. Степень, с которой клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют избирательное связывание эндопептидаз с измененной нацеленностью, можно измерить с помощью степени, с которой эти клетки демонстрируют неизбирательное поглощение молекул, у которых отсутствует нацеливающий домен эндопептидаз с измененной нацеленностью. Одним из способов оценки неизбирательного поглощения молекул, у которых отсутствует нацеливающий домен эндопептидаз с измененной нацеленностью, является измерение неизбирательного поглощения фрагмента L_{HN} . Фрагмент L_{HN} содержит транслокационный домен токсина клостридий и ферментативный домен токсина клостридий, но не содержит какого-либо нацеливающего домена. Неограничивающие примеры фрагментов L_{HN} включают фрагмент L_{HN}/A , фрагмент L_{HN}/B , фрагмент L_{HN}/C , фрагмент L_{HN}/D , фрагмент L_{HN}/E , фрагмент L_{HN}/F и фрагмент L_{HN}/G . Примером фрагмента L_{HN}/A является SEQ ID NO: 146, который кодируется молекулой полинуклеотида SEQ ID NO: 147.

[092] Таким образом, согласно одному варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют избирательное связывание эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют избирательное связывание эндопептидазы с измененной нацеленностью, которая соответствует, например, по меньшей мере 75% общей активности, выявленной в тесте, по меньшей мере 80% общей активности, выявленной в тесте, по меньшей мере 85% общей активности, выявленной в тесте, по меньшей мере 90% общей активности, выявленной в тесте, или по меньшей мере 95% общей активности, выявленной в тесте. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют избирательное связывание эндопептидазы с измененной нацеленностью, которая соответствует, например, приблизительно от 75% до 100% общей активности, выявленной в тесте, приблизительно от 80% до 100% общей активности, выявленной в тесте, приблизительно от 85% до 100% общей активности, выявленной в тесте, приблизительно от 90% до 100% общей активности, выявленной в тесте.

[093] Согласно другому варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют минимальное неизбирательное поглощение фрагмента L_{HN} . Согласно аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют неизбирательное поглощение фрагмента L_{HN} , которое составляет, например, не более 25% общего поглощения, выявленного в тесте, не более 20% общего поглощения, выявленного в тесте, не более 15% общего поглощения, выявленного в тесте, не более 10% общего поглощения, выявленного в тесте, или не более 5% общего поглощения, выявленного в тесте. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют неизбирательное поглощение фрагмента L_{HN} , которое составляет, например, приблизительно от 0% до 25% общего поглощения, выявленного в тесте, приблизительно от 0% до 20% общего поглощения, выявленного в тесте, приблизительно от 0% до 15% общего поглощения, выявленного в тесте, приблизительно от 0% до 10% общего поглощения, выявленного в тесте.

в тесте, или приблизительно от 0% до 5% общего поглощения, выявленного в тесте.

[094] Согласно еще одному варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют минимальное неизбирательное поглощение фрагмента LH_N/A .

5 Согласно аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют неизбирательное поглощение фрагмента LH_N/A , которое составляет, например, не более 25% общего поглощения, выявленного в тесте, не более 20% общего поглощения, выявленного в тесте, не более 15% общего поглощения, выявленного в тесте, не более 10% общего поглощения, выявленного в тесте, или не
10 более 5% общего поглощения, выявленного в тесте. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют неизбирательное поглощение фрагмента LH_N/A , которое составляет, например, приблизительно от 0% до 25% общего поглощения, выявленного в тесте, приблизительно от 0% до 20% общего поглощения, выявленного в тесте, приблизительно от 0% до 15% общего поглощения, выявленного в тесте, приблизительно от 0% до 10% общего
15 поглощения, выявленного в тесте, или приблизительно от 0% до 5% общего поглощения, выявленного в тесте.

[095] Часть аспектов настоящего описания относится к клеткам из стабильной клеточной линии, экспонирующим достаточное число рецепторных участков связывания
20 на плазматической мембране, что обеспечивает чувствительное и избирательное связывание эндопептидаз с измененной нацеленностью. В тесте связывания с равновесным насыщением измеряют полное и неспецифическое связывание лиганда при различных концентрациях. Равновесная константа диссоциации (K_d) лиганда и максимальное число рецепторных участков связывания, B_{max} , можно вычислить на
25 основании данных по специфическому связыванию с использованием нелинейного регрессионного анализа. Специфическое связывание вычисляют путем вычитания неспецифического связывания лиганда из наблюдаемого общего связывания. K_d представляет собой концентрацию лиганда, необходимую для достижения половины
30 максимального значения связывания, и измеряется в единицах молярной концентрации. B_{max} представляет собой максимальное число участков связывания, присутствующих на плазматической мембране, и измеряется в единицах пмоль/мг, пмоль/клетка, фмоль/клетка или сайты/клетка.

[096] Таким образом, согласно одному варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии экспонируют достаточное число рецепторных сайтов связывания на
35 плазматической мембране, что обеспечивает чувствительное и избирательное связывание эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют значение B_{max} , составляющее, например, по меньшей мере 0,1 фмоль/клетку, по меньшей мере 0,2 фмоль/клетку, по меньшей мере 0,3 фмоль/клетку, по меньшей мере 0,4 фмоль/клетку,
40 по меньшей мере 0,5 фмоль/клетку, по меньшей мере 0,6 фмоль/клетку, по меньшей мере 0,7 фмоль/клетку, по меньшей мере 0,8 фмоль/клетку, по меньшей мере 0,9 фмоль/клетку или по меньшей мере 1,0 фмоль/клетку для направления лиганда эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии демонстрируют значение B_{max} , составляющее, например, по меньшей мере 1 фмоль/клетку, по меньшей мере 2 фмоль/
45 клетку, по меньшей мере 3 фмоль/клетку, по меньшей мере 4 фмоль/клетку, по меньшей мере 5 фмоль/клетку, по меньшей мере 6 фмоль/клетку, по меньшей мере 7 фмоль/клетку, по меньшей мере 8 фмоль/клетку, по меньшей мере 9 фмоль/клетку или по

меньшей мере 10 фмоль/клетку для направления лиганда эндопептидазы с измененной нацеленностью.

[097] Часть аспектов настоящего описания включает клетки из стабильной клональной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, которые более стабильны, чем клетки из родительской клеточной линии, из которой была получена клональная клеточная линия. В настоящей заявке термин "стабильный" относится к клеткам из стабильной клональной клеточной линии, которые после определенного количества пассажей демонстрируют относительную EC_{50} , чувствительность, эффективность, четко выраженную верхнюю асимптоту и/или четко выраженную кривую доза-эффект активности эндопептидазы с измененной нацеленностью, сходные со значениями относительной EC_{50} , чувствительности, эффективности, четко выраженной верхней асимптоты и/или четко выраженной кривой доза-эффект, демонстрируемыми клетками из родительской клеточной линии, из которой была получена клональная клеточная линия, после равного или близкого количества пассажей, причем в обоих тестах используются идентичные условия и идентичные эндопептидазы с измененной нацеленностью.

[098] Таким образом, согласно одному варианту реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии более стабильны, чем клетки из родительской клеточной линии, из которой была получена клональная клеточная линия. Согласно одному аспекту этого варианта реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии более стабильны, чем родительская клеточная линия SK-N-DZ. Согласно другим аспектам этого варианта реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии более стабильны, чем родительская клеточная линия SK-N-DZ ATCC CRL-2149. Согласно другим аспектам этого варианта реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии более стабильны в течение, например, по меньшей мере еще 5 пассажей, по меньшей мере еще 10 пассажей, по меньшей мере еще 15 пассажей, по меньшей мере еще 20 пассажей, по меньшей мере еще 25 пассажей или по меньшей мере еще 30 пассажей по сравнению с клетками из родительской клеточной линии, из которой была получена клональная клеточная линия. Согласно другим аспектам этого варианта реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии более стабильны в течение, например, по меньшей мере еще 5 пассажей, по меньшей мере еще 10 пассажей, по меньшей мере еще 15 пассажей, по меньшей мере еще 20 пассажей, по меньшей мере еще 25 пассажей или по меньшей мере еще 30 пассажей по сравнению с клетками из родительской клеточной линии, из которой была получена клональная клеточная линия.

[099] Часть аспектов настоящего описания включает клетки из стабильной клональной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, которые стабильны в течение множества клеточных пассажей. В настоящей заявке термин "стабильный" относится к клеткам из стабильной клональной клеточной линии, которые после определенного количества пассажей демонстрируют относительную EC_{50} , чувствительность, эффективность, четко выраженную верхнюю асимптоту и/или четко выраженную кривую доза-эффект активности эндопептидазы с измененной нацеленностью, сходные со значениями относительной EC_{50} , чувствительности, эффективности, четко выраженной верхней асимптоты и/или четко выраженной кривой доза-эффект, демонстрируемыми клетками из той же самой стабильной клональной клеточной линии, но из предыдущего пассажа или пассажей, причем в обоих тестах используются идентичные условия и идентичные эндопептидазы с измененной нацеленностью.

[0100] Клетки из стабильной клеточной линии, описанные в настоящей заявке, способны демонстрировать устойчивую чувствительность к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью в течение множества клеточных пассажей. В настоящей заявке термин "чувствительность к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью" относится к самой низкой дозе, которая может быть стабильно измерена в тесте и которая превышает уровень сигнала, измеряемого в необработанном контроле, или фонового сигнала.

[0101] Таким образом, согласно одному варианту реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии демонстрируют чувствительность к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью для любых данных пассажей, которая составляет, например, 100 нМ или ниже, около 80 нМ или ниже, около 70 нМ или ниже, около 60 нМ или ниже, около 50 нМ или ниже, около 40 нМ или ниже, около 30 нМ или ниже, около 20 нМ или ниже, около 10 нМ или ниже, около 1 нМ или ниже, около 0,9 нМ или ниже, около 0,8 нМ или ниже, около 0,7 нМ или ниже, около 0,6 нМ или ниже, около 0,5 нМ или ниже, около 0,4 нМ или ниже, около 0,3 нМ или ниже, около 0,2 нМ или ниже или около 0,1 нМ или ниже. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии демонстрируют чувствительность к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью для любых данных пассажей, которая составляет, например, приблизительно от 0,01 нМ до 100 нМ, приблизительно от 0,01 нМ до 75 нМ, приблизительно от 0,01 нМ до 50 нМ, приблизительно от 0,01 нМ до 25 нМ, приблизительно от 0,01 нМ до 20 нМ, приблизительно от 0,01 нМ до 15 нМ, приблизительно от 0,01 нМ до 10 нМ, приблизительно от 0,01 нМ до 5 нМ, приблизительно от 0,001 нМ до 100 нМ, приблизительно от 0,001 нМ до 75 нМ, приблизительно от 0,001 нМ до 50 нМ, приблизительно от 0,001 нМ до 25 нМ, приблизительно от 0,001 нМ до 20 нМ, приблизительно от 0,001 нМ до 15 нМ, приблизительно от 0,001 нМ до 10 нМ или приблизительно от 0,001 нМ до 5 нМ.

[0102] Согласно другому варианту реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии демонстрируют чувствительность к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, которая составляет около 100 нМ или ниже, около 75 нМ или ниже, около 50 нМ или ниже, около 25 нМ или ниже, около 20 нМ или ниже, около 15 нМ или ниже, около 10 нМ или ниже или около 1 нМ или ниже, в течение, например, 5 или более клеточных пассажей, 10 или более клеточных пассажей, 15 или более клеточных пассажей, 20 или более клеточных пассажей, 25 или более клеточных пассажей, 30 или более клеточных пассажей, 35 или более клеточных пассажей, 40 или более клеточных пассажей, 45 или более клеточных пассажей или 50 или более клеточных пассажей. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии демонстрируют чувствительность к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, которая составляет около 100 нМ или ниже, около 75 нМ или ниже, около 50 нМ или ниже, около 25 нМ или ниже, около 20 нМ или ниже, около 15 нМ или ниже, около 10 нМ или ниже или около 1 нМ или ниже, в течение, например, приблизительно от 15 до 60 пассажей, приблизительно от 20 до 60 пассажей, приблизительно от 25 до 60 пассажей, приблизительно от 30 до 60 пассажей, приблизительно от 35 до 60 пассажей, приблизительно от 40 до 60 пассажей, приблизительно от 45 до 60 пассажей, приблизительно от 50 до 60 пассажей, приблизительно от 15 до 50 пассажей, приблизительно от 20 до 50 пассажей, приблизительно от 25 до 50 пассажей, приблизительно от 30 до 50 пассажей, приблизительно от 35 до 50 пассажей, приблизительно от 40 до 50 пассажей,

приблизительно от 15 до 40 пассажей, приблизительно от 20 до 40 пассажей, приблизительно от 25 до 40 пассажей или приблизительно от 30 до 40 пассажей.

[0103] Клетки из стабильной клеточной линии, описанные в настоящей заявке, способны демонстрировать устойчивую относительную эффективность поглощения эндопептидаз с измененной нацеленностью или активность эндопептидаз с измененной нацеленностью в течение множества клеточных пассажей. В настоящей заявке термин "относительная эффективность" относится к степени совпадения верхней асимптоты активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, детектированной в текущем тесте, с верхней асимптотой активности эндопептидаз с измененной нацеленностью в эталонном стандарте, эталонной молекуле или эталонном числе пассажей, используемом в данном тесте. В настоящей заявке термин "отношение сигнала к шуму для верхней асимптоты" относится к сигналу, детектированному в тесте на верхнем пределе детектирования, деленному на сигнал, детектированный в необработанном контроле, или фоновый сигнал. Верхний предел детектирования представляет собой наивысшую дозу, которая может быть устойчиво измерена в тесте до наступления насыщения сигнала.

[0104] Таким образом, согласно одному варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии, описанные в настоящей заявке, способны демонстрировать четко выраженную верхнюю асимптоту в течение множества клеточных пассажей и поддерживать отношение сигнала к шуму, которое устойчиво и адекватно для теста. Согласно аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, описанные в настоящей заявке, должны обладать четко выраженным отношением сигнала к шуму для верхней асимптоты активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, составляющим, например, по меньшей мере 3:1, по меньшей мере 4:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 6:1, по меньшей мере 7:1, по меньшей мере 8:1, по меньшей мере 9:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 30:1, по меньшей мере 35:1, по меньшей мере 40:1, по меньшей мере 45:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 60:1, по меньшей мере 70:1, по меньшей мере 80:1, по меньшей мере 90:1 или по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 150:1, по меньшей мере 200:1, по меньшей мере 250:1, по меньшей мере 300:1, по меньшей мере 350:1, по меньшей мере 400:1, по меньшей мере 450:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 550:1 или по меньшей мере 600:1, в течение, например, 5 или более клеточных пассажей, 10 или более клеточных пассажей, 15 или более клеточных пассажей, 20 или более клеточных пассажей, 25 или более клеточных пассажей, 30 или более клеточных пассажей, 35 или более клеточных пассажей, 40 или более клеточных пассажей, 45 или более клеточных пассажей, или 50 или более клеточных пассажей. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, описанные в настоящей заявке, должны обладать четко выраженным отношением сигнала к шуму для верхней асимптоты активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, составляющим, например, по меньшей мере 3:1, по меньшей мере 4:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 6:1, по меньшей мере 7:1, по меньшей мере 8:1, по меньшей мере 9:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 25:1, по меньшей мере 30:1, по меньшей мере 35:1, по меньшей мере 40:1, по меньшей мере 45:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 60:1, по меньшей мере 70:1, по меньшей мере 80:1, по меньшей мере 90:1 или по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 150:1, по меньшей мере 200:1, по меньшей мере 250:1, по меньшей мере 300:1, по меньшей мере 350:1, по меньшей мере 400:1, по меньшей мере 450:1, по меньшей мере 500:1, по меньшей мере 550:1 или по

меньшей мере 600:1, в течение, например, приблизительно от 15 до 60 пассажей, приблизительно от 20 до 60 пассажей, приблизительно от 25 до 60 пассажей, приблизительно от 30 до 60 пассажей, приблизительно от 35 до 60 пассажей, приблизительно от 40 до 60 пассажей, приблизительно от 45 до 60 пассажей, приблизительно от 50 до 60 пассажей, приблизительно от 15 до 50 пассажей, приблизительно от 20 до 50 пассажей, приблизительно от 25 до 50 пассажей, приблизительно от 30 до 50 пассажей, приблизительно от 35 до 50 пассажей, приблизительно от 40 до 50 пассажей, приблизительно от 15 до 40 пассажей, приблизительно от 20 до 40 пассажей, приблизительно от 25 до 40 пассажей или приблизительно от 30 до 40 пассажей.

[0105] Клетки из стабильной клеточной линии, описанные в настоящей заявке, способны демонстрировать четко выраженную кривую доза-эффект для активности эндопептидаз с измененной нацеленностью в течение множества клеточных пассажей. В настоящей заявке термин "кривая доза-эффект" относится к степени соответствия исходных данных выбранной статистической модели для данного теста. В качестве неограничивающего примера можно привести сигмоидальную кривую с логистическим подбором на основе четырех параметров, которая представляет собой кривую доза-эффект для экспериментов по анализу ферментативной активности, таких как, например, тест на активность. В качестве другого неограничивающего примера можно привести кривую насыщения для связывания лиганда с одним сайтом, которая представляет собой кривую доза-эффект для экспериментов по связыванию лиганда/антитела.

[0106] Таким образом, согласно одному варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии, описанные в настоящей заявке, демонстрируют четко выраженную кривую доза-эффект для активности эндопептидаз с измененной нацеленностью в течение множества клеточных пассажей. Согласно аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, описанные в настоящей заявке, демонстрируют четко выраженную кривую доза-эффект для активности эндопептидаз с измененной нацеленностью в течение, например, 5 или более клеточных пассажей, 10 или более клеточных пассажей, 15 или более клеточных пассажей, 20 или более клеточных пассажей, 25 или более клеточных пассажей, 30 или более клеточных пассажей, 35 или более клеточных пассажей, 40 или более клеточных пассажей, 45 или более клеточных пассажей или 50 или более клеточных пассажей. Согласно другим аспектам настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, описанные в настоящей заявке, демонстрируют четко выраженную кривую доза-эффект для активности эндопептидаз с измененной нацеленностью в течение, например, приблизительно от 15 до 60 пассажей, приблизительно от 20 до 60 пассажей, приблизительно от 25 до 60 пассажей, приблизительно от 30 до 60 пассажей, приблизительно от 35 до 60 пассажей, приблизительно от 40 до 60 пассажей, приблизительно от 45 до 60 пассажей, приблизительно от 50 до 60 пассажей, приблизительно от 15 до 50 пассажей, приблизительно от 20 до 50 пассажей, приблизительно от 25 до 50 пассажей, приблизительно от 30 до 50 пассажей, приблизительно от 35 до 50 пассажей, приблизительно от 40 до 50 пассажей, приблизительно от 15 до 40 пассажей, приблизительно от 20 до 40 пассажей, приблизительно от 25 до 40 пассажей или приблизительно от 30 до 40 пассажей.

[0107] Клетки из стабильной клеточной линии, описанные в настоящей заявке, способны демонстрировать устойчивое относительное значение EC_{50} для активности эндопептидаз с измененной нацеленностью в течение множества клеточных пассажей. В настоящей заявке термин "относительная EC_{50} " или "относительное значение EC_{50} "

относится к значению EC_{50} для активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, нормированному относительно EC_{50} , рассчитанной для эталонного стандарта, эталонной молекулы или эталонного числа пассажей, используемого в данном тесте.

[0108] Таким образом, согласно одному варианту реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии демонстрируют устойчивую относительную EC_{50} для активности эндопептидаз с измененной нацеленностью в течение множества клеточных пассажей. Согласно аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии демонстрируют устойчивую относительную EC_{50} для активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, которая, например, составляет около $\pm 10\%$, около $\pm 20\%$, около $\pm 30\%$, около $\pm 40\%$, около $\pm 50\%$, около $\pm 60\%$, около $\pm 70\%$ или около $\pm 75\%$ относительной EC_{50} для активности эндопептидаз с измененной нацеленностью в течение, например, 5 или более клеточных пассажей, 10 или более клеточных пассажей, 15 или более клеточных пассажей, 20 или более клеточных пассажей, 25 или более клеточных пассажей, 30 или более клеточных пассажей, 35 или более клеточных пассажей, 40 или более клеточных пассажей, 45 или более клеточных пассажей или 50 или более клеточных пассажей. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клональной клеточной линии демонстрируют относительную EC_{50} для активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, которая, например, составляет приблизительно от $\pm 10\%$ до 75%, приблизительно от $\pm 10\%$ до 70%, приблизительно от $\pm 10\%$ до 60%, приблизительно от $\pm 10\%$ до 50%, приблизительно от $\pm 10\%$ до 40%, приблизительно от $\pm 10\%$ до 30% или приблизительно от $\pm 10\%$ до 20% относительной EC_{50} для активности эндопептидаз с измененной нацеленностью в течение, например, 5 или более клеточных пассажей, 10 или более клеточных пассажей, 15 или более клеточных пассажей, 20 или более клеточных пассажей, 25 или более клеточных пассажей, 30 или более клеточных пассажей, 35 или более клеточных пассажей, 40 или более клеточных пассажей, 45 или более клеточных пассажей или 50 или более клеточных пассажей.

[0109] Часть аспектов настоящего описания включает эндопептидазы с измененной нацеленностью. В настоящей заявке термин "эндопептидазы с измененной нацеленностью" является синонимом "Белки-Модуляторы Направленного Везикулярного Экзоцитоза" или "TVEMP". Неограничивающие примеры эндопептидаз с измененной нацеленностью описаны, например, в Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, патент США 6461617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, патент США 6632440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, патент США 6843998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, публикация патента США 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, публикация патента США 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, международная публикация патента WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, заявка на патент США №11/376696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США №11/776075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, заявка на патент США №11/829475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, публикация международной заявки WO 2006/059093; и Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, международная

публикация патента WO 2006/059105, каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Неограничивающие примеры эндопептидаз с измененной нацеленностью включают SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: 131.

5 [0110] Таким образом, согласно одному варианту реализации, источником детектируемой активности эндопептидазы с измененной нацеленностью является эндопептидаза с измененной нацеленностью. Согласно аспектам данного варианта реализации, источником детектируемой активности эндопептидазы с измененной нацеленностью является эндопептидаза с измененной нацеленностью, описанная в Keith
10 A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, патент США 6461617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, патент США 6632440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, патент США 6843998; Stephan Donovan,
15 Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, публикация заявки на патент США 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, публикация заявки на патент США 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, международная публикация патента WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent
20 Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, заявка на патент США №11/376696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США №11/776075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, заявка на патент США №11/829475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, международная публикация патента WO 2006/
25 059093; и Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, публикация международной заявки WO 2006/059105, содержание каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно аспектам данного варианта реализации, эндопептидазы с измененной нацеленностью представляют собой SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 131.

30 [0111] Согласно другому варианту реализации, источником детектируемой активности эндопептидазы с измененной нацеленностью является эндопептидаза с измененной нацеленностью, которая, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична по последовательности аминокислот эндопептидазе
35 с измененной нацеленностью, описанной в Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, патент США 6461617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, патент США 6632440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, патент США
40 6843998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, публикация патента США 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, публикация заявки на патент США 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, публикация международной заявки WO 2005/023309; Lance E. Steward
45 et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, заявка на патент США №11/376696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США №11/776075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, заявка на патент

США №11/829475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, публикация международной заявки WO 2006/059093; и Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, публикация международной заявки WO 2006/059105, каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно другому варианту реализации, источником детектируемой активности эндопептидазы с измененной нацеленностью является эндопептидаза с измененной нацеленностью, которая, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична по последовательности аминокислот эндопептидазе с измененной нацеленностью из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 131.

[0112] Согласно другим аспектам данного варианта реализации, источником детектируемой активности эндопептидазы с измененной нацеленностью является эндопептидаза с измененной нацеленностью, включающая не следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из эндопептидаз с измененной нацеленностью, описанных в Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, патент США 6461617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, патент США 6632440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, патент США 6843998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, публикация заявки на патент США 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, публикация заявки на патент США 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, публикация международной заявки WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, заявка на патент США №11/376696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США №11/776,075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, заявка на патент США №11/829,475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, публикация международной заявки WO 2006/059093; и Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, публикация международной заявки WO 2006/059105, содержание каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, источником детектируемой активности эндопептидазы с измененной нацеленностью является эндопептидаза с измененной нацеленностью, включающая не следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из эндопептидаз с измененной нацеленностью, описанных в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 131.

[0113] Согласно другим аспектам данного варианта реализации, источником детектируемой активности эндопептидазы с измененной нацеленностью является не встречающийся в природе вариант эндопептидазы с измененной нацеленностью, включающий следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более,

9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из эндопептидаз с измененной нацеленностью, описанных в Keith A. Foster et al., Closthdial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, патент США 6461617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, патент США 6632440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, патент США 6843998; Stephan Donovan, Closthdial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, публикация патента США 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, публикация заявки на патент США 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, международная публикация патента WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, заявка на патент США №11/376696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США №11/776075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, заявка на патент США №11/829475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, публикация международной заявки WO 2006/059093; и Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, публикация международной заявки WO 2006/059105, содержание каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, источником детектируемой активности эндопептидазы с измененной нацеленностью является не встречающийся в природе вариант эндопептидазы с измененной нацеленностью, включающий следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из эндопептидаз с измененной нацеленностью, описанных в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 131.

[0114] Согласно еще одному варианту реализации, источником детектируемой активности эндопептидазы с измененной нацеленностью является эндопептидаза с измененной опиоидной нацеленностью. Неограничивающие примеры эндопептидазы с измененной опиоидной нацеленностью, или опиоидно-TVEMP, описаны, например, в Keith A. Foster et al., Closthdial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, патент США 5989545; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, патент США 7132259; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, патент США 7244437; Stephan Donovan, Closthdial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, патент США 7413742; Stephan Donovan, Closthdial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, патент США 7415338; Lance E. Steward et al., Multivalent Closthdial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, патент США 7514088; Keith A. Foster, Fusion Proteins, публикация патента США 2008/0064092; Keith A. Foster, Fusion Proteins, публикация патента США 2009/0035822; Lance E. Steward et al., Multivalent Closthdial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, публикация заявки на патент США 2009/0048431; Keith A. Foster, Non-Cytotoxic Protein Conjugates, публикация заявки на патент США 2009/0162341; Keith A. Foster et al., Retargeted Toxin Conjugates, публикация международной заявки WO 2005/023309; и Lance E. Steward, Modified Closthdial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells, публикация международной заявки WO 2008/008805; содержание каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[0115] Согласно еще одному варианту реализации, источником детектируемой активности эндопептидазы с измененной нацеленностью является эндопептидаза с измененной галаниновой нацеленностью. Неограничивающие примеры эндопептидаз с измененной галаниновой нацеленностью, или галанин-TVEMP, описаны, например, в Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capability and Enhanced Targeting Activity, заявка на патент США №11/776043 (11 июля 2007 г.); Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США №11/776052 (11 июля 2007 г.); и Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, заявка на патент США №11/776075 (11 июля 2007 г.), содержание каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[0116] Часть аспектов настоящего описания включает SNAP-25. В настоящей заявке термин "SNAP-25" относится к природному SNAP-25 или не встречающемуся в природе SNAP-25, который преимущественно расщепляется эндопептидазами с измененной нацеленностью. В настоящей заявке термин "преимущественно расщепляется" относится к скорости расщепления SNAP-25 эндопептидазами с измененной нацеленностью, которая по меньшей мере на порядок превышает скорость расщепления эндопептидазами с измененной нацеленностью какого-либо другого субстрата. Согласно аспектам данного варианта реализации, скорость расщепления SNAP-25 эндопептидазами с измененной нацеленностью превышает по меньшей мере на два порядка, по меньшей мере на три порядка, по меньшей мере на четыре порядка или по меньшей мере на пять порядков скорость расщепления эндопептидазами с измененной нацеленностью какого-либо другого субстрата.

[0117] В настоящей заявке термин "природный SNAP-25" относится к любому SNAP-25, образуемому в результате природных процессов, включая, но не ограничиваясь ими, изоформы SNAP-25, образующиеся в результате посттрансляционной модификации, альтернативного сплайсинга транскрипта или спонтанной мутации, и подтипы SNAP-25. Природные SNAP-25 включают, но не ограничиваются, 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 или SEQ ID NO: 24 или их варианты, у которых присутствуют замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из 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 или SEQ ID NO: 24.

[0118] В настоящей заявке термин "не встречающийся в природе SNAP-25" относится к любому SNAP-25, структура которого была изменена при помощи деятельности человека, включая, но не ограничиваясь, SNAP-25, полученный с помощью генной инженерии с использованием случайного мутагенеза или рационального дизайна, и SNAP-25, полученный с помощью химического синтеза *in vitro*. Неограничивающие примеры не встречающихся в природе SNAP-25 описаны, например, в Steward, L.E. et al., FRET Protease Assays for Clostridial Toxins, патент США 7332567; Fernandez-Salas et al., Lipophilic Dye-based FRET Assays for Clostridial Toxin Activity, публикация заявки на

патент США 2008/0160561, каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Не встречающийся в природе SNAP-25 может содержать замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из 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 или SEQ ID NO: 24.

[0119] Таким образом, согласно одному варианту реализации, SNAP-25 представляет собой природный SNAP-25. Согласно аспектам данного варианта реализации, SNAP-25 представляет собой изоформу SNAP-25 или подтип SNAP-25. Согласно аспектам данного варианта реализации, природный SNAP-25 представляет собой природный SNAP-25 из 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 или SEQ ID NO: 24. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, SNAP-25 представляет собой природный SNAP-25, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот 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 или SEQ ID NO: 24.

[0120] Согласно другому варианту реализации, SNAP-25 представляет собой не встречающийся в природе SNAP-25. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, SNAP-25 представляет собой не встречающийся в природе SNAP-25, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, SNAP-25 представляет собой не встречающийся в природе SNAP-25, включающий не следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из 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 или SEQ ID NO: 24. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, SNAP-25 представляет собой не встречающийся в природе SNAP-25, включающий следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из 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

или SEQ ID NO: 24.

[0121] SNAP-25 может представлять собой эндогенный SNAP-25 или экзогенный SNAP-25. В настоящей заявке термин "эндогенный SNAP-25" относится к SNAP-25, естественным образом присутствующему в клетке в силу того, что он естественным образом закодирован в геноме клетки, и таким образом, в клетке изначально экспрессируется SNAP-25, что снимает необходимость наличия внешнего источника SNAP-25 или внешнего источника генетического материала, кодирующего SNAP-25. Экспрессия эндогенного SNAP-25 может происходить с участием стимуляции со стороны окружающей среды, такой как, например, клеточная дифференцировка, или без него. По определению, эндогенным SNAP-25 может быть только природный SNAP-25 или его варианты. Например, в следующих стабильных клеточных линиях экспрессируется эндогенный SNAP-25: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa, SK-N-DZ и SK-N-BE(2)-C.

[0122] В настоящей заявке термин "экзогенный SNAP-25" относится к SNAP-25, экспрессия которого в клетке достигается путем введения внешнего источника SNAP-25 или внешнего источника генетического материала, кодирующего SNAP-25, в результате деятельности человека. Экспрессия экзогенного SNAP-25 может происходить с участием стимуляции со стороны окружающей среды, такой как, например, клеточная дифференцировка, или без него. В качестве неограничивающего примера, клетки из стабильной клеточной линии могут экспрессировать экзогенный SNAP-25 в результате временной или стабильной трансфекции SNAP-25. В качестве другого неограничивающего примера, клетки из стабильной клеточной линии могут экспрессировать экзогенный SNAP-25 в результате трансфекции белка SNAP-25. Экзогенным SNAP-25 может быть природный SNAP-25 или его варианты, или не встречающийся в природе SNAP-25 или его варианты.

[0123] Таким образом, согласно одному варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии экспрессируют эндогенный SNAP-25. Согласно аспектам данного варианта реализации, эндогенный SNAP-25, экспрессируемый клетками из стабильной клеточной линии, представляет собой природный SNAP-25. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, эндогенный SNAP-25, экспрессируемый клетками из стабильной клеточной линии, представляет собой 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 или SEQ ID NO: 24. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, эндогенный SNAP-25, экспрессируемый клетками из стабильной клеточной линии, представляет собой природный SNAP-25, такой как, например, изоформа SNAP-25 или подтип SNAP-25. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, эндогенный SNAP-25, экспрессируемый клетками из стабильной клеточной линии, представляет собой природный SNAP-25, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот 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 или SEQ ID NO: 24.

[0124] Согласно другому варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии экзогенного

SNAP-25. Согласно одному аспекту данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии природного SNAP-25. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с

5 обеспечением экспрессии природного SNAP-25 из 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 или SEQ ID NO: 24. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из

10 стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии природного SNAP-25, такого как, например, изоформа SNAP-25 или подтип SNAP-25. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии природного SNAP-25, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%

15 или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот 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 или SEQ ID NO: 24.

[0125] Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии не встречающегося в природе SNAP-25. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно

25 модифицированы с обеспечением экспрессии не встречающегося в природе SNAP-25, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот 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

30 или SEQ ID NO: 24. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии не встречающегося в природе SNAP-25, включающего не

35 следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из 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 или SEQ ID NO: 24. Согласно другим

40 аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии не встречающегося в природе SNAP-25, включающего следующие подряд замены, делеции или инсерции,

45 например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из 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 или SEQ ID NO: 24.

[0126] Тесты, выявляющие расщепление SNAP-25 после контакта с эндопептидазами с измененной нацеленностью, можно использовать для оценки наличия в клетке экспрессии эндогенного или экзогенного SNAP-25. В этих тестах образование продуктов расщепления SNAP-25 будет наблюдаться в клетках, экспрессирующих SNAP-25, после обработки эндопептидазами с измененной нацеленностью. Неограничивающие примеры конкретного анализа с помощью Вестерн блоттинга, а также подробно охарактеризованные реактивы, условия и протоколы можно найти у коммерческих поставщиков, которые включают, но не ограничиваются, Amersham Biosciences, Пискэтэуэй, Нью-Джерси; Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния; Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс; Promega Corporation, Мадисон, Висконсин, и Stratagene, Inc., Ла-Хойя, Калифорния. Следует понимать, что эти и подобные им тесты для расщепления SNAP-25 могут быть пригодны для идентификации клеток, экспрессирующих эндогенный или экзогенный SNAP-25.

[0127] В качестве неограничивающих примеров, анализ с помощью Вестерн блоттинга с использованием антител, распознающих продукт расщепления SNAP-25 или как расщепленные, так и нерасщепленные формы SNAP-25, можно использовать для анализа поглощения эндопептидаз с измененной нацеленностью. Примеры анти-SNAP-25 антител, пригодных для этих тестов, включают, но не ограничиваются, мышинные моноклональные анти-SNAP-25 антитела SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Лютервилль, Мэриленд), мышинные моноклональные анти-3MAP-25 антитела CI 71.1 (Synaptic Systems, Геттинген, Германия), мышинные моноклональные анти-SNAP-25 антитела CI 71.2 (Synaptic Systems, Геттинген, Германия), мышинные моноклональные анти-SNAP-25 антитела SP12 (Abeam, Кембридж, Массачусетс), кроличью поликлональную антисыворотку α -SNAP-25 (Synaptic Systems, Геттинген, Германия), кроличью поликлональную антисыворотку α -SNAP-25 (Abeam, Кембридж, Массачусетс) и кроличью поликлональную антисыворотку α -SNAP-25 S9684 (Sigma, Сент-Луис, Миссури).

[0128] Часть аспектов настоящего описания включает рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью. В настоящей заявке термин "рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью" относится или к природному рецептору эндопептидаз с измененной нацеленностью или к не встречающемуся в природе рецептору эндопептидаз с измененной нацеленностью, который избирательно взаимодействует с эндопептидазами с измененной нацеленностью таким образом, что ответ на активность эндопептидаз с измененной нацеленностью усиливается. В настоящей заявке термин "избирательно взаимодействует" относится к такой равновесной константе диссоциации (KD) эндопептидазы с измененной нацеленностью и рецептора эндопептидазы с измененной нацеленностью, которая по меньшей мере на один порядок меньше подобной величины для эндопептидазы с измененной нацеленностью и любого другого рецептора клеточной поверхности. Равновесная константа диссоциации - это тип константы равновесия, которая измеряет способность комплекса эндопептидаза с измененной нацеленностью-рецептор эндопептидазы с измененной нацеленностью обратимо разделяться (диссоциировать) на составляющие его молекулы, а именно, эндопептидазу с измененной нацеленностью и рецептор эндопептидазы с измененной нацеленностью, и определяется как $KD=K_a/K_d$ в состоянии равновесия. Константа ассоциации (K_a) определяется как $K_a=[C]/[L][R]$, а константа диссоциации (K_d) определяется как $K_d=[L][R]/[C]$, где [C]

равняется молярной концентрации эндопептидазы с измененной нацеленностью, [R] - молярная концентрация рецептора эндопептидазы с измененной нацеленностью, а [C] - молярная концентрация комплекса эндопептидаза с измененной нацеленностью-рецептор эндопептидазы с измененной нацеленностью, где концентрации всех
5 компонентов отвечают состоянию равновесия системы. Чем меньше константа диссоциации, тем более прочно эндопептидаза с измененной нацеленностью связана со своим рецептором, или выше аффинность связывания между эндопептидазой с измененной нацеленностью и рецептором эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно аспектам этого варианта реализации, константа диссоциации эндопептидазы
10 с измененной нацеленностью и соответствующего рецептора, по меньшей мере на два, три, четыре или пять порядков меньше, чем константа диссоциации эндопептидазы с измененной нацеленностью и любого другого рецептора. Согласно другим аспектам этого варианта реализации, аффинность связывания эндопептидазы с измененной нацеленностью, которая избирательно взаимодействует с соответствующим рецептором,
15 может иметь равновесную константу диссоциации (KD), например, 500 нМ или меньше, 400 нМ или меньше, 300 нМ или меньше, 200 нМ, или меньше, меньше 100 нМ, или еще меньше. Согласно другим аспектам этого варианта реализации, аффинность связывания эндопептидазы с измененной нацеленностью, которая избирательно взаимодействует с соответствующим рецептором, может иметь равновесную константу диссоциации
20 (KD), например, 90 нМ или меньше, 80 нМ или меньше, 70 нМ или меньше, 60 нМ, 50 нМ или меньше, 40 нМ или меньше, 30 нМ или меньше, 20 нМ или меньше, меньше 10 нм, или еще меньше. В настоящей заявке термин "усиливает ответ на активность эндопептидазы с измененной нацеленностью", относится к способности рецептора эндопептидазы с измененной нацеленностью взаимодействовать с эндопептидазой с
25 измененной нацеленностью, с формированием комплекса эндопептидаза/рецептор и последующей интернализацией этого комплекса в цитоплазму клетки.

[0129] В настоящей заявке термин "природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью" относится к любому рецептору эндопептидаз с измененной нацеленностью, образующемуся в результате природных процессов, включая, но не
30 ограничиваясь, изоформы рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью, образующиеся в результате посттрансляционной модификации, альтернативного сплайсинга транскрипта или спонтанной мутации, и подтипы рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью. Природные рецепторы эндопептидаз с измененной нацеленностью включают, но не ограничиваются, природные опиоидные рецепторы,
35 такие как опиоидоподобный рецептор 1 (ORL1), 5-опиоидный рецептор (DOR), μ -опиоидный рецептор (KOR) и δ -опиоидный рецептор (MOR), такие как описано в Christopher Evans et al., Opioid Receptor Genes, патент США 6265563; Christopher Evans et al., Methods of Screening Modulators of Opioid Receptor Activity, патент США 6432652; Christopher Evans et al., Opioid Receptors and Methods of Use, патент США 7282563; и
40 Christopher Evans et al., Delta Opioid Receptor Proteins, публикация заявки на патент США 2008/0219925, каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Другие примеры природных рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью включают, но не ограничиваются, рецептор галанина 1, рецептор галанина 2 и рецептор галанина 3. В данной области техники известны природные
45 опиоидные рецепторы из других видов позвоночных, таких как, например, приматы, коровы, собаки, мыши, крысы, куры и рыбы, и их можно использовать согласно аспектам настоящей заявки.

[0130] Природный ORL1 включает, но не ограничивается, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID

NO: 26 или их варианты, у которых присутствуют замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 26. Природный DOR включает, но не ограничивается, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 или их варианты, у которых присутствуют замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28. Природный KOR включает, но не ограничивается, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 или их варианты, у которых присутствуют замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30. Природный MOR включает, но не ограничивается, SEQ ID NO: 31 или его варианты, у которых присутствуют замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из SEQ ID NO: 31.

[0131] Природный рецептор галанина 1 включает, но не ограничивается, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 и SEQ ID NO: 138 или его варианты, у которых присутствуют замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 или SEQ ID NO: 138. Природный рецептор галанина 2 включает, но не ограничивается, SEQ ID NO: 139 или его варианты, у которых присутствуют замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из SEQ ID NO: 139. Природный рецептор галанина 3 включает, но не ограничивается, SEQ ID NO: 140 или его варианты, у которых присутствуют замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из SEQ ID NO: 140.

[0132] В настоящей заявке термин "не встречающийся в природе вариант рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью" относится к любому рецептору эндопептидаз с измененной нацеленностью, полученному при помощи человеческих модификаций или построений, включая, но не ограничиваясь ими, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, полученный методами генной инженерии, с использованием случайного мутагенеза или рационального дизайна, и рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, полученный химическим синтезом. Неограничивающие примеры не встречающихся в природе вариантов рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью включают, например, консервативные варианты рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью, неконсервативные варианты рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью, химерные варианты рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью и активные фрагменты рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью.

[0133] В настоящей заявке термин "не встречающийся в природе рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью" относится к любому рецептору эндопептидаз с измененной нацеленностью, структура которого была изменена при помощи деятельности человека, включая, но не ограничиваясь, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, полученный с помощью генной инженерии с использованием случайного мутагенеза или рационального дизайна, и рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, полученный с помощью химического синтеза *in vitro*. Не встречающийся в природе рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью может содержать замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из 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 или SEQ ID NO: 140.

[0134] Таким образом, согласно одному варианту реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, такой как, например, ORL1, DOR, KOR или MOR. Согласно аспектам данного варианта реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой изоформу рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью или подтип рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно аспектам данного варианта реализации, природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31.

[0135] Согласно другому варианту реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой не встречающийся в природе рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, такой как, например, генетически модифицированный ORL1, генетически модифицированный DOR, генетически модифицированный KOR или генетически модифицированный MOR. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой не встречающийся в природе рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31.

Согласно другим аспектам данного варианта реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой не встречающийся в природе рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающий не следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 или

SEQ ID NO: 31. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой не встречающийся в природе рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающий следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31.

[0136] Согласно другому варианту реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, такой как, например, рецептор галанина 1, рецептор галанина 2 или рецептор галанина 3. Согласно аспектам данного варианта реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой изоформу рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью или подтип рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно аспектам данного варианта реализации, природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью из SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 или SEQ ID NO: 140. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 или SEQ ID NO: 140.

[0137] Согласно другому варианту реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой не встречающийся в природе рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, такой как, например, генетически модифицированный рецептор галанина 1, генетически модифицированный рецептор галанина 2 или генетически модифицированный рецептор галанина 3. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой не встречающийся в природе рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 или SEQ ID NO: 140. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой не встречающийся в природе рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающий не следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 или SEQ ID NO: 140. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью представляет собой не встречающийся в природе рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающий следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137,

SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 или SEQ ID NO: 140.

[0138] Рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью может быть эндогенным или экзогенным. В настоящей заявке термин "эндогенный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью" относится к рецептору эндопептидаз с измененной нацеленностью, естественным образом присутствующему в клетке, потому что он естественным образом закодирован в геноме клетки, так, что в клетке изначально экспрессируется рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью без необходимости во внешнем источнике рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью или внешнем источнике генетического материала, кодирующего рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью. Экспрессия эндогенного рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью может происходить как при внешней стимуляции, так и без нее, как, например, при дифференцировке клетки или активации промотора. Например, следующие стабильные клеточные линии экспрессируют по меньшей мере один эндогенный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью: AGN P33, Neuro-2a, SiMa и SK-N-DZ. Эндогенный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью может быть только природным рецептором эндопептидаз с измененной нацеленностью или его природными вариантами.

[0139] В настоящей заявке термин "экзогенный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью" относится к рецептору эндопептидаз с измененной нацеленностью, экспрессируемому в клетке вследствие введения внешнего источника рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью или внешнего источника генетического материала, кодирующего рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, вследствие деятельности человека. Экспрессия экзогенного рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью может происходить как при внешней стимуляции, так и без нее, как, например, при дифференцировке клетки или активации промотора. В качестве неограничивающих примеров, клетки стабильных клеточных линий могут экспрессировать один или несколько экзогенных рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью вследствие временной или стабильной трансфекции молекулой полинуклеотида, кодирующего рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, такой как, например, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галанина 1, рецептор галанина 2 или рецептор галанина 3. В качестве другого неограничивающего примера, клетки стабильных клеточных линий могут экспрессировать один или более экзогенных рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью за счет белковой трансфекции рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью, таких как, например, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галанина 1, рецептор галанина 2 или рецептор галанина 3. Экзогенный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью может быть природным рецептором эндопептидаз с измененной нацеленностью или его природными вариантами, или не встречающимся в природе рецептором эндопептидаз с измененной нацеленностью или его вариантами, не встречающимися в природе.

[0140] Таким образом, согласно одному варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии экспрессируют эндогенный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно аспектам данного варианта реализации, эндогенный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, экспрессируемый клетками из стабильной клеточной линии, представляет собой природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, эндогенный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, экспрессируемый клетками из стабильной клеточной линии, представляет собой 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 или SEQ ID NO: 140. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, эндогенный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, экспрессируемый клетками из стабильной клеточной линии, представляет собой природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, такой как, например, изоформа рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью или подтип рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, эндогенный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, экспрессируемый клетками из стабильной клеточной линии, представляет собой природный рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот 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 или SEQ ID NO: 140.

[0141] Согласно другому варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии экзогенного рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно одному аспекту данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии природного рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии природного рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью из 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 или SEQ ID NO: 140. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии природного рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью, такого как, например, изоформа рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью или подтип рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии природного рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот 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 или SEQ ID NO: 140.

[0142] Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии не встречающегося в природе рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии не встречающегося в природе рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью, который, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен по последовательности аминокислот 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 или SEQ ID

NO: 140. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии не встречающегося в природе рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающего не следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из 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 или SEQ ID NO: 140. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии не встречающегося в природе рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающего следующие подряд замены, делеции или инсерции, например, 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более, 50 или более или 100 или более аминокислот из 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 или SEQ ID NO: 140.

[0143] Согласно другому варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии экзогенных ORL1, DOR, KOR, MOR или любой их комбинации. Согласно аспектам этого варианта реализации, клетки стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии природных ORL1, DOR, KOR, MOR или любой их комбинации. Согласно другим аспектам этого варианта реализации, клетки стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии не встречающихся в природе ORL1, DOR, KOR, MOR или любой их комбинации. Согласно другим аспектам этого варианта реализации, клетки стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии природных или не встречающихся в природе ORL1, DOR, KOR, MOR или любой их комбинации.

[0144] Согласно еще одному варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии экзогенных рецептора галанина 1, рецептора галанина 2, рецептора галанина 3 или любой их комбинации. Согласно аспектам этого варианта реализации, клетки стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии природных рецептора галанина 1, рецептора галанина 2, рецептора галанина 3 или любой их комбинации. Согласно другим аспектам этого варианта реализации, клетки стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии не встречающихся в природе рецептора галанина 1, рецептора галанина 2, рецептора галанина 3 или любой их комбинации. Согласно другим аспектам этого варианта реализации, клетки стабильной клеточной линии временно или стабильно модифицированы с обеспечением экспрессии природных или не встречающихся в природе рецептора галанина 1, рецептора галанина 2, рецептора галанина 3 или любой их комбинации.

[0145] Клетки, в которых экспрессируются один или несколько эндогенных или экзогенных рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью, можно идентифицировать обычными методами, включая прямые и косвенные тесты на поглощение эндопептидаз с измененной нацеленностью. Тесты, определяющие

параметры связывания или поглощения эндопептидаз с измененной нацеленностью, можно использовать для оценки наличия в клетке экспрессии рецептора эндопептидаз с измененной нацеленностью. Такие тесты включают, но не ограничиваются, опыты по образованию поперечных межмолекулярных связей с использованием меченных

5 эндопептидаз с измененной нацеленностью, таких как, например, [¹²⁵I] эндопептидаза с измененной нацеленностью, см., например, Noriko Yokosawa et al., Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines, 57(1) Infect. Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa et al., Binding of botulinum type C1, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes, 29(2) Toxicon 261-264 (1991); и Tei-ichi Nishiki et al., Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes, 10 269 (14) J. Biol. Chem. 10498-10503 (1994). Другие неограничивающие примеры тестов включают иммуноцитохимические тесты для детектирования связывания эндопептидаз с измененной нацеленностью с использованием меченных или немеченых антител, см., например, Atsushi Nishikawa et al., The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells, 15 327-333 (2004), и тесты с использованием иммунопреципитации, см., например, Yukako Fujinaga et al., Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes, 150(Pt 5) Microbiology 1529-1538 (2004), для детектирования связанных эндопептидаз с измененной нацеленностью с использованием меченных или немеченых антител. Антитела, пригодные для этих тестов, включают, но не ограничиваются перечисленными: антитела, отобранные против эндопептидаз с измененной нацеленностью, и/или антитела, отобранные против рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью, таких как, например, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галанина 1, рецептор галанина 2 или 25 рецептор галанина 3. Если антитела помечены, связывание молекулы можно детектировать различными средствами, включая анализ с помощью Вестерн блоттинга, прямое микроскопическое наблюдение клеточной локализации антитела, измерение количества связанного с клеткой или с субстратом антитела после этапа отмывки, проточную цитометрию, электрофорез или капиллярный электрофорез, с использованием 30 методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Если антитела не помечены, можно использовать меченные вторичные антитела для косвенного детектирования связанной молекулы и проводить детектирование таким же образом, как и для меченных антител. Следует понимать, что эти и подобные им тесты для определения свойств или характеристик поглощения эндопептидаз с измененной нацеленностью могут быть пригодны для идентификации клеток, экспрессирующих эндогенные или экзогенные рецепторы эндопептидаз с измененной нацеленностью.

[0146] Тесты, определяющие высвобождение молекулы после контакта с эндопептидазами с измененной нацеленностью, можно также использовать для оценки того, экспрессируется ли в клетке один или несколько эндогенных или экзогенных 40 рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью. В этих тестах ингибирование высвобождения молекулы будет происходить в тех клетках, которые экспрессируют рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью, после обработки эндопептидазами с измененной нацеленностью. Широко известные тесты включают способы измерения ингибирования высвобождения радиоактивно меченного катехоламина из нейронов, 45 такого как, например, высвобождение [³H] норадреналина или [³H] допамина, см., например, A Fassio et al., Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F, 90(3) Neuroscience 893-902 (1999); и Sara Stigliani et al., The sensitivity of catecholamine release to botulinum toxin C1 and E suggests selective

targeting of vesicles set into the readily releasable pool, 85(2) J. Neurochem. 409-421 (2003), или способы измерения высвобождения катехоламина с помощью флуорометрических методов, см., например, Anton de Paiva et al., A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly, 268(28) J. Biol. Chem. 20838-20844 (1993); Gary W. Lawrence et al., Distinct exocytotic responses of intact and permeabilised chromaffin cells after cleavage of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) or synaptobrevin by botulinum toxin A or B, 236(3) Eur. J. Biochem. 877-886 (1996); и Patrick Foran et al., Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release, 35(8) Biochemistry 2630-2636 (1996). Другие неограничивающие примеры включают тесты для измерения ингибирования высвобождения гормонов из эндокринных клеток, таких как, например, клетки передней доли гипофиза или клетки яичников. Следует понимать, что эти и подобные им тесты на высвобождение молекул могут быть пригодны для идентификации клеток, экспрессирующих эндогенные или экзогенные рецепторы эндопептидаз с измененной нацеленностью.

[0147] Тесты, которые позволяют детектировать расщепление субстрата SNAP-25 после его обработки эндопептидазами с измененной нацеленностью, можно также использовать для определения, экспрессирует ли клетка один или более эндогенных или экзогенных рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью. В этих тестах наработка продукта расщепления SNAP-25 или исчезновение не модифицированного SNAP-25 детектируется в клетках, экспрессирующих рецептор эндопептидаз с измененной нацеленностью после обработки эндопептидазами с измененной нацеленностью. Неограничивающие примеры специфичного Вестерн блоттинга, так же как и хорошо охарактеризованные реактивы, условия и протоколы можно легко приобрести у коммерческих производителей, которые включают, но не ограничиваются перечисленными: Amersham Biosciences, Пискэтэуэй, Нью-Джерси; Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния; Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс; Promega Corporation, Мадисон, Висконсин, и Stratagene, Inc., Ла-Хойя, Калифорния. Следует понимать, что эти и подобные тесты на расщепление SNAP-25 можно использовать для идентификации клеток, экспрессирующих эндогенные или экзогенные рецепторы эндопептидаз с измененной нацеленностью.

[0148] В качестве неограничивающих примеров, Вестерн блоттинг с использованием антител, которые распознают продукт расщепления SNAP-25 или как и расщепленные, так и нерасщепленные формы SNAP-25, можно использовать, для оценки поглощения эндопептидаз с измененной нацеленностью. Примеры анти-SNAP-25 антител, используемых для этого теста, включают, но не ограничиваются перечисленными: мышинные моноклональные αНТН-SNAP-25 антитела SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Лютервиль, Мэриленд), мышинные моноклональные анти-SNAP-25 антитела C1 71.1 (Synaptic Systems, Геттинген, Германия), мышинные моноклональные анти-SNAP-25 антитела C1 71.2 (Synaptic Systems, Геттинген, Германия), мышинные моноклональные анти-SNAP-25 антитела SP12 (Abeam, Кембридж, Массачусетс), поликлональную сыворотку кролика α-SNAP-25 (Synaptic Systems, Геттинген, Германия), поликлональную сыворотку кролика α-SNAP-25 S9684 (Sigma, Сент-Луис, Миссури) и поликлональную сыворотку кролика α-SNAP-25 (Abeam, Кембридж, Массачусетс).

[0149] Согласно одному аспекту настоящей заявки предложены клетки, которые вследствие генетических манипуляций или рекомбинантной технологии приобрели способность экспрессировать эндогенный SNAP-25 и/или один или несколько экзогенных

рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью. Клетки, пригодные с обеспечением экспрессии эндогенного SNAP-25 и/или одного или более экзогенных рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью вследствие генетических манипуляций или рекомбинантной технологии, включают нервные и не относящиеся к нервным клетки, которые могут или не могут экспрессировать эндогенный SNAP-25 и/или один или несколько эндогенных рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью. Далее следует понимать, что такие генетически модифицированные или сконструированные при помощи рекомбинантной технологии клетки могут экспрессировать экзогенный SNAP-25 и один или несколько экзогенных рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью под контролем конститутивного тканеспецифического и специфического для клетки или индуцибельного промоторного элемента, энхансерного элемента или их обоих. Следует понимать, что любая клетка является пригодной в том случае, если ее можно генетически модифицировать или применять к ней рекомбинантные технологии с целью экспрессии экзогенного SNAP-25 и/или одного или более экзогенных рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью, и эта клетка способна подвергаться активности эндопептидаз с измененной нацеленностью.

[0150] Способы, пригодные для введения в клетку экзогенных молекул полинуклеотидов, кодирующих компоненты, необходимые для функционирования полного клеточного механизма, посредством которого эндопептидазы с измененной нацеленностью протеолитически расщепляют субстрат SNAP-25, такие как, например, SNAP-25, ORL1, DOR, KOR или MOR, включающие, без ограничения, химические способы, например, опосредуемый фосфатом кальция, опосредуемый диэтиламиноэтилдекстраном (ДЭАЭ), опосредуемый липидами, опосредуемый полиэтиленимином (ПЭИ), опосредуемый полилизинном и опосредуемый полибренном; физически-опосредуемыми способами доставки, такими как, например, биолистическая доставка частицы, микроинъекция, слияние протопластов и электропорация; и опосредуемыми вирусом способами доставки, такими как, например, ретровирус-опосредуемая трансфекция, см., например, *Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells*, pp.16.1-16.62 (Sambrook & Russell, eds., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Vol.3, 3rd ed. 2001); Alessia Colosimo et al., *Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells*, 29(2) *Biotechniques* 314-318, 320-322, 324 (2000); Philip Washbourne & A. Kimberley McAllister, *Techniques for Gene Transfer into Neurons*, 12(5) *Curr. Opin. Neurobiol.* 566-573 (2002); и *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, pp 9.16.4-9.16.11 (2000), каждая из которых включена в настоящую заявку посредством ссылки. Специалисты в данной области техники понимают, что выбор определенного способа введения молекулы полинуклеотида в клетку частично зависит от того, стабильно или временно клетка будет содержать компонент, необходимый для функционирования всего клеточного механизма, посредством которого эндопептидазы с измененной нацеленностью протеолитически расщепляют субстрат SNAP-25. Ниже приведены неограничивающие примеры молекул полинуклеотидов, кодирующих компоненты, необходимые для функционирования всего клеточного механизма, посредством которого эндопептидазы с измененной нацеленностью протеолитически расщепляют субстрат SNAP-25: молекулы полинуклеотида ORL1 SEQ ID NO: 61 или SEQ ID NO: 62; молекулы полинуклеотида DOR SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64; молекулы полинуклеотида KOR SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66; и молекулы полинуклеотида MOR SEQ ID NO: 67; молекулы полинуклеотида рецептора галанина 1 SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 или SEQ ID NO: 143, молекулы полинуклеотида рецептора галанина 2 SEQ ID NO: 144

или молекулы полинуклеотида рецептора галанина 3 SEQ ID NO: 145, или молекулы полинуклеотида SNAP-25 SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 69.

[0151] Химически опосредуемые способы доставки хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в Martin Jordan & Florian Worm, Transfection of Adherent and Suspended Cells by Calcium Phosphate, 33(2) Methods 136-143 (2004); Chun Zhang et al., Polyethylenimine Strategies for Plasmid Delivery to Brain-Derived Cells, 33(2) Methods 144-150 (2004), каждая из которых включена в настоящую заявку посредством ссылки. Такие химически опосредуемые способы доставки можно выполнить при помощи стандартных процедур, которые доступны коммерчески, см., например, Набор для Трансфекции CellPfect (Amersham Biosciences, Пискэтэуэй, Нью-Джерси); Набор для Трансфекции клеток Млекопитающих, Фосфат кальция и декстран ДЭАЭ (Stratagene, Inc., Ла-Хойя, Калифорния); Реактив для Трансфекции Lipofectamine™ (Invitrogen, Inc., Карлсбад, Калифорния); Набор для Трансфекции ExGen 500 (Fermentas, Inc., Ганновер, Мэриленд), Наборы для Трансфекции SuperFect и Effectene (Qiagen, Inc., Валенсия, Калифорния).

[0152] Физически опосредуемые способы доставки хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в Jeike E. Biewenga et al., Plasmid-Mediated Gene Transfer in Neurons using the Biolistics Technique, 71(1) J. Neurosci, Methods. 67-75 (1997); John O'Brien & Sarah C.R. Lummis, Biolistic and Diolistic Transfection: Using the Gene Gun to Deliver DNA and Lipophilic Dyes into Mammalian Cells, 33(2) Methods 121-125 (2004); M. Golzio et al., In Vitro and In Vivo Electric Field-Mediated Permeabilization, Gene Transfer, and Expression, 33(2) Methods 126-135 (2004); и Oliver Greschet al., New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells, 33(2) Methods 151-163 (2004), каждая из которых включена в настоящую заявку посредством ссылки.

[0153] Опосредуемые вирусом способы доставки хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны например, в Chooi M. Lai et al., Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors, 21(12) DNA Cell Biol. 895-913 (2002); Ilya Frolov et al., Alphavirus-Based Expression Vectors: Strategies and Applications, 93(21) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 11371-11377 (1996); Roland Wolkowicz et al., Lentiviral Vectors for the Delivery of DNA into Mammalian Cells, 246 Methods Mol. Biol. 391-411 (2004); A. Huser & C. Hofmann, Baculovirus Vectors: Novel Mammalian Cell Gene-Delivery Vehicles and Their Applications, 3(1) Am. J. Pharmacogenomics 53-63 (2003); Tiziana Tonini et al., Transient Production of Retroviral- and Lentiviral-Based Vectors for the Transduction of Mammalian Cells, 285 Methods Mol. Biol. 141-148 (2004); Manfred Gossen & Hermann Bujard, Tight Control of Gene Expression in Eukaryotic Cells by Tetracycline-Responsive Promoters, патент США №5464758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, Methods for Regulating Gene Expression, патент США №5814618; David S. Hogness, Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same, патент США №5514578; David S. Hogness, Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor, патент США №6245531; Elisabetta Vegeto et al., Progesterone Receptor Having C. Terminal Hormone Binding Domain Truncations, патент США №5364791; Elisabetta Vegeto et al., Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy, патент США №5874534, содержание каждого из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки. Такие опосредуемые вирусом способы доставки можно осуществить при помощи стандартных процедур, которые доступны коммерчески, см., например, Аденовирусная Экспрессионная Система ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Карлсбад, Калифорния) и Руководство по Эксплуатации Аденовирусной Экспрессионной Системы ViraPower™ 25-0543 версия А, Invitrogen, Inc., (Jul. 15, 2002); Аденовирусная Экспрессионная Система AdEasy™ (Stratagene, Inc., Ла-

Хойя, Калифорния) и Руководство по Эксплуатации Аденовирусной Экспрессионной Системы AdEasy™ 064004 г., Stratagene, Inc. Кроме того, такие вирусные системы доставки можно приготовить при помощи стандартных процедур, которые доступны
5 коммерчески, см., например, Системы с обеспечением экспрессии генов BD™ Tet-Off и Tet-On (BD Biosciences-Clontech, Пало-Альто, Калифорния) и Руководство пользователя к системе с обеспечением экспрессии генов BD™ Tet-Off и Tet-On, PT3001-1, BD Biosciences Clontech, (14 марта 2003 г.), Система GeneSwitch™ (Invitrogen, Inc., Карлсбад, Калифорния) и Регулируемая мифепристоном Экспрессионная система GeneSwitch™ для клеток млекопитающих, версия D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (4 ноября 2002 г.);
10 Lentивирусная Экспрессионная система ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Карлсбад, Калифорния) и Руководство по эксплуатации лентивирусной Экспрессионной системы ViraPower™ 25-0501, версия E, Invitrogen, Inc., (8 декабря 2003 г.); и Ретровирусная индуцибельная система экспрессии для клеток млекопитающих Complete Control® (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния) и Руководство по эксплуатации к ретровирусной
15 индуцибельной системе экспрессии для клеток млекопитающих Complete Control®, 064005e.

[0154] Таким образом, согласно одному варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной
20 нацеленностью, временно содержат полинуклеотидную молекулу, кодирующую компонент, необходимый для функционирования всего клеточного механизма, посредством которого эндопептидазы с измененной нацеленностью протеолитически расщепляют субстрат SNAP-25. Согласно другому варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной
25 нацеленностью, временно содержат полинуклеотидную молекулу, кодирующую ряд компонентов, необходимых для функционирования всего клеточного механизма, посредством которого эндопептидазы с измененной нацеленностью протеолитически расщепляют субстрат SNAP-25. Согласно аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с
30 измененной нацеленностью, временно содержат полинуклеотидную молекулу, кодирующую ORL1, DOR, KOR, MOR или SNAP-25. Согласно аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, временно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 61 или SEQ ID NO: 62, кодирующую ORL1. Согласно другим
35 аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, временно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64, кодирующую DOR. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной
40 нацеленностью, временно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66, кодирующую KOR. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, временно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 67, кодирующую MOR.

[0155] Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной
45 нацеленностью, временно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 или SEQ ID NO: 143, кодирующую рецептор галанина 1. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии,

чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, временно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 144, кодирующую рецептор галанина 2. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, временно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 145, кодирующую рецептор галанина 3. Согласно дальнейшим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, временно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 69, кодирующую SNAP-25.

10 [0156] Согласно другому варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, стабильно содержат полинуклеотидную молекулу, кодирующую компонент, необходимый для функционирования всего клеточного механизма, посредством которого эндопептидазы с измененной нацеленностью протеолитически расщепляют субстрат SNAP-25. Согласно другому варианту реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, стабильно содержат полинуклеотидную молекулу, кодирующую ряд компонентов, необходимых для функционирования всего клеточного механизма, посредством которого эндопептидазы с измененной нацеленностью протеолитически расщепляют субстрат SNAP-25. Согласно аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, стабильно содержат полинуклеотидную молекулу, кодирующую ORL1, DOR, KOR, MOR или SNAP-25. Согласно аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, стабильно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 61 или SEQ ID NO: 62, кодирующую ORL1. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, стабильно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64, кодирующую DOR. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, стабильно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66, кодирующую KOR. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, стабильно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 67, кодирующую MOR.

[0157] Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, стабильно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 или SEQ ID NO: 143, кодирующую рецептор галанина 1. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, стабильно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 144, кодирующую рецептор галанина 2. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, стабильно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 145, кодирующую рецептор галанина 3. Согласно дальнейшим аспектам данного варианта реализации, клетки из стабильной клеточной линии, чувствительной к активности

эндопептидаз с измененной нацеленностью, стабильно содержат полинуклеотидную молекулу SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 69, кодирующую SNAP-25.

[0158] Как отмечалось выше, экзогенный компонент, необходимый для функционирования полного клеточного механизма, посредством которого эндопептидаза с измененной нацеленностью протеолитически расщепляет субстраты SNAP-25, например, такие как SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галанина 1, рецептор галанина 2 или рецептор галанина 3, описанные в настоящей заявке, может быть введен в клетку. Можно использовать любой или все способы, используемые для введения такого экзогенного компонента с помощью средства доставки в клеточные популяции, при условии, что данный способ временно вводит экзогенный компонент, описанный в данной заявке по меньшей мере в 50% клеток данной клеточной популяции. Таким образом аспекты этого варианта реализации могут включать популяции клеток, в которых, например, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, или 90% данной популяции клеток временно содержат экзогенный компонент, необходимый для функционирования полного клеточного механизма, посредством которого эндопептидаза с измененной нацеленностью протеолитически расщепляет субстраты SNAP-25, такие как, например, SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галанина 1, рецептор галанина 2 или рецептор галанина 3, описанные в настоящем описании. В настоящей заявке, термин "средство доставки" относится к любой молекуле, которая позволяет или увеличивает поглощение клеткой ковалентно связанного, не ковалентного связанного, или иным образом ассоциированного с этой молекулой полипептида. Таким образом термин "средство доставки" охватывает, без ограничения, белки, пептиды, пептидомиметики, маленькие молекулы, молекулы полинуклеотидов, липосомы, липиды, вирусы, ретровирусы и клетки, которые, без ограничений, транспортируют ковалентно или не ковалентно связанные молекулы к клеточной мембране, цитоплазме клетки или к ядру. Далее предполагается, что термин "средство доставки" охватывает молекулы, которые поглощаются клеткой по любому механизму, включая средства доставки, которые функционируют через эндоцитоз, опосредуемый рецептором, и которые независимы от эндоцитоза, опосредуемого рецептором.

[0159] Средство доставки может также быть препаратом, который обеспечивает или увеличивает поглощение клеткой ковалентно связанного компонента, такого как SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галанина 1, рецептор галанина 2 или рецептор галанина 3, например, за счет химического ковалентного связывания или созданных генетически гибридных белков. Способы, в которых средства доставки ковалентно связываются и способы использования таких средств описаны, например, в Steven F. Dowdy, Protein Transduction System and Methods of Use Thereof, международная публикация WO 00/34308; Gerard Chassaing & Alain Prochiantz, Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules, патент США №6080724; Alan Frankel et al., Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiety, патент США №5674980; Alan Frankel et al., TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates, патент США №5747641; Alan Frankel et al., TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins, патент США №5804604; Peter F. J. O'Hare et al., Use of Transport Proteins, патент США №6734167; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, патент США №5807746; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, патент США №6043339; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translating Activity, патент США №6248558; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, патент США №6432680; Jack J. Hawiger et al., Method

for Importing Biologically Active Molecules into Cells, патент США №6495518; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, патент США №6780843; Jonathan B, Rothbard & Paul AWender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes, патент США №6306993; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes, патент США №6495663; and Pamela B. Davis et al., Fusion Proteins for Protein Delivery, патент США №6287817, содержание каждого из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[0160] Средство доставки может также представлять собой средство, которое обеспечивает или увеличивает поглощение клеткой нековалентно связанного компонента, такого как SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, рецептор галанина 1, рецептор галанина 2 или рецептор галанина 3. Способы, которые работают в отсутствие ковалентной связи, и способы использования таких средств, описаны, например, в Gilles Divita et al, Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use, патент США №6,841,535; Philip L Felgner and Oiiwier Zeiphati, Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use, публикация патента США №2003/0008813; и Michael Karas, Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids, публикация заявки на патент США №2004/0209797, содержание каждого из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки. Такие средства доставки пептидов можно приготовить и использовать по стандартным процедурам, которые доступны коммерчески, см., например, Реактив CHARLOT™ (Active Motif, Карлсбад, Калифорния); Реактив BIO-PORTER® (Gene Therapy Systems, Inc., Сан Диего, Калифорния), Реактив для доставки белка BIO TREK™ (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния), и Реактив для белковой трансфекции PRO-JECT™ (Pierce Biotechnology Inc., Рокфорд, Иллинойс).

[0161] Часть аспектов настоящей заявки включает образец, содержащий эндопептидазы с измененной нацеленностью. В настоящей заявке термин "образец, содержащий эндопептидазы с измененной нацеленностью" относится к любому биологическому материалу, который содержит или потенциально содержит активные эндопептидазы с измененной нацеленностью. Согласно способу, описанному в настоящей заявке, можно тестировать различные образцы, включая, без ограничения, очищенные, частично очищенные или неочищенные эндопептидазы с измененной нацеленностью; рекомбинантные эндопептидазы с измененной нацеленностью, содержащие одну или две цепи, с природной или не встречающейся в природе последовательностью; рекомбинантные эндопептидазы с измененной нацеленностью, обладающие модифицированной протеазной нацеленностью; рекомбинантные эндопептидазы с измененной нацеленностью, обладающие измененной клеточной нацеленностью; массовые образцы эндопептидаз с измененной нацеленностью; составы на основе эндопептидаз с измененной нацеленностью; и клетки или необработанные, фракционированные или частично очищенные клеточные лизаты, источниками которых являются, например, бактерии, дрожжи, насекомые или млекопитающие; кровь, плазма или сыворотка; сырые, частично приготовленные, приготовленные или обработанные пищевые продукты; напитки; корма для животных; образцы почвы; образцы воды; прудовые донные отложения; лосьоны; косметика; и клинические препараты. Следует понимать, что термин "образец" включает образцы тканей, включая, без ограничения, образцы тканей млекопитающих, образцы тканей домашнего скота, такие как образцы тканей овец, коров и свиней; образцы тканей приматов; и образцы тканей человека. Такие образцы включают, без ограничения, желудочно-кишечные образцы, такие как желудочно-кишечные образцы, взятые у детей, и образцы тканей, полученные из раны.

В качестве неограничивающих примеров, способ детектирования пикомолярных количеств активности эндопептидаз с измененной нацеленностью может быть пригоден для определения присутствия или активности эндопептидаз с измененной нацеленностью в образцах пищевых продуктов или напитков; для анализа образцов, взятых у человека или животных, например, контактировавших с эндопептидазами с измененной нацеленностью или демонстрирующих один или несколько симптомов ботулизма; для контроля за активностью при производстве и очистке массовых образцов эндопептидаз с измененной нацеленностью; для анализа состава на основе эндопептидаз с измененной нацеленностью, используемого для фармакологических или косметических целей; или для анализа сыворотки крови субъекта на присутствие или отсутствие нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью.

[0162] Таким образом, согласно одному варианту реализации, образцом, содержащим эндопептидазы с измененной нацеленностью, является образец, содержащий любые количества эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно аспектам данного варианта реализации, образец, содержащий эндопептидазы с измененной нацеленностью, содержит приблизительно 100 нг или менее, приблизительно 10 нг или менее, приблизительно 1 нг или менее, приблизительно 100 пг или менее, приблизительно 10 пг или менее или приблизительно 1 пг или менее эндопептидаз с измененной нацеленностью. Согласно другим аспектам данного варианта реализации, образец, содержащий эндопептидазы с измененной нацеленностью, содержит приблизительно 1 мкМ или менее, приблизительно 100 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее, приблизительно 100 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее эндопептидаз с измененной нацеленностью.

[0163] Часть аспектов настоящей заявки включает выделение из обработанной клетки компонента SNAP-25, содержащего SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток Pi разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A. В настоящей заявке термин "компонент SNAP-25, содержащий SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток Pi разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A" относится к клеточному компоненту, содержащему продукт расщепления SNAP-25. Предполагается, что пригодным является любой способ, подходящий для обогащения или выделения компонента SNAP-25, включая, без ограничения, протоколы для лизирования клеток, протоколы для очистки на спин-колонках, иммунопреципитацию, аффинную очистку и хроматографию белков.

[0164] Часть аспектов настоящей заявки включает анти-SNAP-25 антитела, иммобилизованные на твердофазной подложке. В настоящей заявке термин "твердофазная подложка" является синонимом термина "твердая фаза" и относится к любой матрице, которую можно использовать для иммобилизации анти-SNAP-25 антител, описанных в настоящей заявке. Неограничивающие примеры твердофазных подложек включают, например, пробирку; чашку; колонку; палочки или "тест-полоски"; магнитные частицы, шарики или другую хроматографическую среду сферической или нитчатой формы, такую как, например, агароза, сефароза, силикагель или пластик; и листы или мембраны, такие как, например, нитроцеллюлоза или поливинилиденфторид (ПВДФ). Твердофазную подложку можно сконструировать с использованием разнообразных материалов, таких как, например, стекло, углерод, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, декстран, нейлон, диазоцеллюлоза или крахмал. Выбранная твердофазная подложка может обладать физическими свойствами, которые позволяют легко отделять ее от растворимого или несвязанного материала и

в целом позволяют отделять или иным образом удалять (например, с помощью отмывки, фильтрации, центрифугирования и т.д.) несвязанные материалы, такие как, например, избыточные реактивы, побочные продукты реакции или растворители, от компонента теста, связанного с твердофазной подложкой. Неограничивающие примеры изготовления и использования твердофазных подложек описаны, например, в *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, см. выше, (2001); и *Current Protocols in Molecular Biology*, см. выше, (2004), каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки.

[0165] Часть аспектов настоящей заявки включает детектирование присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, и продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A. Предполагается, что для осуществления на практике аспектов описанного иммунологического способа можно использовать любую систему детектирования при условии, что отношение сигнала к шуму позволяет в статистически значимой степени отличить сигнал комплекса антитело-антиген от фонового сигнала. Неограничивающие примеры иммунологических систем детектирования включают иммуноблот-анализ, такой как Вестерн блоттинг и дот-блоттинг, анализ с помощью иммунопреципитации, твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) и "сэндвич"-метод твердофазного ИФА. Детектирование сигнала можно достигнуть с помощью использования авторадиографии с получением изображения или формированием изображения на люминесцентном фосфорном покрытии (AU), хемилюминесценции (CL), электрохемилюминесценции (ECL), биолюминесценции (BL), флюоресценции, резонансного переноса энергии, линейной поляризации, колориметрических методов или проточной цитометрии (FC). Описания иммунологических систем детектирования приведены, например, в Michael M. Rauhut, *Chemiluminescence*, In Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3rd ed, John Wiley and Sons, 1985); A.W.Knight, *A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenerated Chemiluminescence*, *Trends Anal. Chem.* 18(1): 47-62 (1999); K.A.Fahnrich, et al., *Recent Applications of Electrogenerated Chemiluminescence in Chemical Analysis*, *Talanta* 54(4): 531-559 (2001); *Commonly Used Techniques in Molecular Cloning*, pp.A8.1-A8-55 (Sambrook & Russell, eds., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Vol.3, 3rd ed. 2001); *Detection Systems*, pp.A9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Vol.3, 3rd ed. 2001); *Electrogenerated Chemiluminescence*, (Ed. Alien J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004), каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки.

[0166] "Сэндвич"-метод твердофазного ИФА (или "сэндвич"-метод иммунологического анализа) представляет собой метод, основанный на двух антителах, которые связываются с различными эпитопами на антигене. Иммуобилизованное, имеющее высокую специфичность связывания в отношении интересующего антигена, связано с твердой поверхностью. Затем добавляют антиген, после чего добавляют второе антитело, называемое детектирующим антителом. Детектирующее антитело связывается с эпитопом антигена, отличным от эпитопа, с которым связывается иммуобилизованное антитело. Таким образом, антиген и два антитела, между которыми он находится, представляют собой "сэндвич". Аффинность связывания антител с антигеном обычно является главным фактором, определяющим чувствительность иммунологического анализа. С увеличением концентрации антигена увеличивается и

количество детектирующих антител, что приводит к увеличению измеряемого ответа. Для количественного определения степени связывания можно использовать различные репортерные системы, такие как, например, фермент, связанный со вторичными антителами, и субстрат-репортер, где ферментативная реакция формирует показание детектируемого сигнала. Производимый сигнал пропорционален количеству антигена-мишени, присутствующему в образце. Субстрат-репортер, используемый для измерения событий связывания, определяет способ детектирования. Спектрофотометрический сканер планшетов используется для колориметрического детектирования. Были разработаны хемилюминесцентные и электрохемилюминесцентные субстраты, которые обеспечивают дальнейшее усиление сигнала, и получение изображения от таких субстратов можно проводить на люминесцентном сканере. Репортер также может быть приспособлен для флуоресцентного сканера таким образом, что ферментативный этап теста заменен флуорофором, и измерение сигнала можно проводить, используя флуоресцентный сканер. Реагенты и протоколы, необходимые для проведения «сэндвич»-метода твердофазного ИФА с усиленной хемилюминесценцией, коммерчески доступны, включая, без исключения, платформу MSD для электрохемилюминесцентного «сэндвич»-метода твердофазного ИФА (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд).

[0167] Таким образом, согласно одному варианту реализации, детектирование присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-3МАР-25 антитела, которые избирательно связываются с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления ВоMT/A, и продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления ВоNT/A, можно проводить путем анализа с использованием иммуно-блоттинга, анализа с использованием иммунопреципитации, твердофазного ИФА или «сэндвич»-метода твердофазного ИФА. Согласно аспектам данного варианта реализации, детектирование проводят посредством анализов AU, CL, ECL или VL с использованием иммуно-блоттинга, анализов AU, CL, ECL, VL или FC с использованием иммунопреципитации, анализов AU, CL, ECL, VL или FC с использованием твердофазного ИФА или анализов AU, CL, ECL, VL или FC с использованием «сэндвич»-метода твердофазного ИФА.

[0168] Аспекты настоящего описания можно осуществлять в одноканальном или многоканальном режиме. Иммунологический способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, осуществляемый в одноканальном режиме, детектирует лишь присутствие комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитела и продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления ВоNT/A.

Иммунологический способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, осуществляемый в многоканальном режиме, одновременно детектирует присутствие двух или более комплексов антитело-антиген; один из которых представляет собой комплекс антитело-антиген, включающий анти-SNAP-25 антитела и продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления ВоNT/A; а другой(ие) из которых представляет собой комплекс антитело-антиген, содержащий второй, третий, четвертый и т.д. белок, отличный от вышеупомянутого. Второй белок может использоваться, например, в качестве внутреннего контроля для минимизации изменчивости между пробами путем нормирования детектированного количества комплекса антитело/антиген Q-SNAP-25/SNAP-25 относительно количества комплекса антитело/антиген, детектированного для второго белка. В связи с этим, в качестве второго белка обычно используют белок,

конститутивно экспрессируемый в клетке, такой как белок домашнего хозяйства. Неограничивающие примеры подходящего второго белка включают, например, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH), синтаксин, цитокины. Способы проведения иммунологических тестов в многоканальном режиме описаны, например, в U.B.Nielsen and B.H.Geierstanger, Multiplexed Sandwich Assays in Microarray Format, J. Immunol. Methods. 290(1-2): 107-120 2004); R. Barry and M. Soloviev, Quantitative Protein Profiling using Antibody Arrays, Proteomics, 4(12): 3717-3726 (2004); M.M.Ling et al., Multiplexing Molecular Diagnostics and Immunoassays using Emerging Microarray Technologies, Expert Rev Mol Diagn. 7(1): 87-98 (2007); S.X.Leng et al., ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research, J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63(8): 879-884 (2008), каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки.

[0169] Таким образом, согласно одному варианту реализации, Иммунологический способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью проводится в одноканальном режиме путем детектирования присутствия лишь комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитела и продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A. Согласно другому варианту реализации, иммунологический способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью проводится в многоканальном режиме путем одновременного детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитела и продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, и по меньшей мере еще одного комплекса антитело-антиген, содержащего белок, отличный от SNAP-25, такой как, например, GAPDH или синтаксин.

[0170] Согласно части аспектов настоящей заявки предложен способ определения иммунной резистентности по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью. В настоящей заявке термин "иммунная резистентность по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью" означает млекопитающее, которое не демонстрирует полный ответ на терапию с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью или демонстрирует пониженный положительный эффект от терапии с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью, поскольку иммунный ответ данного животного, напрямую или косвенно, снижает эффективность такой терапии. В качестве неограничивающего примера сниженной эффективности можно привести присутствие у млекопитающего по меньшей мере одного вида нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью, которые связываются с эндопептидазой с измененной нацеленностью таким образом, что специфичность или активность этой эндопептидазы с измененной нацеленностью снижается или предотвращается. В настоящей заявке термин "терапия с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью" означает лечение, помощь, излечение, выздоровление, реабилитацию или любые другие меры противодействия чему-либо нежелательному у млекопитающих, требующие нейромодуляции с использованием эндопептидазы с измененной нацеленностью, или введение млекопитающему одной или нескольких контролируемых доз лекарственного средства, препарата или смеси эндопептидазы с измененной нацеленностью, которая имеет лекарственный, терапевтический, лечебный, косметический, излечивающий или иной полезный эффект. Терапия с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью включает, без ограничения, использование любого ее природного или модифицированного фрагмента, в любом составе, в

комбинации с любым носителем или активным ингредиентом и введение любым путем.

[0171] Согласно части аспектов настоящей заявки предложен тестируемый образец, полученный из организма млекопитающего, тестируемого на наличие или отсутствие нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью. В настоящей заявке термин "тестируемый образец" относится к любому биологическому материалу, который содержит или потенциально содержит по меньшей мере одно антитело против эндопептидазы с измененной нацеленностью. Антитело против эндопептидазы с измененной нацеленностью может являться нейтрализующим антителом против эндопептидазы с измененной нацеленностью или не нейтрализующим антителом против эндопептидазы с измененной нацеленностью. В настоящей заявке термин "нейтрализующие антитела против эндопептидазы с измененной нацеленностью" означает любое антитело против эндопептидазы с измененной нацеленностью, которое при физиологических условиях связывается с участком эндопептидазы с измененной нацеленностью таким образом, что снижает или предотвращает эффект эндопептидазы с измененной нацеленностью в терапии с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью. В настоящей заявке термин "не нейтрализующие антитела против эндопептидазы с измененной нацеленностью" означает любое антитело против эндопептидазы с измененной нацеленностью, которое при физиологических условиях связывается с участком эндопептидазы с измененной нацеленностью, но не предотвращает эффект эндопептидазы с измененной нацеленностью в терапии с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью. Предполагается, что все без исключения образцы, которые могут содержать антитела против эндопептидазы с измененной нацеленностью, можно использовать в данном способе, включая, без ограничения, кровь, плазму, сыворотку и лимфатическую жидкость. Кроме того, все без исключения организмы, способные производить антитела против эндопептидазы с измененной нацеленностью, могут служить источниками образцов, включая, но не ограничиваясь перечисленными: птицы и млекопитающие, включая мышей, крыс, коз, овец, лошадей, ослов, коров, приматов и человека. Неограничивающие примеры конкретных протоколов для сбора крови и приготовления сыворотки описаны, например, в Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, blood collection in healthcare (F.A. Davis Company, 2001); и Diana Garza & Kathleen Becan-McBride, phlebotomy handbook: blood collection essentials (Prentice Hall, 6th ed., 2002). Эти протоколы представляют собой обычные процедуры, хорошо известные специалистам в данной области техники и из соответствующих программ обучения. Тестируемый образец можно получить из организма до контакта с эндопептидазами с измененной нацеленностью, после однократной обработки эндопептидазами с измененной нацеленностью, после многократных обработок эндопептидазами с измененной нацеленностью, до наступления резистентности к терапии с помощью эндопептидаз с измененной нацеленностью или после наступления резистентности к терапии с использованием эндопептидаз с измененной нацеленностью.

[0172] Согласно части аспектов настоящей заявки предложен контрольный образец. В настоящей заявке термин "контрольный образец" означает любой образец, для которого известно присутствие или отсутствие тестируемого образца, и включает образцы как отрицательного, так и положительного контроля. В отношении нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью, образец отрицательного контроля можно получить от субъекта, который никогда не контактировал с эндопептидазой с измененной нацеленностью, и он может включать, без ограничения, образец от того же субъекта, у которого производится сбор

тестируемого образца, но взятый до проведения терапии с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью; образец, взятый от другого субъекта, который никогда не контактировал с эндопептидазой с измененной нацеленностью; объединенный образец, взятый от нескольких разных субъектов, которые никогда не контактировали с ВоМТ/

5 А. В отношении нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью, образец положительного контроля можно получить от субъекта, который демонстрирует иммунную резистентность к эндопептидазе с измененной нацеленностью, и он включает, без ограничения, субъекта, демонстрирующего положительный результат в тесте для пациентов; субъекта, демонстрирующего

10 положительный результат в биотесте *in vivo*; и субъекта, демонстрирующего повышенный иммунитет, например, субъекта, вакцинированного эндопептидазой с измененной нацеленностью.

[0173] Кроме того, предполагается, что антитела против эндопептидазы с измененной нацеленностью можно очистить из образца. Антитела против эндопептидазы с

15 измененной нацеленностью можно очистить из образца, используя множество процедур, включая, без ограничения, хроматографию с белком A/G и аффинную хроматографию. Неограничивающие примеры конкретных протоколов для очистки антител из образца описаны, например, в *antibodies: A laboratory manual* (Edward Harlow & David Lane, eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998); *using antibodies: A laboratory manual: portable protocol No. I* (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998); и *molecular cloning, A laboratory manual*, см. выше, (2001), которые включены в

20 настоящую заявку посредством ссылки. Кроме того, неограничивающие примеры способов очистки антител, как и подробно охарактеризованных реагентов, условий и протоколов, можно легко получить от коммерческих поставщиков, включающих, без

25 ограничения, Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс; и Zymed Laboratories, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния. Эти протоколы и стандартные процедуры хорошо известны специалистам в данной области техники.

[0174] Таким образом, согласно одному варианту реализации, образец включает

30 кровь. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, образец включает кровь мышей, кровь крыс, кровь коз, кровь овец, кровь лошадей, кровь ослов, кровь коров, кровь приматов или человеческую кровь. Согласно другому варианту реализации, образец включает плазму. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, тестируемый образец включает плазму мышей, плазму крыс, плазму коз, плазму овец,

35 плазму лошадей, плазму ослов, плазму коров, плазму приматов или человеческую плазму. Согласно другому варианту реализации, образец включает сыворотку. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, образец включает сыворотку мышей, сыворотку крыс, сыворотку коз, сыворотку овец, сыворотку лошадей, сыворотку ослов, сыворотку коров, сыворотку приматов и человеческую сыворотку. Согласно другому

40 варианту реализации, образец включает лимфатическую жидкость. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, образец включает лимфатическую жидкость мышей, лимфатическую жидкость крыс, лимфатическую жидкость коз, лимфатическую жидкость овец, лимфатическую жидкость лошадей, лимфатическую жидкость ослов, лимфатическую жидкость коров, лимфатическую жидкость приматов или

45 лимфатическую жидкость человека. Согласно еще одному варианту реализации, образец представляет собой тестируемый образец. Согласно еще одному варианту реализации, образец представляет собой контрольный образец. Согласно аспектам данного варианта реализации, контрольный образец представляет собой образец отрицательного контроля или образец положительного контроля.

[0175] Согласно части аспектов настоящей заявки предложено сравнение количества SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, детектируемого на этапе (г), с количеством SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, детектируемым на этапе (д). Согласно одному варианту реализации, количество продукта расщепления SNAP-25 в тестируемом образце больше, чем количество продукта расщепления SNAP-25 в контрольном образце. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, большее количество продукта расщепления SNAP-25 в тестируемом образце по сравнению с образцом положительного контроля свидетельствует о снижении или отсутствии у млекопитающего иммунной резистентности по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, равное количество продукта расщепления SNAP-25 в тестируемом образце по сравнению с образцом отрицательного контроля свидетельствует о снижении или отсутствии у млекопитающего иммунной резистентности по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью. Согласно другому варианту реализации, количество продукта расщепления SNAP-25 в тестируемом образце меньше, чем количество продукта расщепления SNAP-25 в контрольном образце. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, меньшее или равное количество продукта расщепления SNAP-25 в тестируемом образце по сравнению с образцом положительного контроля свидетельствует о повышении или присутствии у млекопитающего иммунной резистентности по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, меньшее количество продукта расщепления SNAP-25 в тестируемом образце по сравнению с образцом отрицательного контроля свидетельствует о повышении или присутствии у млекопитающего иммунной резистентности по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью.

[0176] Предполагается, что все без исключения условия теста, подходящие для детектирования присутствия в образце нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью, пригодны для способов, описанных в настоящей заявке, такие как, например, линейные условия теста и нелинейные условия теста. Согласно одному варианту реализации, условия теста являются линейными. Согласно одному аспекту настоящего варианта реализации, участвующее в тесте количество эндопептидазы с измененной нацеленностью избыточно. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, участвующее в тесте количество эндопептидазы с измененной нацеленностью лимитирует скорость реакции. Согласно другому аспекту настоящего варианта реализации, участвующее в тесте количество тестируемого образца лимитирует скорость реакции.

[0177] Аспекты настоящей заявки можно также описать следующим образом:

1. Способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающий этапы а) обработки клетки из стабильной клеточной линии образцом, содержащим эндопептидазу с измененной нацеленностью, причем клетка из стабильной клеточной линии чувствительна к активности эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A; в) осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, причем анти-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится

остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, из продукта расщепления SNAP-25; и г) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; при этом детектирование с использованием комплекса антитело-антиген является показателем активности эндопептидазы с измененной нацеленностью.

2. Способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающий этапы а) обработки клетки из стабильной клеточной линии образцом, содержащим эндопептидазу с измененной нацеленностью, причем клетка из стабильной клеточной линии чувствительна к активности эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A; в) осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, иммобилизованным на твердофазной подложке, причем анти-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, из продукта расщепления SNAP-25; и г) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; при этом детектирование с использованием комплекса антитело-антиген является показателем активности эндопептидазы с измененной нацеленностью.

3. Способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающий этапы а) обработки клетки из стабильной клеточной линии образцом, содержащим эндопептидазу с измененной нацеленностью, причем клетка из стабильной клеточной линии чувствительна к активности эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A; в) иммобилизации компонента SNAP-25 на твердофазной подложке; г) осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, причем анти-SNAP-25 антитело связывает с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, из продукта расщепления SNAP-25; и д) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; при этом детектирование с использованием комплекса антитело-антиген является показателем активности эндопептидазы с измененной нацеленностью.

4. Способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающий этапы а) обработки клетки из стабильной клеточной линии образцом, содержащим эндопептидазу с измененной нацеленностью, причем клетка из стабильной клеточной линии обладает способностью к поглощению эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A; в) осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, причем анти-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, из продукта расщепления SNAP-25; и г) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего аНТН-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; при этом детектирование с

использованием комплекса антитело-антиген является показателем активности эндопептидазы с измененной нацеленностью.

5. Способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающий этапы а) обработки клетки из стабильной клеточной линии образцом, содержащим эндопептидазу с измененной нацеленностью, причем клетка из стабильной клеточной линии обладает способностью к поглощению эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A; в) осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, иммобилизованным на твердофазной подложке, причем анти-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, из продукта расщепления SNAP-25; и г) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; при этом детектирование с использованием комплекса антитело-антиген является показателем активности эндопептидазы с измененной нацеленностью.

6. Способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающий этапы а) обработки клетки из стабильной клеточной линии образцом, содержащим эндопептидазу с измененной нацеленностью, причем клетка из стабильной клеточной линии обладает способностью к поглощению эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A; в) иммобилизации компонента SNAP-25 на твердофазной подложке; г) осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, причем анти-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, из продукта расщепления SNAP-25; и д) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; при этом детектирование с использованием комплекса антитело-антиген является показателем активности эндопептидазы с измененной нацеленностью.

7. Способ определения иммунной резистентности млекопитающих по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью, включающий этапы а) добавления эндопептидазы с измененной нацеленностью к тестируемому образцу, полученному из млекопитающего, тестируемого на наличие или отсутствие нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) обработки клетки из стабильной клеточной линии тестируемым образцом, причем клетка из стабильной клеточной линии чувствительна к активности эндопептидазы с измененной нацеленностью; в) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A; г) осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, причем анти-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, из продукта расщепления SNAP-25; д) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; е) повторения этапов б-д с образцом для отрицательного

контроля вместо тестируемого образца, причем образец для отрицательного контроля содержит эндопептидазу с измененной нацеленностью и сыворотку, в отношении которой известно, что она не содержит нейтрализующие антитела против эндопептидазы с измененной нацеленностью; ж) сравнения количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе д, с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе е, при этом детектирование меньшего количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе д, по сравнению с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе е, свидетельствует о присутствии нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью.

8. Способ определения иммунной резистентности млекопитающих по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью, включающий этапы а) добавления эндопептидазы с измененной нацеленностью к тестируемому образцу, полученному из млекопитающего, тестируемого на наличие или отсутствие нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) обработки клетки из стабильной клеточной линии тестируемым образцом, причем клетка из стабильной клеточной линии чувствительна к активности эндопептидазы с измененной нацеленностью; в) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A; г) осуществления контакта SNAP-25 с anti-SNAP-25 антителом, иммобилизованным на твердофазной подложке, причем anti-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, из продукта расщепления SNAP-25; д) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего anti-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; е) повторения этапов б-д с образцом для отрицательного контроля вместо тестируемого образца, причем образец для отрицательного контроля содержит эндопептидазу с измененной нацеленностью и сыворотку, в отношении которой известно, что она не содержит нейтрализующие антитела против эндопептидазы с измененной нацеленностью; ж) сравнения количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе д, с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе е, при этом детектирование меньшего количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе д, по сравнению с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе е, свидетельствует о присутствии нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью.

9. Способ определения иммунной резистентности млекопитающих по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью, включающий этапы а) добавления эндопептидазы с измененной нацеленностью к тестируемому образцу, полученному из млекопитающего, тестируемого на наличие или отсутствие нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) обработки клетки из стабильной клеточной линии тестируемым образцом, причем клетка из стабильной клеточной линии чувствительна к активности эндопептидазы с измененной нацеленностью; в) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P_i разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A; г) иммобилизации компонента SNAP-25 на твердофазной подложке; д) осуществления контакта SNAP-25 с anti-SNAP-25 антителом, причем anti-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, из

продукта расщепления SNAP-25; е) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; ж) повторения этапов б-е с образцом для отрицательного контроля вместо тестируемого образца, причем образец для отрицательного контроля содержит эндопептидазу с измененной нацеленностью и сыворотку, в отношении которой известно, что она не содержит нейтрализующие антитела против эндопептидазы с измененной нацеленностью; з) сравнения количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе е, с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе ж, при этом детектирование меньшего количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе е, по сравнению с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе ж, свидетельствует о присутствии нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью.

10. Способ определения иммунной резистентности млекопитающих по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью, включающий этапы а) добавления эндопептидазы с измененной нацеленностью к тестируемому образцу, полученному из млекопитающего, тестируемого на наличие или отсутствие нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) обработки клетки из стабильной клеточной линии тестируемым образцом, причем клетка из стабильной клеточной линии обладает способностью к поглощению эндопептидазы с измененной нацеленностью; в) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A; г) осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, причем анти-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A, из продукта расщепления SNAP-25; д) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; е) повторения этапов б-д с образцом для отрицательного контроля вместо тестируемого образца, причем образец для отрицательного контроля содержит эндопептидазу с измененной нацеленностью и сыворотку, в отношении которой известно, что она не содержит нейтрализующие антитела против эндопептидазы с измененной нацеленностью; ж) сравнения количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе д, с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе е, при этом детектирование меньшего количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе д, по сравнению с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе е, свидетельствует о присутствии нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью.

11. Способ определения иммунной резистентности млекопитающих по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью, включающий этапы а) добавления эндопептидазы с измененной нацеленностью к тестируемому образцу, полученному из млекопитающего, тестируемого на наличие или отсутствие нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) обработки клетки из стабильной клеточной линии тестируемым образцом, причем клетка из стабильной клеточной линии обладает способностью к поглощению эндопептидазы с измененной нацеленностью; в) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A; г) осуществления контакта компонента

SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, иммобилизованным на твердофазной подложке, причем анти-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, из продукта расщепления SNAP-25; д) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; е) повторения этапов б-д с образцом для отрицательного контроля вместо тестируемого образца, причем образец для отрицательного контроля содержит эндопептидазу с измененной нацеленностью и сыворотку, в отношении которой известно, что она не содержит нейтрализующие антитела против эндопептидазы с измененной нацеленностью; ж) сравнения количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе д, с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе е, при этом детектирование меньшего количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе д, по сравнению с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе е, свидетельствует о присутствии нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью.

12. Способ определения иммунной резистентности млекопитающих по отношению к эндопептидазе с измененной нацеленностью, включающий этапы а) добавления эндопептидазы с измененной нацеленностью к тестируемому образцу, полученному из млекопитающего, тестируемого на наличие или отсутствие нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью; б) обработки клетки из стабильной клеточной линии тестируемым образцом, причем клетка из стабильной клеточной линии обладает способностью к поглощению эндопептидазы с измененной нацеленностью; в) выделения из обработанных клеток компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A; г) иммобилизации компонента SNAP-25 на твердофазной подложке; д) осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, причем анти-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A, из продукта расщепления SNAP-25; е) детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25; ж) повторения этапов б-е с образцом для отрицательного контроля вместо тестируемого образца, причем образец для отрицательного контроля содержит эндопептидазу с измененной нацеленностью и сыворотку, в отношении которой известно, что она не содержит нейтрализующие антитела против эндопептидазы с измененной нацеленностью; з) сравнения количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе е, с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе ж, при этом детектирование меньшего количества комплекса антитело-антиген, детектированного на этапе е, по сравнению с количеством комплекса антитело-антиген, детектированным на этапе ж, свидетельствует о присутствии нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью.

13. Способ по пп.1-3 и 7-9, отличающийся тем, что клетка чувствительна к активности эндопептидаз с измененной нацеленностью при концентрации эндопептидазы с измененной нацеленностью около 500 нМ или ниже, около 400 нМ или ниже, около 300 нМ или ниже, около 200 нМ или ниже, около 100 нМ или ниже.

14. Способ по пп.4-6 и 10-12, отличающийся тем, что клетка обладает способностью к поглощению эндопептидаз с измененной нацеленностью при концентрации эндопептидазы с измененной нацеленностью около 500 нМ или ниже, около 400 нМ

или ниже, около 300 нМ или ниже, около 200 нМ или ниже, около 100 нМ или ниже.

15. Способ по пп.1-6, отличающийся тем, что образец содержит приблизительно 100 нг или менее, приблизительно 10 нг или менее, приблизительно 1 нг или менее, приблизительно 100 фг или менее, приблизительно 10 фг или менее или приблизительно 1 фг или менее эндопептидаз с измененной нацеленностью.

16. Способ по пп.1-6, отличающийся тем, что образец содержит приблизительно 100 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее, приблизительно 100 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее, приблизительно 0,5 нМ или менее или приблизительно 0,1 нМ или менее эндопептидаз с измененной нацеленностью.

17. Способ по пп.1-12, отличающийся тем, что присутствие комплекса антитело-антиген детектируют с помощью анализа с использованием иммуноблоттинга, анализа с использованием иммунопреципитации, твердофазного ИФА или "сэндвич"-метода твердофазного ИФА.

18. Способ по пп.1-12, отличающийся тем, что способ характеризуется отношением сигнала к шуму для нижней асимптоты, составляющим по меньшей мере 3:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 50:1 или по меньшей мере 100:1.

19. Способ по пп.1-12, отличающийся тем, что способ характеризуется отношением сигнала к шуму для верхней асимптоты, составляющим по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 20:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 200:1, по меньшей мере 300:1, по меньшей мере 400:1, по меньшей мере 500:1 или по меньшей мере 600:1.

20. Способ по пп.1-12, отличающийся тем, что способ может детектировать активность ЕС₅₀, например, по меньшей мере 100 нг, по меньшей мере 50 нг, по меньшей мере 10 нг, по меньшей мере 5 нг, по меньшей мере 100 пг, по меньшей мере 50 пг, по меньшей мере 10 пг, по меньшей мере 5 пг, по меньшей мере 100 фг, по меньшей мере 50 фг, по меньшей мере 10 фг или по меньшей мере 5 фг эндопептидаз с измененной нацеленностью.

21. Способ по пп.1-12, отличающийся тем, что способ может детектировать активность ЕС₅₀, например, по меньшей мере 10 нМ, по меньшей мере 5 нМ, по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 50 нМ, по меньшей мере 10 нМ, по меньшей мере 5 нМ, по меньшей мере 1 нМ, по меньшей мере 0,5 нМ или по меньшей мере 0,1 нМ эндопептидаз с измененной нацеленностью.

22. Способ по пп.1-12, отличающийся тем, что способ характеризуется ПД, например, 10 пг или менее, 9 пг или менее, 8 пг или менее, 7 пг или менее, 6 пг или менее, 5 пг или менее, 4 пг или менее, 3 пг или менее, 2 пг или менее, 1 пг или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью.

23. Способ по пп.1-12, отличающийся тем, что способ характеризуется ПД, например, 100 нМ или менее, 90 нМ или менее, 80 нМ или менее, 70 нМ или менее, 60 нМ или менее, 50 нМ или менее, 40 нМ или менее, 30 нМ или менее, 20 нМ или менее или 10 нМ или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью.

24. Способ по пп.1-12, отличающийся тем, что способ характеризуется ПКИ, например, 10 пг или менее, 9 пг или менее, 8 пг или менее, 7 пг или менее, 6 пг или менее, 5 пг или менее, 4 пг или менее, 3 пг или менее, 2 пг или менее, 1 пг или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью.

25. Способ по пп.1-12, отличающийся тем, что способ характеризуется ПКИ, например, 100 нМ или менее, 90 нМ или менее, 80 нМ или менее, 70 нМ или менее, 60

нМ или менее, 50 нМ или менее, 40 нМ или менее, 30 нМ или менее, 20 нМ или менее или 10 нМ или менее эндопептидазы с измененной нацеленностью.

26. Способ по пп.1-12, отличающийся тем, что способ может отличать полностью активную эндопептидазу с измененной нацеленностью от частично активной эндопептидазы с измененной нацеленностью, обладающей, например, 70% или менее, 60% или менее, 50% или менее, 40% или менее, 30% или менее, 20% или менее или 10% или менее активности полностью активной эндопептидазы с измененной нацеленностью А.

27. Способ по пп.1-12, отличающийся тем, что анти-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом, на карбоксильном конце которого находится остаток P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления ВоМТ/А, из продукта расщепления SNAP-25.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что анти-SNAP-25 антитело характеризуется константой скорости ассоциации для эпитопа, на карбоксильном конце которого отсутствует глутамин разрезаемой связи в сайте расщепления ВоНТ/А, из продукта расщепления SNAP-25, составляющей менее $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$; и при этом анти-SNAP-25 антитело характеризуется равновесной константой диссоциации для эпитопа, составляющей менее 0,450 нМ.

29. Способ по п.27, отличающийся тем, что изолированное анти-SNAP-25 антитело включает переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74 SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 82; и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 и SEQ ID NO: 92.

30. Способ по п.27, отличающийся тем, что изолированное анти-SNAP-25 антитело включает по меньшей мере CDR1 V_H из SEQ ID NO: 93, CDR1 V_H из SEQ ID NO: 94, CDR1 V_H из SEQ ID NO: 95, CDR1 V_H из SEQ ID NO: 118, CDR1 V_H из of SEQ ID NO: 119 или CDR1 V_H из of SEQ ID NO: 120.

32. Способ по п.27, отличающийся тем, что изолированное анти-SNAP-25 антитело включает по меньшей мере CDR2 V_H из SEQ ID NO: 96, CDR2 V_H из SEQ ID NO: 97, CDR2 V_H из SEQ ID NO: 98, CDR2 V_H из SEQ ID NO: 99, CDR2 V_H из SEQ ID NO: 121, CDR2 V_H из SEQ ID NO: 122 или CDR2 V_H из SEQ ID NO: 123.

33. Способ по п.27, отличающийся тем, что изолированное анти-SNAP-25 антитело включает по меньшей мере CDR3 V_H из SEQ ID NO: 100, CDR3 v_H из SEQ ID NO: 101, CDR3V_H из SEQ ID NO: 102 или CDR3V_H из SEQ ID NO: 124.

34. Способ по п.27, отличающийся тем, что изолированное анти-SNAP-25 антитело включает по меньшей мере CDR1 V_L из SEQ ID NO: 103, CDR1 V_L из SEQ ID NO: 104, CDR1 V_L из SEQ ID NO: 105, CDR1 V_L из SEQ ID NO: 106, CDR1 V_L из SEQ ID NO: 107, CDR1 V_L из SEQ ID NO: 125, CDR1 V_L из SEQ ID NO: 126, CDR1 V_L из SEQ ID NO: 127, CDR1 V_L из SEQ ID NO: 128 или CDR1 V_L из SEQ ID NO: 129.

35. Способ по п.27, отличающийся тем, что изолированное анти-SNAP-25 антитело включает по меньшей мере CDR2 V_L из SEQ ID NO: 108, CDR2 V_L из SEQ ID NO: 109, CDR2 V_L из SEQ ID NO: 110, CDR2 V_L из SEQ ID NO: 111 или CDR2 V_L из SEQ ID NO: 112.

36. Способ по п.27, отличающийся тем, что изолированное анти-SNAP-25 антитело включает по меньшей мере CDR3 V_L из SEQ ID NO: 113, CDR3 V_L из SEQ ID NO: 114,

CDR3 V_L из SEQ ID NO: 115, CDR3 V_L из SEQ ID NO: 116 или CDR3 V_L из SEQ ID NO: 117.

37. Способ по п.27, отличающийся тем, что изолированное анти-SNAP-25 антитело включает переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 121 и SEQ ID NO: 100; и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110 и SEQ ID NO: 115.

38. Способ по п.27, отличающийся тем, что изолированное анти-SNAP-25 антитело избирательно связывает эпитоп SNAP-25 из 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 или SEQ ID NO: 148.

39. Способ по п.27, отличающийся тем, что изолированное анти-SNAP-25 антитело избирательно связывает эпитоп SNAP-25 из SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Скрининг экспрессии эндогенного рецептора эндопептидазы с измененной направленностью в клеточных линиях-кандидатах

[0178] Приведенный ниже пример демонстрирует, как проводить идентификацию стабильных клеточных линий, обладающих способностью к поглощению эндопептидаз с измененной направленностью, которая необходима для разработки клеточного теста на активность.

1. Культивация запасных культур клеточных линий-кандидатов

[0179] Для культивации клеточных линий, подходящую плотность клеток из тестируемой клеточной линии засеивали во флаконы для культур тканей на 162 см², содержащих 30 мл подходящей питательной среды (см. Таблицу 1), и выращивали в инкубаторе при 37°C и концентрации углекислого газа 5% или 10% до достижения клетками желаемой плотности.

Таблица 1.

Среды, используемые при скрининге клеточных линий	
Клеточная линия	Состав питательной среды с сывороткой
SiMa и клоны SiMa	RPMI1640, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% пенициллин-стрептомицин, 2 мМ L-глутамин
PC12	RPMI 1640, 5% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, 10% лошадиной сыворотки, 2 мМ GlutaMAX™, 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата натрия, 1% пенициллин-стрептомицин

Таблица 1.

Среды, используемые при скрининге клеточных линий	
Клеточная линия	Состав питательной среды с сывороткой
N18 ND8/34 NG108-15	90% DMEM, 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамин, 2 мМ глюкозы
SK-N-DZ SK-N-F1 SK-N-SH	90% DMEM, 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, 4 мМ глутамин, 4 мМ глюкозы, 0,1 мМ заменимых аминокислот, 1,5 г/л NaHCO ₃
BE(2)-C SK-N-BE (2) SH-SY5Y	EMEM(11090-081, Gibco), Ham's F12 (11765-054, Gibco), 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамин, 0,1 мМ заменимых аминокислот,
ND3, ND7, ND15	Среда DMEM с 2 мМ глутамин (Invitrogen, Cat #. 11885), 10% Эмбриональной Бычьей Сыворотки (Invitrogen, Cat#. 16140) и 1x антибиотик / фунгицид

Neuro-2a	ЕМЕМ, 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамин, 0,1 мМ заменимых аминокислот, 1,5 г/л NaHCO ₃ , 1 мМ пирувата натрия
----------	--

2. Скрининг клеток, экспрессирующих рецептор-мишень на поверхности клетки
 [0180] Проводили скрининг клеточных линий на присутствие желаемого рецептора-мишени, используя проточную цитометрию и/или тесты связывания лиганда. Хотя в приведенных ниже примерах реагенты использовали для идентификации опиоидного или опиоидоподобного рецептора в плазматической мембране, описанные ниже подходы можно применять для идентификации родственного рецептора для любой из эндопептидаз с измененной нацеленностью.

а. Идентификация клеточных линий с использованием проточной цитометрии
 [0181] Для идентификации клеток, включающих стабильные клеточные линии, которые экспрессируют рецепторы-мишени для эндопептидазы с измененной нацеленностью на поверхности клетки, проводили анализ с помощью проточной цитометрии. Клетки из каждой клеточной линии-кандидата выращивали, как описано в Разделе 1, обрабатывали трипсином, промывали буфером для окрашивания, включающем 1 × ФБР и 0,5% BSA, и центрифугировали при 1200 об./мин. в течение 3 минут. Осажденные клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания, и приблизительно $2,0 \times 10^6$ клеток переносили в новые пробирки, по две пробирки для каждого тестируемого рецептора. Для проведения скрининга на присутствие опиоидного или опиоидоподобного рецептора, в одну пробирку помещали приблизительно 2,0-5,0 мкл α -ORL-1 RA14133 (Neuromics, Эдина, Миннесота), кроличьих поликлональных антител α -DOR RA10101 (Neuromics, Эдина, Миннесота), кроличьих поликлональных анти-KOR RA10103 антител (Neuromics, Эдина, Миннесота) или кроличьих поликлональных анти-MOR RA10104 антител (Neuromics, Эдина, Миннесота) и инкубировали смесь при 4°C в течение 1 часа. Вторую пробирку инкубировали при 4°C в течение 1 часа в отсутствие каких-либо антител и использовали в качестве отрицательного контроля. После инкубации с антителами, 1,0 мл буфера для окрашивания добавляли к каждой пробирке и центрифугировали при 1200 об./мин. в течение 3 минут. Осадок клеток еще раз промывали 1,0 мл буфера для окрашивания. Осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл буфера для окрашивания, к каждой пробирке добавляли 2,0 мкл козьих противокроличьих антител IgG FITC и инкубировали при 4°C в течение 1 часа в темноте. После инкубации со вторичными антителами, к каждой пробирке добавляли 1,0 мл буфера для окрашивания и центрифугировали при 1200 об./мин. в течение 3 минут. Осадок клеток еще раз промывали 1,0 мл буфера для окрашивания и ресуспендировали в 500 мкл буфера для окрашивания. Образец анализировали с помощью проточного цитометра, и представляли данные в виде наложения окрашивания с помощью антител против рецептора на окрашивание с помощью противокроличьих антител IgG FITC.

[0182] Результаты демонстрируют, что из протестированных клеточных линий ORL-1 экспрессировался на поверхности приблизительно 50% клеток, включающих стабильные клеточные линии SiMa, SiMa P>33, клон H10, ND7 и SK-N-DZ; экспрессировался на поверхности приблизительно от 25% до 50% клеток, включающих стабильные клеточные линии SH-SY5Y и ND15; и экспрессировался на поверхности менее чем приблизительно 25% клеток, включающих стабильные клеточные линии ND3, ND8, N18 и Neuro-2a (Таблица 2). Результаты также демонстрируют, что KOR экспрессировался на поверхности приблизительно 50% клеток, включающих стабильные клеточные линии SH-SY5Y и ND7; экспрессировался на поверхности приблизительно от 25% до 50% клеток, включающих стабильные клеточные линии клона H10 SiMa, SiMa P>33, ND15

и Neuro-2a; и экспрессировался на поверхности менее чем приблизительно 25% клеток, включающих стабильные клеточные линии ND3, ND8 и N18 (Таблица 2). Результаты также выявили, что MOR экспрессировался на поверхности приблизительно 50% клеток, включающих стабильные клеточные линии ND7, ND15 и SiMa P>33; экспрессировался на поверхности приблизительно от 25% до 50% клеток, включающих стабильные клеточные линии SH-SY5Y, клон SiMa H10, ND8 и Neuro-2a; и экспрессировался на поверхности менее чем приблизительно 25% клеток, включающих стабильные клеточные линии ND3 и N18 (Таблица 2). Кроличьи поликлональные антитела α -DOR RA10101 оказались не способны функционировать должным образом и не позволили получить пригодные к использованию данные.

б. Идентификация клеточных линий с использованием связывания лиганда

[0183] Для идентификации клеток, включающих стабильные клеточные линии, которые экспрессируют рецепторы-мишени эндопептидаз с измененной нацеленностью на поверхности клетки, проводили анализ с помощью связывания лиганда. Клетки из тестируемых клеточных линий-кандидатов инкубировали в 96-луночных планшетах с черно-прозрачным дном в течение приблизительно 4 часов для стимуляции прикрепления клеток к поверхности. Для проведения скрининга на присутствие опиоидных или опиоидоподобных рецепторов, среду из каждой лунки удаляли аспирацией и заменяли 50 мкл раствора лиганда, содержащего 0 (необработанный контроль), 0,001 нМ, 0,01 нМ, 0,1 нМ или 1 нМ FAM-ноцицептина (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. Берлингем, Калифорния); или 0 (необработанный контроль), 0,001 нМ, 0,01 нМ, 0,1 нМ или 1 нМ FAM-динорфина А (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Берлингем, Калифорния). Клетки инкубировали с раствором лиганда в течение 1 часа в инкубаторе при 37°C и 5% углекислого газа. Клетки промывали для удаления несвязавшегося лиганда путем трехкратной промывки клеток 100 мкл 1 × ФБР. Планшет сканировали на Turboon (Ex 488 и Em 520 нм), а затем считывали на сканере для планшетов M5 (Ex 495 и Em 520 нм) для сигналов ОФЕ. Результаты демонстрируют, что клетки, включающие стабильные клеточные линии клона SiMa H10, SH-SY5Y и SK-N-DZ, связывали ноцицептин, тогда как клетки, включающие клон SiMa H10, связывали также и динорфин (Таблица 2).

Таблица 2.

Клеточные линии, экспрессирующие рецепторы-мишени на поверхности клеток					
Рецептор-мишень	Идентифицированные клеточные линии				
	Проточная цитометрия			Связывание лиганда	
	Экспрессия более 50%	Экспрессия от 25% до 50%	Экспрессия менее 50%	Ноцицептин	Динорфин А
ORL-1	AGN P33, SiMa, клон SiMa H10, ND7, SK-N-DZ	SH-SY5Y, ND15	ND3, ND8, N18, Neuro-2a	Клон SiMa H10, SH-SY5Y, SK-N-DZ	-

Таблица 2.

Клеточные линии, экспрессирующие рецепторы-мишени на поверхности клеток					
Рецептор-мишень	Идентифицированные клеточные линии				
	Проточная цитометрия			Связывание лиганда	
	Экспрессия более 50%	Экспрессия от 25% до 50%	Экспрессия менее 50%	Ноцицептин	Динорфин А
DOR	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.
KOR	SH-SY5Y, ND7	Клон SiMa H10, AGNP33, ND15, Neuro-2a	ND3, ND8, N18	-	Клон SiMa H10
MOR	ND7, ND15, AGN P33	SH-SY5Y, клон SiMa H10, ND8, Neuro-2a	ND3, N18	Н.Д.	Н.Д.

[0184] Используя подобный подход, можно идентифицировать клеточные линии, включающие клетки, имеющие родственные рецепторы для других эндопептидаз с измененной нацеленностью, с помощью FAM-мечения нацеливающего домена для этих

эндопептидаз и скрининга клеточных линий как описано выше.

3. Скрининг клеточных линий-кандидатов при воздействии единичной дозы эндопептидазы с измененной нацеленностью

[0185] Для определения способности клеточной линии поглощать молекулы соответствующей эндопептидазы с измененной нацеленностью, подходящую плотность клеток из запасной культуры тестируемой клеточной линии засеивали в лунки 24-луночных планшетов для культур тканей, содержащих 1 мл соответствующей питательной среды с сывороткой (Таблица 1). Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C и концентрации углекислого газа 5% до достижения клетками желаемой плотности (приблизительно 18-24 часа). Для оценки поглощения эндопептидазы с измененной опиоидной нацеленностью, питательную среду из каждой лунки удаляли аспирацией и заменяли 1) свежей питательной средой, не содержащей эндопептидазы с измененной опиоидной нацеленностью (необработанная клеточная линия), или 2) свежей питательной средой, содержащей 30 нМ эндопептидазы с измененной ноцицептиновой нацеленностью (Noc/A) или 100 нМ эндопептидазы с измененной динорфиновой нацеленностью (Dun/A) (обработанная клеточная линия). После инкубации в течение ночи клетки промывали, удаляя аспирацией питательную среду и прополаскивая каждую лунку 200 мкл 1 × ФБР. Для сбора клеток удаляли аспирацией 1 × ФБР, клетки лизировали, добавляя 50 мкл 1 × ДСН буфера для загрузки, лизат переносили в новые пробирки и нагревали образцы при 95°C в течение 5 минут.

[0186] Для детектирования как нерасщепленного субстрата SNAP-25, так и продуктов расщепления SNAP-25, аликвоту от каждого собранного образца анализировали с помощью Вестерн-блот анализа. В ходе такого анализа 12 мкл аликвоты собранных образцов разделяли в полиакриламидном геле с MOPS с использованием готовых 12% Bis-Tris полиакриламидных блоков NuPAGE® Novex (Invitrogen Inc., Карлсбад, Калифорния) в денатурирующих восстанавливающих условиях. Разделенные пептиды переносили из геля на поливинилиденфторидные (ПВДФ) мембраны (Invitrogen Inc., Карлсбад, Калифорния) путем Вестерн-блоттинга с использованием аппарата для электрофоретического переноса полусухим способом TRANS-BLOT® SD (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния). ПВДФ мембраны блокировали путем инкубации при комнатной температуре в течение 2 часов в растворе, содержащем трис-буферный раствор (TBS) (25 мМ 2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол соляная кислота (Трис-HCl) (pH 7,4), 137 мМ хлорид натрия, 2,7 мМ хлорид калия), 0,1% Tween-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат), 2% бычий сывороточный альбумин (BSA), 5% обезжиренное сухое молоко. Блокированные мембраны инкубировали при 4°C в течение ночи в TBS, 0,1% Tween-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат), 2% BSA, и 5% обезжиренном сухом молоке, содержащем 1) разведение 1:5,000 мышиных моноклональных аНТН-SNAP-25 антител в качестве первичных антител (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Лютервиль, Мэриленд); или 2) разведение 1:5000 иммунной сыворотки S9684 с поликлональными кроличьими анти-SNAP-25 антителами в качестве первичных антител (Sigma, Сент-Луис, Миссури). Как мышиные моноклональные, так и поликлональные кроличьи анти-SNAP-25 антитела могут узнавать как нерасщепленный субстрат SNAP-25, так и продукт расщепления SNAP-25, что позволяет оценивать общую экспрессию SNAP-25 в каждой клеточной линии и процент расщепленного SNAP-25 после обработки эндопептидазами с измененной нацеленностью в качестве параметра для оценки количества поглощения эндопептидаз с измененной нацеленностью. После связывания первичных антител блоты промывали три раза по 5 минут каждый раз в TBS, Tween-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат).

Промытые мембраны инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов в TBS, 0,1% Tween-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат), 2% BSA, и 5% обезжиренном сухом молоке, содержащем 1) разведение 1:10000 поликлональных козьих противомышинных иммуноглобулинов G, тяжелых и легких цепей (IgG, H+L) антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Zymed, Южный Сан-Франциско, Калифорния) в качестве вторичных антител; или 2) разведение 1:10000 поликлональных козьих противокроличьих иммуноглобулинов G, тяжелых и легких цепей (IgG, H+L) антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Zymed, Южный Сан-Франциско, Калифорния) в качестве вторичных антител. После связывания вторичных антител блоты промывали три раза в течение 15 минут каждый раз в TBS, 0,1% Tween-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат). Сигнал детектирования меченых продуктов SNAP-25 визуализировали с использованием системы для усиленного хемилюминесцентного детектирования ECL Plus™ Western Blot Detection System (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Пискатауэй, Нью-Джерси), мембраны проявляли и проводили количественную оценку продуктов расщепления SNAP-25 с помощью устройства для анализа изображений Typhoon 9410 Variable Mode Imager и программы для анализа изображений (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Пискатауэй, Нью-Джерси). Выбор размера пикселя (от 100 до 200 пикселей) и настройки напряжения ФЭУ (от 350 до 600, как правило, 400) зависели от конкретного блота.

[0187] На основании детектирования продукта расщепления SNAP-25, следующие клеточные линии демонстрировали поглощение 30 нМ Noc/A: BE(2)-C, N18TG2, Neuro-2a, SiMa, SK-N-BE(2)-C и SK-N-DZ (Таблица 3); в то время как следующие клеточные линии демонстрировали поглощение 100 нМ Dyn/A: N18TG2, Neuro-2a, PC12 и SiMa. Некоторые из этих чувствительных клеточных линий тестировали с более низкими дозами соединений и/или на полнодозовый ответ.

Таблица 3. Скрининг клеточных линий-кандидатов при воздействии единичной дозы эндопептидаз с измененной нацеленностью noc/a и dyn/a

Клеточная линия	Описание	Источник	Поглощение 30 пМ Noc/A	Поглощение 100 пМ Dyn/A
BE(2)-C	Нейробластома человека	ATCC CRL-2268	Да	НТ
N18TG2	Нейробластома мыши	DSMZ ACC 103	Да	Да
ND3	Нейробластома мыши/первичный неонатальный гибрид DRG крысы	EC ACC 92090901	ДКО	ДКО
ND7/23	Нейробластома мыши/первичный гибрид DRG крысы	EC ACC 92090903	Нет	Нет
ND8	Нейробластома мыши/первичный неонатальный гибрид DRG крысы	EC ACC 92090904	ДКО	ДКО

Таблица 3. Скрининг клеточных линий-кандидатов при воздействии единичной дозы эндопептидаз с измененной нацеленностью noc/a и dyn/a

Клеточная линия	Описание	Источник	Поглощение 30 пМ Noc/A	Поглощение 100 пМ Dyn/A
ND15	Нейробластома мыши/первичный неонатальный гибрид DRG крысы	EC ACC 92090907	Нет	Нет
Neuro-2a	Нейробластома мыши	ATCC CCL-131	Да	Да
NG108-15	Нейробластома мыши/гибрид глиомы крысы	EC ACC 88112302	Нет	НТ
PC12	Феохромоцитома крысы	ATCC CRL-1721	НТ	Да
SH-SY5Y	Нейробластома человека	ATCC CRL-2266	Нет	НТ
SiMa	Нейробластома человека	DSMZ ACC 164	Да	Да
SK-N-BE(2)-C	Нейробластома человека	ATCC CRL-2271	Да	НТ
SK-N-DZ	Нейробластома человека	ATCC CRL-2149	Да	НТ

SK-N-F1	Нейробластома человека	ATCC CRL-2142	Нет	НТ
SK-N-SH	Нейробластома человека	EC ACC 86012802	Нет	НТ

НТ: Не Тестировали.
ДКО (детектируемое количество отсутствует); В данной клеточной линии не было обнаружено детектируемое количество SNAP-25.

5 [0188] Используя подобный подход, можно оценивать поглощение эндопептидаз с измененной нацеленностью клеточными линиями, включающими клетки, имеющие родственные рецепторы для других эндопептидаз с измененной нацеленностью.

Пример II

10 Скрининг экспрессии эндогенного рецептора эндопептидазы с измененной нацеленностью в клональных клеточных линиях-кандидатах

1. Скрининг клональных клеточных линий-кандидатов, полученных из родительской клеточной линии SiMa, при воздействии единичной дозы эндопептидазы с измененной нацеленностью

15 [0189] Родственная заявка на патент на имя Zhu Hong et al., Ce// Lines Useful in Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, заявка на патент США Серийный Номер: 61/160199, описывает клональные клеточные линии, полученные из родительской клеточной линии SiMa, которые использовали в тесте на активность BoNT/A, как описано в Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity /Assays, заявка на патент США серийный номер: 12/403531, каждая из которых
20 полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки. Для определения, способны ли эти клональные клеточные линии к поглощению соответствующей эндопептидазы с измененной нацеленностью, каждую из них подвергали скринингу с помощью «сэндвич»-метода твердофазного ИФА с усиленной хемилгоминесценцией.

25 [0190] Для приготовления лизата, обработанного эндопептидазой с измененной нацеленностью, культуру с подходящей плотностью клеток из маточного раствора культуры проверяемой клеточной линии засеивали на ночь в лунки 96-луночных планшетов для культур тканей, содержащих 100 мкл соответствующей питательной среды на основе сыворотки (Таблица 1). Питательные среды от засеянных клеток из
30 каждой лунки удаляли аспирацией и заменяли свежей средой, содержащей 30 нМ эндопептидазы с измененной нацеленностью Nos/A или 80 нМ эндопептидазы с измененной нацеленностью Dup/A. После 24-часовой инкубации клетки отмывали аспирацией питательной среды и ополаскивали каждую лунку 200 мкл 1 × ФБР. Для сбора клеток, 1 × ФБР удаляли аспирацией, клетки лизировали путем добавления в
35 каждую лунку 30 мкл лизирующего буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ EGTA, 1% Тритон X-100, и инкубировали планшет на встряхивателе с вращением при 500 об./мин. в течение 30 минут при 4°C. Для осаждения остатков клеток планшет центрифугировали при 4000 об./мин. в течение 20 минут при 4°C, после чего супернатант переносили в 96-луночный планшет, покрытый антителами для захвата для проведения этапа детекции.

40 [0191] Для приготовления раствора анти-SNAP-25₁₉₇ антител для захвата, мышинные моноклональные анти-SNAP-25₁₉₇ антитела, находящиеся в составе асцитной жидкости, полученной от гибридомной клеточной линии 2E2A6 (Пример XI), очищали, используя стандартный протокол очистки с использованием белка А.

45 [0192] Для приготовления раствора детектирующих анти-SNAP-25 антител, поликлональные антитела кролика α-SNAP-25, S9684 (Sigma, Сент-Луис, Миссури) конъюгировали с реактивом для меченья - сложным эфиром рутений (II)-трис-бипиридин-(4-метисульфата) и М-ГС (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд) согласно

инструкциям изготовителя (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд). Реакцию конъюгации проводили путем добавления 30 мкл раствора для разведения MSD SULFO-TAG™, разведенного в дистиллированной воде, 200 мкл поликлональных анти-3MAP-25 антител в концентрации 2 мг/мл и инкубации реакционной смеси при комнатной температуре в течение 2 часов в темноте. Помеченные антитела очищали, используя стандартный протокол спин-колонок, и концентрацию белка определяли с использованием стандартного колориметрического теста на белок. Поглощающую способность конъюгатов анти-SNAP-25 антител/MSD SULFO-TAG™ измеряли с помощью спектрофотометра при 455 нм для определения концентрации в молях на литр. Раствор детектирующих антител хранили при 4°C до использования. Длительное хранение неиспользованных аликвот осуществляли при -20°C.

[0193] Для приготовления твердофазной подложки α -SNAP-25, содержащей анти-SNAP-25₁₉₇ антитела для захвата, приблизительно 5 мкл соответствующего раствора моноклональных анти-SNAP-25₁₉₇ антител (20 мкг/мл в 1 × ФБР) добавляли к каждой лунке 96-луночного планшета MSD High Bind, и раствор сушили на воздухе в биологически чистом помещении в течение 2-3 часов до испарения жидкости из раствора. Заблокированные планшеты запечатывали и хранили при 4°C до использования.

[0194] Для детектирования расщепленного продукта SNAP-25 ECL "сэндвич"-методом твердофазного ИФА лунки со связанными антителами для захвата блокировали, добавляя 150 мкл блокирующего буфера, содержащего 2% блокирующего реактива Amersham (GE Life Sciences, Пискэтэуэй, Нью-Джерси) и 10% козьей сыворотки (VWR, Уэст-Честер, Пенсильвания), и инкубируя при комнатной температуре в течение 2 часов. Блокирующий буфер удаляли аспирацией и к каждой лунке добавляли 25 мкл лизата клеток, обработанных эндопептидазой с измененной нацеленностью, и планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи. Лунки планшета трехкратно промывали: удаляли аспирацией клеточный лизат и три раза ополаскивали каждую лунку 200 мкл 1 × ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После отмывки, в каждую лунку добавляли 25 мкл раствора детектирующих анти-SNAP-25 антител в концентрации 5 мкг/мл, содержащего 2% блокирующего реактива Amersham в 1 × ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат), запечатывали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа со встряхиванием. После инкубации с детектирующими анти-SNAP-25 антителами лунки трехкратно промывали 200 мкл 1 × ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После отмывки в каждую лунку добавляли 150 мкл 1 × буфера для считывания (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд) и анализировали планшеты, используя устройство для считывания изображений SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд). Исходные данные собирали, используя устройство для визуализации ECL.

[0195] Результаты демонстрируют, что родительская клеточная линия SiMa, как и клональная клеточная линия H10, показала существенное поглощение эндопептидазы с измененной нацеленностью Noc/A (Таблица 4). Кроме того, эти результаты показывают, что многие клеточные линии демонстрируют поглощение эндопептидазы с измененной нацеленностью Dyn/A (Таблица 4). Три клональных клеточных линии (1E11, AF4, и DC4) продемонстрировали существенное поглощение эндопептидазы с измененной нацеленностью Dyn/A; одиннадцать клональных клеточных линий (1E3, 2D2, 2D6, 3D8, 5C10, 5F3, BB10, BF8, CG8, CG10 и DE7) продемонстрировали умеренное поглощение эндопептидазы с измененной нацеленностью Dyn/A; и (3B8, 2 B9, CE6, YB8, 4C8, 2F5, AC9, CD6, DD10, YF5) продемонстрировали минимальное поглощение эндопептидазы с измененной нацеленностью Dyn/A. Некоторые из этих клеточных

линий-кандидатов исследовали в тесте на полнодозовый ответ с соответствующей эндопептидазой с измененной нацеленностью.

Таблица 4.		
Скрининг клональных клеточных линий-кандидатов при воздействии единичной дозы эндопептидаз с измененной нацеленностью Nос/A и Dyn/A		
Клеточная Линия	Поглощение 30 нМ Nос/A	Поглощение 80 нМ Dyn/A
AGN P33	+++	НТ
A10	-	НТ
D11	-	НТ
H1	-	-
НЮ	+++	-
1D4	НТ	-
2E4	НТ	-
3D5	НТ	-
3G10	НТ	-
4D3	НТ	-
BB3	НТ	-
CC11	НТ	-

Таблица 4.		
Скрининг клональных клеточных линий-кандидатов при воздействии единичной дозы эндопептидаз с измененной нацеленностью Nос/A и Dyn/A		
Клеточная Линия	Поглощение 30 нМ Nос/A	Поглощение 80 нМ Dyn/A
DF5	НТ	-
YB7	НТ	-
BE3	НТ	-
4 B5	НТ	-
2 B9	НТ	+
2F5	НТ	+
3B8	НТ	+
4C8	НТ	+
AC9	НТ	+
CD6	НТ	+
CE6	НТ	+
DD10	НТ	+
YB8	НТ	+
YF5	НТ	+
1E3	НТ	++
2D2	НТ	++
2D6	НТ	++
3D8	НТ	++
5C10	НТ	++
5F3	НТ	++
BF8	НТ	++
BB10	НТ	++
CG8	НТ	++
СОЮ	НТ	++
DE7	НТ	++
1E11	НТ	+++
AF4	НТ	+++
DC4	НТ	+++

НТ: Не Тестировали
 -: нет поглощения; +: минимальное поглощение; ++: умеренное поглощение; +++: существенное поглощение

2. Скрининг клеточных линий-кандидатов на полнодозовый ответ [0196] Стабильные клеточные линии, идентифицированные выше, впоследствии

оценивали, используя полнодозовый ответ на соответствующую эндопептидазу с измененной нацеленностью. Клетки из различных клеточных линий высевали в 96-луночные планшеты и подвергали воздействию различных концентраций Noc/A (0, 0,14 нМ, 0,4 нМ, 1,23 нМ, 3,7 нМ, 11,1 нМ, 33,3 нМ, и 100 нМ) или Dyn/A (0,017 нМ, 0,05 нМ, 0,15 нМ, 0,45 нМ, 1,4 нМ, 4,1 нМ, 12 нМ, 37 нМ, 111 нМ, 333 нМ, и 1000 нМ) в течение 24 часов. Среду, содержащую эндопептидазу с измененной нацеленностью, удаляли и заменяли новой полной средой. Планшеты инкубировали еще в течение 24 часов в атмосфере 5% CO₂ при 37°C для расщепления SNAP-25. Клетки лизировали в буфере для лизиса (Таблица 5) и центрифугировали планшеты для удаления остатков клеток.

Лизаты использовали в Вестерн-блоттинге или в "сэндвич"-методе твердофазного ИФА. [0197] Для анализа с помощью Вестерн-блоттинга образцы тестировали как на наличие интактной SNAP-25, так и на наличие продуктов расщепления SNAP-25, как описано в Примере I.

[0198] Для "сэндвич"-метода твердофазного ИФА, планшеты для твердофазного ИФА, покрытые моноклональными антителами 2E2A6, блокировали 150 мкл блокирующего буфера при комнатной температуре в течение 2 часов. После удаления блокирующего буфера, 25 мкл лизата клеток добавляли в каждую лунку, и планшеты инкубировали при 4°C в течение 2 часов. Планшеты трижды отмывали в ФБР-Т и в нижний угол лунок добавляли 25 мкл детектирующих антител α -SNAP25 pSb, маркированных сложным-эфиром SULFO-TAG N-ГС в концентрации 5 мкг/мл в 2% блокирующем реактиве в ФБР-Т. Планшеты запечатывали и встряхивали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего следовали три отмывки в ФБР-Т. После завершения отмывок, в каждую лунку добавляли 1х буфера для считывания, и планшет считывали в устройстве для считывания изображений SI6000. Для определения чувствительности каждой проверенной клеточной линии, для каждой клеточной линии вычисляли величину EC₅₀. Значения для эндопептидазы с измененной нацеленностью Noc/A приведены в Таблице 5. Тесты на полнодозовый ответ на эндопептидазу с измененной нацеленностью Dyn/A выполняли только на PC 12 и клоне AF4. В обоих случаях тест не достигал верхней асимптоты, и вычислить EC₅₀ было невозможно. Наиболее низкая доза, которая вызывала появление сигнала у клона AF4, составляла 12 нМ для обеих клеточных линий.

Клеточная линия	Описание	Источник	EC ₅₀ поглощения Noc/A	EC ₅₀ поглощения Dyn/A
AGN P33	Нейробластома человека	-	5-10 нМ	НТ
BE(2)-C	Нейробластома человека	ATCC CRL-2268	НТ	НТ
N18TG2	Нейробластома мыши	DSMZ ACC 103	НТ	НТ
N18	Нейробластома мыши	EC ACC 88112301	>100 нМ	НТ
ND3	Нейробластома мыши/первичный неонатальный гибрид DRG крысы	EC ACC 92090901	ДКО	НТ
ND7/23	Нейробластома мыши/первичный гибрид DRG крысы	EC ACC 92090903	>100нМ	НТ
ND8	Нейробластома мыши/первичный неонатальный гибрид DRG крысы	EC ACC 92090904	ДКО	НТ
ND15	Нейробластома мыши/первичный неонатальный гибрид DRG крысы	EC ACC 92090907	>100нМ	НТ
Neuro-2a	Нейробластома мыши	ATCC CCL-131	30 нМ	НТ
NG108-15	Нейробластома мыши/гибрид глиомы крысы	ECACC 88112302	НТ	НТ
PC12	Феохромоцитомы крысы	ATCC CRL-1721	НТ	>1000 нМ
SH-SY5Y	Нейробластома человека	ATCC CRL-2266	НТ	НТ

	SiMa	Нейробластома человека	DSMZ ACC1 64	30 нМ	НТ
	SiMa clone AF4	Нейробластома человека	-	НТ	>300 нМ
	SiMa clone H1	Нейробластома человека	-	>100нМ	НТ
5	SiMa clone H10	Нейробластома человека	-	20 нМ	НТ
	SK-N-BE (2)-C	Нейробластома человека	ATCC CRL-2271	НТ	НТ
	SK-N-DZ	Нейробластома человека	ATCC CRL-2149	0,5-2 нМ	НТ
	SK-N-F1	Нейробластома человека	ATCC CRL-2142	>100нМ	НТ
	SK-N-SH	Нейробластома человека	ECACC 86012802	>100нМ	НТ
10	НТ: Не тестировали. ДКО (детектируемое количество отсутствует): В данной клеточной линии не было обнаружено детектируемое количество SNAP-25.				

[0199] Используя подобный подход, можно проводить скрининг и оценивать клональные клеточные линии, содержащие клетки, которые имеют родственные рецепторы для других эндопептидаз с измененной нацеленностью, на предмет поглощения эндопептидаз с измененной нацеленностью.

Пример III

Оценка влияния условий роста на поглощение эндопептидаз с измененной нацеленностью в клеточных линиях-кандидатах

[0200] Следующий пример иллюстрирует определение условий культивирования, роста и дифференцировки для стабильных клеточных линий, которые максимизируют поглощение эндопептидаз с измененной нацеленностью.

1. Эффекты клеточной дифференцировки и трофических факторов на поглощение эндопептидазы с измененной нацеленностью клеточными линиями-кандидатами

[0201] Для определения способности клеточной дифференцировки или присутствия трофических факторов в питательной среде улучшать поглощение эндопептидазы с измененной нацеленностью, клеточные линии, демонстрирующие существенное поглощение Noc/A, тестировали на питательных средах различного состава. Клеточную культуру подходящей плотности маточного раствора культуры SiMa P>30 исследуемых клеточных линий засеивали в лунки 96-луночных планшетов для культур тканей, содержащие 100 мкл среды без сыворотки, содержащей RPMI1640, 1% Пенициллин-Стрептомицин, 2 мМ L-глутамин, и подкрепленной B27, и N2, или 100 мкл среды без сыворотки, содержащей RPMI1640, 1% Пенициллин-Стрептомицин, 2 мМ L-глутамин, подкрепленной B27, N2 и NGF (Фактор Роста Нервов, 100 нг/мл). Эти клетки растили в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа пока они не дифференцировались, что оценивали при помощи стандартных и рутинных морфологических критериев, таких как прекращение роста и вытяжение неврита (приблизительно 1-2 дня). В качестве контроля, клеточную культуру подходящей плотности из культуры маточного раствора исследуемой клеточной линии засеивали в лунки 96-луночных планшетов для культур тканей, содержащие 100 мкл соответствующей питательной среды (Таблица 1) с NGF (100 нг/мл) или без него. Эти не дифференцированные контрольные клетки выращивали в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа до достижения желаемой плотности клеток (приблизительно 18-24 часа). Среду как от дифференцированных так и от не дифференцированных контрольных культур удаляли аспирацией из каждой лунки и заменяли новой средой, содержащей или 0 (необработанный образец) или различные концентрации Noc/A (0,14, 0,4, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3, и 100 нМ). После обработки в течение 24 часов, клетки отмывали и инкубировали в течение еще 24 часов в среде без эндопептидазы с измененной нацеленностью, чтобы увеличить количество полученного

SNAP-25₁₉₇. Клетки отмывали и собирали для ECL «сэндвич»-метода ИФА как описано в Примере II.

[0202] Эффекты трофических факторов также тестировали на клеточной линии SK-N-DZ. Клетки SK-N-DZ высевали в 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизинном, в количестве 25000 клеток на лунку, в восьми различных средах SM (Таблица 6), и растили в течение 72 часов. Клетки обрабатывали в тех же самых восьми питательных средах эндопептидазой с измененной нацеленностью Noc/A в количествах 0, 0,3 нМ, 3 нМ, и 30 нМ. После 24-часовой обработки клетки отмывали и инкубировали в течение 24 часов в средах без эндопептидаз с измененной нацеленностью, чтобы увеличить количество получаемых продуктов расщепления SNAP-25₁₉₇. Затем клетки отмывали и собирали для анализа с помощью Вестерн-блоттинга как описано в Примере I.

[0203] Дифференцировка не имела эффекта на поглощение Noc/A в клеточной линии SiMa>P30, в то время как она, кажется, улучшала поглощение в клеточной линии SK-N-DZ. Базальные среды имели существенный эффект на поглощение Noc/A в клеточной линии SK-N-DZ, эти среды с RPMI1640, содержащие трофические факторы N2 и B27, оказались лучшей комбинацией поглощения Noc/A. Наличие NGF в питательных средах, казалось, не улучшало поглощение в этих двух исследуемых клеточных линиях.

Таблица 6.			
Эффекты трофических факторов и клеточной дифференцировки на поглощение Noc/A клеточными линиями-кандидатами			
Недифференцированные	Дифференцированные	EC ₅₀ поглощения Noc/A	
		AGN P33	SK-N-DZ
DMEM, 10% ЭБС	-	НТ	>30 нМ
DMEM, 10% ЭБС, N2, B27	-	НТ	3 нМ
DMEM, 10% ЭБС, N2, B27, NGF	-	НТ	3 нМ
DMEM, 10% ЭБС, N2, B27, РК	-	НТ	>30 нМ
RPMI1640, 10% ЭБС	-	НТ	10 нМ
RPMI1640, 10% ЭБС, N2, B27	-	7,2 нМ	1 нМ

Таблица 6.			
Эффекты трофических факторов и клеточной дифференцировки на поглощение Noc/A клеточными линиями-кандидатами			
Недифференцированные	Дифференцированные	EC ₆₀ поглощения Noc/A	
		AGN P33	SK-N-DZ
RPMI1640, 10% ЭБС, N2, B27, NGF	-	9,1 нМ	1 нМ
RPMI1640, 10% ЭБС, N2, B27, РК	-	НТ	10 нМ
-	RPMI 1640, N2, B27	10,2 нМ	1 нМ
-	RPMI 1640, N2, B27, NGF	9,8 нМ	0,6 нМ

NGF: Фактор Роста Нервов; РК: Ретиновая Кислота
НТ: Не тестировали

[0204] Используя подобный подход, можно оценивать условия роста и дифференцировки для клональных клеточных линий, включающих клетки, которые имеют родственные рецепторы для других эндопептидаз с измененной нацеленностью.

Пример IV

Разработка стабильных клеточных линий, экспрессирующих экзогенные рецепторы эндопептидазы с измененной нацеленностью

[0205] Следующий пример иллюстрирует, создание стабильной клеточной линии, экспрессирующей экзогенный рецептор эндопептидазы с измененной нацеленностью.

1. Трансфекция рецептора-мишени в клетки, включающие клеточную линию-кандидата

[0206] Эндопептидаза с измененной нацеленностью Nos/A включает ноцицептиновый нацеливающий домен, который является природным лигандом рецептора, подобного рецептору к Опиоидам - 1 (ORL-1). Для получения экспрессионной конструкции включающей открытую рамку считывания для ORL-1, экспрессионную конструкцию

5 рReceiver-M02/ORL-1 получили от GeneCороеia (GeneCороеia, Джермантаун, Мэриленд).

[0207] В качестве альтернативы, молекулу полинуклеотида, соответствующую аминокислотной последовательности ORL-1 (например, последовательность

10 стандартных процедур (BlueHeron® Biotechnology, Бозелл, Вашингтон). Олигонуклеотиды

длиной 20-50 пар оснований синтезируют, с помощью стандартного фосфорамидитного синтеза. Эти олигонуклеотиды гибридизуют в дуплексы, которые лигируют друг с

15 другом, для получения полноразмерной молекулы полинуклеотида. Эту молекулу полинуклеотида клонируют, с помощью стандартных методов молекулярной биологии, в вектор рUCBНВI по сайту Smal, для получения рUCBНВI/ORL-1. Синтезированную

20 молекулу полинуклеотида исследовали секвенированием с помощью Big Dye Terminator™ Chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния) и секвенатора ABI 3100 (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния). При необходимости можно

25 синтезировать молекулу полинуклеотида, основанную на последовательности аминокислот ORL-1, оптимизированную с обеспечением экспрессии (например, последовательности аминокислот SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 26), для улучшения

30 экспрессии в штаммах *Escherichia coli*. Молекулу полинуклеотида, кодирующего ORL-1, можно изменить таким образом, чтобы 1) она содержала синонимичные кодоны, обычно присутствующие в собственных молекулах полинуклеотидов штаммов

35 *Escherichia coli*; 2) она имела содержание G+C, более соответствующее среднему содержанию G+C собственных молекул полинуклеотидов из штаммов *Escherichia coli*; 3) уменьшить полимононуклеотидные области, находящиеся внутри молекулы

40 полинуклеотида; и/или 4) устранить внутренние регуляторные или структурные сайты, присутствующие внутри молекулы полинуклеотида, см., например, Lance E. Steward et al., Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type A, публикация патента США

45 2008/0057575 (6 марта 2008); and Lance E. Steward et al., Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type E, публикация патента США 2008/0138893 (12 июня 2008). Как только завершили оптимизацию последовательности, олигонуклеотиды длиной 20-50 пар оснований синтезировали с помощью стандартного фосфорамидитного синтеза.

Эти олигонуклеотиды гибридизовали в дуплексы, и лигировали друг с другом, для

50 образования полноразмерной молекулы полинуклеотида. Эту молекулу полинуклеотида клонировали, с помощью стандартных способов молекулярной биологии в вектор рUCBНВI по сайту Smal, для образования рUCBНВI/ORL-1. Синтезированную молекулу

55 полинуклеотида исследовали секвенированием ДНК. При необходимости, можно произвести оптимизацию экспрессии для различных организмов, таких как, например, штаммы дрожжей, клеточные линии насекомых или млекопитающих, см., например, Steward, публикация патента США 2008/0057575, см. выше, (2008); и Steward, публикация патента США 2008/0138893, см. выше, (2008).

Экземпляры молекул полинуклеотидов, кодирующие ORL-1, включают SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62.

60 [01] Для построения экспрессионной конструкции, кодирующей ORL-1, рUCBНВI/ORL-1 расщепляют эндонуклеазами рестрикции, которые 1) вырезают молекулу полинуклеотида, кодирующую открытую рамку считывания ORL-1; и 2) позволяют этой молекуле полинуклеотида функционально связаться с вектором рсDNA3 (Invitrogen,

Inc., Карлсбад, Калифорния). Эту вставку субклонировуют с помощью Т4 ДНК лигазы в вектор pcDNA3, который расщепляют соответствующими эндонуклеазами рестрикции, для получения pcDNA3/ORL-1. Смесь лигаз используют для трансформации электрокомпетентных клеток E.coli BL21 (DE3) (Edge Biosystems, Гейтерсбург, Мэриленд) методом электропорации, и клетки высевают на чашки Лурия-Бертани (pH 7,0) с 1,5% агаром, содержащие 50 мкг/мл ампициллина, и поместят в инкубатор на 37°C для роста в течение ночи. Бактерии, содержащие экспрессионную конструкцию, идентифицируют как устойчивые к ампициллину колонии. Конструкции-кандидаты выделяют, с помощью мини выделения плазмиды способом щелочного лизиса, и проанализируют картированием с помощью расщепления эндонуклеазами рестрикции, для определения наличия и ориентации вставки. Эта стратегия клонирования приведет к получению экспрессионной конструкции pcDNA3, включающей молекулу полинуклеотида, кодирующего ORL-1.

[0208] Эндопептидаза с измененной нацеленностью Dyn/A включает динорфиновый нацеливающий домен, который является природным лигандом к-опиоидного рецептора (KOR). Для получения экспрессионной конструкции, включающей открытую рамку считывания для ORL-1, экспрессионную конструкцию pReceiver-M02/KOR-1 получили от GeneCороеia (GeneCороеia, Джермантаун, Мэриленд). В качестве альтернативы, экспрессионные конструкции кодирующие KOR можно синтезировать и субклонировать для получения экспрессионной конструкции pcDNA3.1/KOR с помощью подхода, подобного описанному выше. Экземпляры аминокислотных последовательностей KOR включают SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30; примеры молекул полинуклеотидов, кодирующих KOR, включают SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66.

[0209] Подобные стратегии клонирования можно использовать, для создания экспрессионных конструкций, кодирующих другие рецепторы к эндопептидазам с измененной нацеленностью, таких как, например, pcDNA3.1/DOR или pcDNA3.1/MOR, pcDNA3.1/Galanin рецептор 1, pcDNA3.1/Galanin рецептор 2, или pcDNA3.1/Galanin рецептор 3. Примеры аминокислотных последовательностей DOR включают SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28;

примеры аминокислотных последовательностей MOR включают SEQ ID NO: 31; примеры аминокислотных последовательностей рецептора Galanin 1 включают SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, и SEQ ID NO: 138; примеры аминокислотных последовательностей рецептора Galanin 2 включают SEQ ID NO: 139; примеры аминокислотных последовательностей рецептора Galanin 3 включают SEQ ID NO: 140. Примеры молекул полинуклеотидов, кодирующих DOR, включают SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64; примеры молекул полинуклеотидов, кодирующих MOR, включают SEQ ID NO: 67; примеры молекул полинуклеотидов, кодирующих рецептор Galanin 1, включают SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, и SEQ ID NO: 143; примеры молекул полинуклеотидов, кодирующих рецептор Galanin 2, включают SEQ ID NO: 144; примеры молекул полинуклеотидов, кодирующих рецептор Galanin 3, включают SEQ ID NO: 145.

[0210] Для введения экспрессионной конструкции, кодирующей рецептор эндопептидазы с измененной нацеленностью, клеточные линии трансфицировали экспрессионной конструкцией, кодирующей рецептор эндопептидазы с измененной нацеленностью. Для трансфекции клеточной линии опиоидным или подобным опиоидному рецептором, клетки клеточной линии-кандидата плотностью 1×10^7 засеивали в колбу T₁₇₅ покрытую Коллагеном IV, и выращивали при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа, пока клетки не достигали желаемой плотности. 4,2 мл раствора для трансфекции готовили путем добавления 4 мл Восстановленной Питательной среды

OPTI-MEM на основе Сыворотки, содержащей 200 мкл LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния), инкубированного при комнатной температуре в течение 5 минут, к 4 мл Восстановленной Питательной среды OPTI-MEM на основе Сыворотки, содержащей 20 мкг pReceiver-M02/ORL-1 или 20 мкг pReceiver-M02/KOR-1. Эту трансфекцию инкубировали при комнатной температуре в течение приблизительно 20 минут. Среду заменяли на 8 мл новой среды без сыворотки и антибиотиков, и к клеткам добавляли раствора для трансфекции. Клетки растили в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа в течение приблизительно 16-18 часов. Среду для трансфекции заменяли новой средой, клетки растили в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа. Через 24 часа среду заменяли новой средой, содержащей антибиотик G418 в концентрации 1 мг/мл (селективная среда), и клетки инкубировали в течение 7 дней. Селективную среду заменяли каждую неделю в течение в общей сложности 4 недель (около 90% клеток погибли и были удалены во время еженедельных замен среды).

[0211] Клеточные линии-кандидаты, трансфицированные рецептором ORL-1, включали SiMa>P30, ND15, ND7, NG108-T15 и клеточные линии SK-N-DZ. Клеточные линии-кандидаты, трансфицированные рецептором KOR-1, включали SiMa, SiMa>P30, ND15, ND7, NG108-T15 и клеточные линии SK-N-DZ. Трансфицированные клетки NG108-T15 не перенесли селекции на G418.

2. Скрининг стабильно трансфицированных клеточных линий на единичную дозу и дозовый ответ с помощью молекул эндопептидаз с измененной нацеленностью

[0212] Клетки из трансфицированных и отобранных клеточных линий-кандидатов из предыдущего раздела засеивали в 96-луночный, покрытый поли-D-лизином, или Коллагеном IV, планшет в количестве 1×10^5 клеток/луночку в среде RPMI1640, содержащей N2 и добавки B27, и NGF (50-100 нг/мл) и растили в течение 20 ± 4 часов до обработки составом. Затем клетки, стабильно трансфицированные рецептором ORL-1, обрабатывали эндопептидазой с измененной нацеленностью Noc/A в концентрации 30 нМ в той же самой среде в течение 24 ± 2 часов, за исключением клеточной линии SK-N-DZ, которую обрабатывали 10 нМ эндопептидазы с измененной нацеленностью. Клетки лизировали в 120 мкл лизирующего буфера, и 20 мкл лизата смешивали с $2 \times$ ДСН буфером для анализа с помощью Вестерн-блоттинга, который проводили как описано в Примере I. Все линии клеток показали повышенное поглощение состава Noc/A с измененной нацеленностью, после трансфекции рецептором ORL-1 (Таблица 7).

Таблица 7.
Стабильно трансфицированные ORL-1 клеточные линии, протестированные с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью Noc/A

Клеточная линия	Описание	% расщепленного SNAP25 при 30 нМ	
		Нетрансфицированные	Трансфицированные
AGN P33	Нейробластома Человека	20%	40%
SK-N-DZ	Нейробластома Человека	25% при 10 нМ	40% при 10 нМ
ND7	Нейробластома Мыши и гибрид клеток DRG крысы	10%	42%
ND15	Нейробластома Мыши и гибрид клеток DRG крысы	8%	20%
NG108-T15	Нейробластома мыши/гибрид глиомы крысы	Клетки не выживают	Клетки не выживают

[0213] Клетки из трансфицированных и отобранных клеточных линий-кандидатов из предыдущего раздела засеивали в 96-луночный планшет, покрытый поли-O-лизином, или Коллагеном IV, в количестве 1×10^5 клеток/луночку в среде RPMI1640, содержащей

10% ЭБС и добавок N2 и B27 и растили в течение 20±4 часов до обработки составом. Клетки, стабильно трансфицированные рецептором KOR-1, обрабатывали эндопептидазой с измененной нацеленностью Dyn/A в концентрации 100 нМ в той же самой среде в течение 24±2 часов. Клетки лизировали в 120 мкл лизирующего буфера, и 20 мкл лизата смешивали с 2 × ДСН буфером для анализа с помощью Вестерн-блоттинга, который проводили как описано в Примере I. Все линии клеток показали увеличение поглощения состава Dyn/A с измененной нацеленностью после трансфекции человеческим рецептором KOR-1.

3. Селекция стабильно трансфицированных клональных клеточных линий, проявляющих высокую чувствительность, способом серийных разведений

[0214] Следующий пример иллюстрирует, как идентифицировать клональные клетки из стабильно трансфицированной стабильной клеточной линии, которые восприимчивы к действию эндопептидазы с измененной нацеленностью или имеют способность к поглощению эндопептидазы с измененной нацеленностью.

[0215] Для клонирования единственной клетки из отобранных клеток, описанных выше, использовался метод клонирования клеточной линии способом ограничивающего разведения. Клетки обрабатывали трипсином, считали, разводили до концентрации 0,5-1 клеток на 100 мкл, и высевали по 100 мкл на лунку на селективные среды в пяти 96-луночных планшетах покрытых поли-0-лизином. Клетки инкубировали более 2 недель, пока на дне лунок не сформировались колонии. Отмечали положительные колонии, происходящие из единственных клеток. Фотографии клонов делали с помощью камеры микроскопа. Клетки из лунок с единственным клоном выращивали в течение еще одной недели и переносили в 24-луночные планшеты спустя приблизительно через 4 недели от начала клонирования.

[0216] Главным критерием, используемым для отбора положительных клонов, являлся уровень расщепления SNAP-25 после обработки Noc/A или Dyn/A, который измеряли с помощью анализа методом Вестерн-блоттинга с антителами, которые распознают как интактный, так и расщепленный антиген SNAP-25. Клоны, сверхэкспрессирующие ORL-1, тестировали с 10 нМ, и 30 нМ эндопептидазы с измененной нацеленностью Noc/A в течение ночи, как только появлялось достаточное количество клеток (Таблица 8). Клоны, сверхэкспрессирующие KOR-1, тестировали со 100 нМ эндопептидазы с измененной нацеленностью Dyn/A, в течение ночи (Таблица 9). Кроме того, клоны, сверхэкспрессирующие KOR-1, тестировали при помощи теста связывания Динорфина, как описано в Примере I.

Таблица 8.				
Скрининг на единичную дозу стабильно трансфицированных ORL-1 клональных клеточных линий-кандидатов с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью Noc/A				
Клеточная линия	Номер клона	Поглощение при 10 нМ Noc/A	Поглощение при 30 нМ Noc/A	Повторный скрининг при 1 нМ (% расщепления)
AGN P33	1	+	+	28%
AGN P33	2	++	+++	50%
AGN P33	3		+	НТ
AGN P33	4	НО	НО	НТ
AGN P33	5	-	+	31%
AGN P33	6	++	+++	60%
AGN P33	7	+	+	14%
AGN P33	8	+	+	НТ
AGN P33	9	+	+	38%
AGN P33	10	+	++	29%
AGN P33	11	+	+	НТ
AGN P33	12	+	+	27%

	ND7	1C11	HT	++	HT
	ND7	2F3	HT	-	HT
	ND7	1D10	HT	-	HT
	ND7	1F9	HT	-	HT
5	ND7	1G10	HT	-	HT
	ND7	2D8	HT	-	HT

Таблица 8.

Скрининг на единичную дозу стабильно трансфицированных ORL-1 клональных клеточных линий-кандидатов с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью Noc/A

	Клеточная линия	Номер клона	Поглощение при 10 нМ Noc/A	Поглощение при 30 нМ Noc/A	Повторный скрининг при 1 нМ (% расщепления)
10	ND7	2E2	HT	-	HT
	ND7	4 B7	HT	+++	HT
	ND7	3C11	HT	-	HT
	ND7	3C3	HT	+	HT
	ND7	3E8	HT	-	HT
15	ND7	3E11	HT	-	HT
	ND7	2G3	HT	-	HT
	ND7	4D5	HT	+	HT
	ND7	4D8	HT	+	HT
	ND7	4C8	HT	-	HT
	ND7	4C9	HT	+++	HT
20	ND7	4E8	HT	+	HT
	ND7	2E6	HT	++	HT
	ND7	4F4	HT	+++	HT
	ND7	5D6	HT	-	HT
	ND7	5G3	HT	-	HT
	ND7	4D5	HT	++	HT
25	ND15	1C10	HT	+	HT
	ND15	1F10	HT	++	HT
	ND15	2D8	HT	++	HT
	ND15	2E11	HT	-	HT
	ND15	2F4	HT	++	HT
	ND15	2F10	HT	++	HT
30	ND15	2F11	HT	-	HT
	ND15	3C4	HT	+	HT
	ND15	3C7	HT	++	HT
	ND15	3E8	HT	+++	HT
	ND15	4C8	HT	+	HT
	ND15	4D8	HT	+	HT
35	SK-N-DZ	№2	-	-	HT

Таблица 8.

Скрининг на единичную дозу стабильно трансфицированных ORL-1 клональных клеточных линий-кандидатов с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью Noc/A

	Клеточная линия	Номер клона	Поглощение при 10 нМ Noc/A	Поглощение при 30 нМ Noc/A	Повторный скрининг при 1 нМ (% расщепления)
40	SK-N-DZ	№4	-	-	HT
	SK-N-DZ	№5	+++	++	HT
	SK-N-DZ	№6	HT	++	HT
	SK-N-DZ	№7	+	HT	HT
	SK-N-DZ	№8	-	HT	HT
	SK-N-DZ	№9	+	HT	HT
45	SK-N-DZ	№10	-	HT	HT
	SK-N-DZ	№11	+	+++	HT
	SK-N-DZ	№12	-	HT	HT
	SK-N-DZ	№14	++	HT	HT
	SK-N-DZ	№16	-	HT	HT

	SK-N-DZ	№17	+	+++	НТ
	SK-N-DZ	№19	+	+++	НТ
	SK-N-DZ	№20	-	НТ	НТ
	SK-N-DZ	№23	НТ	++	НТ
5	SK-N-DZ	№25	-	НТ	НТ
	SK-N-DZ	№26	-	++	НТ
	SK-N-DZ	№27	+	НТ	НТ
	SK-N-DZ	№28	++	+	НТ
	SK-N-DZ	№30	++	НТ	НТ
	SK-N-DZ	№31	-	НТ	НТ
10	SK-N-DZ	№32	++	++	НТ
	SK-N-DZ	№33	+	НТ	НТ
	SK-N-DZ	№34	+++	но	НТ
	SK-N-DZ	№35	+	++	НТ
	SK-N-DZ	№36	-	НТ	НТ

Таблица 8.
Скрининг на единичную дозу стабильно трансфицированных ORL-1 клональных клеточных линий-кандидатов с помощью эндопептид измененной нацеленностью Noc/A

Клеточная линия	Номер клона	Поглощение при 10 нМ Noc/A	Поглощение при 30 нМ Noc/A	Повторный скрининг при 1 нМ (% расщепления)
SK-N-DZ	№37	+++	++	НТ
SK-N-DZ	№42	-	НТ	НТ
SK-N-DZ	№43	+	++	НТ

НО: Не Определено; НТ: Не Тестировали.

-: нет поглощения;+: минимальное поглощение;+: умеренное поглощение;+++: существенное поглощение

Таблица 9.

Скрининг на единичную дозу стабильно трансфицированных KOR-1 клональных клеточных линий-кандидатов с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью Dyp/A

Клеточная линия	Номер клона	Поглощение при 100 нМ Dyp/A	Связывание при 100 нМ Dyp	Отобраны для дальнейшего тестирования
SiMa	2	-	-	Нет
SiMa	6	+	+	Нет
SiMa	8	+	+	Нет
SiMa	12	+++	++	Да
SiMa	14	++	++	Нет
SiMa	20	+	++	Нет
SiMa	25	++	++	Нет
AGN P33	1	+++	+	Да
AGN P33	3	++	+	Нет
AGN P33	5	++	+	Да
AGN P33	6	++	+	Нет
AGN P33	7	+++	+	Да
AGN P33	8	++	+	Да
AGN P33	9	+++	+	Да
AGN P33	10	+++	+	Да
AGN P33	11	++	+	Нет
AGN P33	12	+++	+	Да
AGN P33	14	+	+	Нет

Таблица 9.
Скрининг на единичную дозу стабильно трансфицированных KOR-1 клональных клеточных линий-кандидатов с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью Dyp/A

Клеточная линия	Номер клона	Поглощение при 100 нМ Dyp/A	Связывание при 100 нМ Dyp	Отобраны для дальнейшего тестирования
AGN P33	16	++	+	Нет
AGN P33	17	+++	+	Да
AGN P33	21	+	++	Нет
ND7	A1	+	+	Нет
ND7	A2	-	-	Нет

	ND7	A3	-	-	Нет
	ND7	A4	-	-	Нет
	ND7	A5	-	-	Нет
	ND7	A6	-	-	Нет
5	ND7	A7	-	-	Нет
	ND7	A8	-	-	Нет
	ND7	A9	-	-	Нет
	ND7	A10	-	-	Нет
	ND7	AH	-	-	Нет
	ND7	A12	+++	+++	Да
10	ND7	B1	-	-	Нет
	ND7	B2	-	-	Нет
	ND7	B3	-	-	Нет
	ND7	B4	-	-	Нет
	ND7	B5	+	+	Да
	ND7	B6	-	-	Нет
15	ND7	B7	-	-	Нет
	ND7	B8	-	-	Нет
	ND7	B9	-	-	Нет
	ND7	B10	-	-	Нет
	ND7	B11	-	-	Нет
	ND7	B12	-	-	Нет
20	ND7	C1	-	-	Нет
	ND7	C2	-	-	Нет
	ND7	C33	-	-	Нет

Таблица 9.

Скрининг на единичную дозу стабильно трансскрибированных клональных клеточных линий-кандидатов с помощью эндопептидазы измененной нацеленностью Dyp/A

Клеточная линия	Номер клона	Поглощение при 100 нМ Dyp/A	Связывание при 100 нМ Dyp	Отобраны для дальнейшего тестирования
25	ND7	C4	-	Нет
	ND7	C5	-	Нет
	ND7	C6	+	Нет
	ND7	C7	-	Нет
30	ND7	C8	-	Нет
	ND7	C9	-	Нет
	ND7	C10	-	Нет
	ND7	C11	-	Нет
	ND7	C12	-	Нет
35	ND7	D1	-	Нет
	ND7	D2	-	Нет
	ND7	D3	-	Нет
	ND7	D4	-	Нет
	ND7	D5	-	Нет
	ND7	D6	++	Да
	ND7	D7	++	Да
40	ND7	D8	-	Нет
	ND7	D9	-	Нет
	ND7	D10	-	Нет
	ND7	D11	-	Нет
	ND7	D12	-	Нет
45	ND7	E1	-	Нет
	ND7	E2	-	Нет
	ND7	E3	-	Нет
	ND7	E4	-	Нет
	ND7	E5	-	Нет

Таблица 9.

Скрининг на единичную дозу стабильно трансфицированных KOR-1 клональных клеточных линий-кандидатов с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью Dyp/A				
Клеточная линия	Номер клона	Поглощение при 100 нМ Dyp/A	Связывание при 100 нМ Dyp	Отобраны для дальнейшего тестирования
5	ND7	E6	-	Нет
	ND7	E7	-	Нет
	ND7	E8	-	Нет
	ND7	E9	-	Нет
	ND7	EЮ	-	Нет
	ND7	E11	-	Нет
	ND7	E12	++	Да
10	ND7	F1	-	Нет
	ND7	F2	-	Нет
	ND7	F3	-	Нет
	ND7	F4	-	Нет
	ND15	A1	-	Нет
	ND15	A2	-	Нет
15	ND15	A3	+	Нет
	ND15	A4	+	Нет
	ND15	A5	-	Нет
	ND15	A6	++	Нет
	ND15	A7	++	Нет
	ND15	A8	++	Нет
20	ND15	A9	+	Нет
	ND15	A10	+	Нет
	ND15	AH	-	Нет
	ND15	A12	-	Нет
	ND15	B1	-	Нет
	ND15	B2	++	Нет
25	ND15	B3	-	Нет
	ND15	B4	-	Нет
	ND15	B5	+++	Да

Таблица 9. Скрининг на единичную дозу стабильно трансфицированных KOR-1 клональных клеточных линий-кандидатов с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью Dyp/A				
Клеточная линия	Номер клона	Поглощение при 100 нМ Dyp/A	Связывание при 100 нМ Dyp	Отобраны для дальнейшего тестирования
30	ND15	B6	+	Нет
	ND15	B7	-	Нет
	ND15	B8	-	Нет
	ND15	B9	-	Нет
35	ND15	B10	-	Нет
	ND15	B11	-	Нет
	ND15	B12	-	Нет
	ND15	C1	-	Нет
	ND15	C2	+++	Да
	ND15	C3	-	Нет
40	ND15	C4	-	Нет
	ND15	C5	+	НТ
	ND15	C6	+++	НТ
	SK-N-DZ	№11	НТ	НО

НО: Не Определено; НТ: Не Тестировали.
 -: нет поглощения; +: минимальное поглощение; ++: умеренное поглощение; +++: существенное поглощение

45 4. Скрининг стабильно трансфицированных клональных клеточных линий на дозовый ответ с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью

[0217] Стабильно трансфицированные клональные клеточные линии-кандидаты из раздела 3 показывающие существенное поглощение эндопептидазы с измененной

нацеленностью Noc/A исследовали в тесте на полнодозовый ответ, для определения чувствительности к эндопептидазе с измененной нацеленностью Noc/A и ее и эффективности. Клетки засеивали в 96-луночные, покрытые поли-D-лизином, или Коллагеном IV, планшеты в количестве 1×10^5 клеток/лунку в среде RPMI 1640, содержащей добавки N2, B27 и NGF (50-100 нг/мл) и выращивали 20 ± 4 часов до обработки составом. Клетки из родительской клеточной линии AGN P33 и клональной клеточной линии ND7 обрабатывали 0, 0,14 нМ, 0,4 нМ, 1,23 нМ, 3,7 нМ, 11,1 нМ, 33,3 нМ и 100 нМ Noc/A в той же самой среде в течение 24 часов плюс инкубировали 24 часа в среде без эндопептидазы с измененной нацеленностью, чтобы допустить расщепление SNAP-25. Клетки из родительской клеточной линии AGN P33 также обрабатывали 0, 0,03 нМ, 0,08 нМ, 0,24 нМ, 0,74 нМ, 2,22 нМ, 6,67 нМ и 20 нМ Noc/A в той же самой среде в течение 24 часов плюс инкубировали 24 часа в среде без эндопептидазы с измененной нацеленностью, чтобы допустить расщепление SNAP-25. Среду удаляли, клетки отмывали и лизировали для исследования «сэндвич»-методом ИФА с усиленной хемилюминесценцией как детализировано в Примере II. Данные от родительской клеточной линии AGN P33 и клональных клеточных линий, стабильно трансфицированных рецептором ORL-1, приведены в Таблице 10. Клоны №2 и №3 продемонстрировали лучшую чувствительность к эндопептидазе с измененной нацеленностью Noc/A и ее более высокую эффективность, чем родительская клеточная линия. Более того, увеличенная чувствительность новых клональных клеточных линий позволила использовать более низкие концентрации для дозового ответа, подтверждая, что новые клональные клеточные линии более чувствительны.

Таблица 10.

Сводная таблица значений отношения сигнала к шуму (С/Ш) и EC_{50} трех наиболее чувствительных клонов, сверхэкспрессирующих ORL-1 на фоне клеточной линии AGN P33

	Родительская линия	Клон 2	Клон 6	Клон 8
Отношение С/Ш 0,03 нМ/ВК		41	26	1,8
Отношение С/Ш 20 нМ/ВК		259	522	33,1
Отношение С/Ш 0,14 нМ/ВК				
Отношение С/Ш 10 нМ/ВК				
EC_{50} (нМ)	$6,8 \pm 1,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,07$	$0,3 \pm 0,2$

[0218] Данные от родительских клеточных линий ND7 и клональных клеточных линий, стабильно трансфицированных рецептором ORL-1, приведены в Таблице 11. Все протестированные клоны продемонстрировали улучшенную чувствительность к эндопептидазе с измененной нацеленностью Noc/A и ее большую эффективность по сравнению с родительской клеточной линией ND7. Клоны 4 В7, 1Е6, и 1С11 оказались самыми чувствительными и имели значение EC_{50} ниже 10 пМ.

Таблица 11.

Сводная таблица значений отношения сигнала к шуму (С/Ш) и EC_{50} шести наиболее чувствительных клонов, сверхэкспрессирующих ORL-1 на фоне клеточной линии ND7

	Родительская линия	1С11	4 В7	4С9	4F4	1Е6	3Е9
Отношение С/Ш 0,14 нМ/ВК	1,7	9,3	11,1	5,3	3,6	5,8	5,1
Отношение С/Ш 100 нМ/ВК	53	217	243	126	169	123	121

ВК							
EC ₅₀ (нМ)	>50	8,6±2	5,7±0,5	33±11	24±5	6,7±1	>30 нМ

[0219] В таблице 12 приведены результаты, полученные от производства и тестирования клональных клеточных линий, сверхэкспрессирующих рецептор ORL-1 на фоне различных клеточных линий.

Таблица 12:
Обзор клональных клеточных линий, которые сверхэкспрессируют рецептор ORL-1 Человека, протестированных с помощью Noc/A

Исходная Клеточная Линия	Вид	Стабильные клеточные линии, протестированные с полной дозой Noc/A	EC ₅₀ (нМ)
AGN P33	Нейробластома человека	Три	0,6-2,5
ND7	Нейробластома крысы и гибрид DRG	Шесть	3,7-8
SK-N-DZ	Нейробластома человека	Нет (семь стабильных клонов отобраны для дальнейшего исследования)	Н/п

Пример V

Получение клональных клеточных ли ни и из родительской клеточной линии SK-N-DZ

[0220] Следующий пример иллюстрирует идентификацию клеток клонов из родительской стабильной клеточной линии, которые восприимчивы к ингибированию экзоцитоза посредством эндопептидазы с измененной нацеленностью или имеют способность поглощать эндопептидазу с измененной нацеленностью.

1. Выделение клональных клеточных линий

[0221] Во время изучения клеточной линии SK-N-DZ мы обнаружили, что клетки, составляющие эту стабильную клеточную линию, содержали клетки по крайней мере пяти различных фенотипов. Для определения, отвечает ли какой либо из этих фенотипов клеток за восприимчивость этой клеточной линии к ингибированию экзоцитоза посредством эндопептидазы с измененной нацеленностью, проводили два различных скрининга способом ограничивающего разведения в результате чего получали одиночные колонии клеток каждого фенотипа.

[0222] Культуру клеток подходящей плотности из маточного раствора культуры SK-N-DZ выращивали в колбе T175, покрытой Коллагеном IV, содержащей DMEM, 10% Эмбриональную Бычью Сыворотку (инактивированную высокой температурой), 0,1 мМ Не Незаменимых Аминокислот, 10 мМ NEPES, 1 мМ пируват натрия, 100 ед/мл Пенициллина, 100 мкг/мл Стрептомицина. После второго пересева клетки обрабатывали трипсином, для получения клеточной суспензии, и определяли концентрацию клеток.

Приблизительно $4,0 \times 10^6$ клеток из этой суспензии переносили в пробирку на 50 мл и разделяли на одиночные клетки интенсивным пропусканием несколько раз через иглу размером 18,5, при помощи шприца на 10 мл. Клетки из этой разделенной одноклеточной суспензии разбавляли до концентрации $0,2 \times 10^6$ клеток/мл, добавлением 15 мл новой питательной среды, и 2,5 мкл этого разведения добавляли к 50 мл новой питательной среды, для получения концентрации 10 клеток/мл. 100 мкл питательной среды из этого заключительного разведенного маточного раствора культуры добавляли в каждую лунку 96-луночных планшетов, покрытых Коллагеном IV, и клетки выращивали в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа без встряхивания в течение четырех недель. Четыре 96-луночных планшета использовали для анализа. Через четыре недели каждую лунку исследовали под микроскопом для идентификации растущих единичных колоний, и в лунку к каждой найденной колонии добавляли 100 мкл новой

питательной среды, клетки выращивали в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа без встряхивания в течение двух недель. Еще через две недели роста, растущие единичные колонии обрабатывали трипсином и переносили в новые 96-луночные планшеты для последующего роста. Как только колонии выросли согласно визуальному наблюдению приблизительно до 1000 клеток, их обрабатывали трипсином, и каждую клеточную суспензию переносили в новую лунку 24-луночного, покрытого Коллагеном IV, планшета. Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа в новой питательной среде, пополняемой при необходимости каждые 2-3 дня. Клетки выращивали, пока культура не достигала приблизительно 60% смыкания или более, при котором их обрабатывали трипсином, и каждую клеточную суспензию переносили в покрытую Коллагеном IV колбу площадью 25 см², на основании смыкания клеток в 24-луночном планшете. Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа в новой питательной среде, пополняемой каждые 2-3 дня, при необходимости. Как только клетки в колбе достигли смыкания 70-80%, их замораживали и хранили в жидком азоте до исследования на восприимчивость к ингибированию экзоцитоза эндопептидазой с измененной нацеленностью Noc/A. Из 384 колоний первоначально выделенных из обоих скринингов, на основе критериев жизнеспособности и роста, отобрали 24 клональных клеточных линии, их выращивали для последующих процедур скрининга. Из них выделили 12 быстро растущих клеточных линий.

2. Первичный скрининг чувствительности клеток из клональной клеточной линии к активности эндопептидазы с измененной нацеленностью с помощью эндопептидазы с измененной нацеленностью

[0223] Для определения, восприимчивы ли клетки из клональной клеточной линии к активности эндопептидазы с измененной нацеленностью Noc/A, первичный скрининг проводили, с помощью иммунологического способа определения активности эндопептидазы.

[0224] Тринадцать клонов SK-N-DZ (№3, №4, №5, №8, №9, №10, №13, №15, №16, №17, №18, №22, и №23) плюс родительские клетки SK-N-DZ высевали в 96-луночный планшет (число клеток на лунку неизвестно) в EMEM, 10% ЭБС, 1xV27, и 1xN2 и инкубировали в течение ночи. Клетки обрабатывали Noc/A в концентрации 1 нМ в течение 24 часов. Клетки лизировали в 100 мкл лизирующего буфера в течение 20 минут и центрифугировали при 4000 об./мин. в течение 20 минут. К 50 мкл лизата добавляли пятьдесят микролитров 2x ДСН буфера для образцов и нагревали до 95°C в течение 5 минут. Десять микролитров белковых образцов загружали на лунку 12% геля NuPage и производили анализ с помощью Вестерн-блоттинга как описано в Примере I. Оценка количества общего SNAP-25 и расщепленного SNAP-25 показала, что клоны №3, №8, №15, и №22 способны к поглощению Noc/A, по крайней мере, как родительские клетки. Обработка для теста на полнодозовый ответ и анализ при помощи «сэндвич»-методом ИФА с усиленной хемилюминесценцией проводились после того как количество клеток увеличили.

3. Вторичный скрининг на ответ клональных клеточных линий с помощью молекул эндопептидазы с измененной нацеленностью

[0225] Для определения, восприимчивы ли клетки из клональной клеточной линии к активности эндопептидазы с измененной нацеленностью Noc/A, проводили вторичный скрининг, с помощью иммунологического способа определения активности эндопептидазы.

[0226] Для дальнейшего сравнения этих клонированных клеточных линий SK-N-DZ, проводили ECL «сэндвич»-метода ИФА. Пять клонов (№3, №9, №15, №16, №22) плюс

родительские клетки SK-N-DZ засевали в 96-луночные, покрытые поли-D-лизином, планшеты, по клеточной линии на планшет, в количестве 25000 клеток на лунку в среде, RPMI 1640 с 10% ЭБС, 1×B27, и 1×N2 (без NGF) и выращивали в течение выходных. Клетки обрабатывали Noc/A в дозах от 0 до 20 нМ (0, 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67, 20 нМ) в течение 24 часов. Количественно расщепленного SNAP-25₁₉₇ определяли способом ECL ИФА как описано в Примере I.

[0227] В таблице 13 приведены значения EC₅₀ и отношения сигнал-шум для пяти клонов и их родительской клеточной линии. По сравнению с родительской клеточной линией, клоны №16 и №22 демонстрировали сходные значения EC₅₀ (~2 нМ), а три клона, названные №3, №9, и №15, демонстрировали меньшие значения EC₅₀ (<1 нМ). Однако общий сигнал от расщепленного SNAP-25 был выше в клонах №3, №22 и родительских клетках. Клоны №9, №16, и №15 имели более низкий общий уровень сигнала по сравнению с остальными клеточными линиями.

Таблица 13.

Сводная таблица значений отношения сигнала к шуму (С/Ш) и EC₅₀ пяти клонов, полученных из клеток SK-N-DZ с помощью клонирования путем ограничивающего разведения.

	Родительская линия	3	9	19	16	22
Отношение С/Ш 0,03 нМ/ВК	2	3	2	2	2	3
Отношение С/Ш 20 нМ/ВК	19	27	12	8	14	20
EC ₅₀ (нМ)	2,6±1,5	0,8±0,07	0,7±0,04	0,6±0,1	2,2±0,8	1,9±0,6

[0228] Условия обработки Noc/A клонов SK-N-DZ оптимизировали, и проводили анализ сравнивающий клоны №3, №15, №22, и гетерогенную родительскую клеточную линию SK-N-DZ. В Таблице 14 показаны результаты сравнения и продемонстрировано, что оптимизация анализа сильно улучшила отношение сигнал-шум. Клоны №3 и №22 отбирали для дальнейшей разработки анализа, поскольку они обладают превосходной чувствительностью и эффективностью.

Таблица 14.

Сводная таблица значений отношения сигнала к шуму (С/Ш) и EC₅₀ трех клонов, полученных из клеток SK-N-DZ с использованием оптимизированных условий.

	Родительская линия	3	15	22
Отношение С/Ш 0,03 нМ/ВК	15	8	5	10
Отношение С/Ш 20 нМ/ВК	107	89	33	60
EC ₅₀ (нМ)	0,6±0,2	0,9±0,2	0,6±0,1	0,4±0,09

Пример VI

Исследование и сравнение клональных клеточных линий по критерию поглощения эндопептидаз с измененной нацеленностью

[0229] Следующий пример иллюстрирует исследование и сравнение клональных клеточных линий, полученных либо из стабильных клеточных линий, включающих гетерогенную популяцию, либо с помощью трансфекции рецептора-мишени и последующего клонирования клеточной линии.

[0230] Для оценки специфичности или избирательности поглощения эндопептидаз с измененной нацеленностью проводили тесты на неспецифичное поглощение, используя эндопептидазу с измененной нацеленностью, у которой отсутствует нацеливающий

домен. В случае эндопептидазы с измененной опиоидной нацеленностью клетки клона №6 клеточной линии AGN P33 (включающие клетки, стабильно трансфицированные экспрессионной конструкцией, кодирующей рецептор ORL-1) и клональные клеточные линии №3 и №22 SK-N-DZ (включающие клетки, экспрессирующие эндогенный рецептор ORL-1) засеивали по 150000 клеток на лунку 96-луночных планшетов, покрытых поли-D-лизином, в среду без сыворотки RPMI 1640, содержащую добавки N2 и B27 и NGF (50 нг/мл), и инкубировали в течение 20±4 часов при 37°C в инкубаторе с 5%-м содержанием CO₂ перед этапом обработки соединениями. Клетки обрабатывали 8 дозами Noc/A в диапазоне 0-20 нМ или 0-40 нМ и/или восемью дозами LH_N/A в диапазоне от 0 до 400 нМ или от 0 до 40 нМ в той же самой среде в течение 22 часов. Среду удаляли и клетки промывали, лизировали и центрифугировали для удаления остатков клеток при подготовке к тесту с помощью "сэндвич"-метода твердофазного ИФА. Планшет для ИФА с иммобилизованными моноклональными антителами 2E2A6 блокировали в 150 мкл Блокирующего Буфера при комнатной температуре в течение 1 часа. После блокирования буфер удаляли, в каждую лунку добавляли 30 мкл лизата клеток и инкубировали планшет при 4°C в течение 2 часов. Планшеты трижды промывали ФБР-Т и в нижний угол лунок добавляли 30 мкл поликлональных детектирующих антител Q-SMAR25, маркированных сложным эфиром SULFO-TAG M-ГС, в концентрации 5 мкг/мл в 2% блокирующем реактиве в ФБР-Т. Планшет запечатывали и встряхивали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего следовали три отмывки в ФБР-Т. После завершения отмывок, в каждую лунку добавляли 150 мкл 1х буфера для считывания, и планшет считывали в устройстве для считывания изображений SI6000. Результаты по сравнению поглощения Noc/A относительно отрицательного контроля LH_N/A приведены в Таблице 15 и Таблице 16. Эти результаты демонстрируют наличие четкого разделения между поглощением Noc/A и LH_N/A в обеих клеточных линиях, что свидетельствует о специфичности поглощения Noc/A,

Таблица 15.

Неспецифическое поглощение у клона №3 SK-N-DZ. Приведены данные на основании четырех независимых экспериментов		
нМ	% неспецифического поглощения	СОС (стандартная ошибка среднего)
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

Таблица 16.

Неспецифическое поглощение у клеток hORL-1 №6. Приведены данные на основании трех независимых экспериментов		
нМ	% неспецифического поглощения	СОС (стандартная ошибка среднего)
0	1	0,2
1	2	0,2
2	3	0,6
5	3	0,3
15	8	1,3
44	12	1,9
133	22	3,0
400	32	3,0

[0231] В Таблице 17 обобщены результаты по исследованию и сравнению трех

клеточных линий. Клональные клеточные линии №3 и №22 SK-N-DZ характеризуются чувствительностью, идентичной первичным eDRG, и отличным отношением сигнала к шуму, подходящим для создания надежного теста на эндопептидазу с измененной нацеленностью Noc/A. Клональная клеточная линия №6 AGN P33 также является отличным кандидатом с низким неспецифическим поглощением и подходящей чувствительностью.

Показатель	Клон 3 SK-N-DZ	Клон 22 SK-N-DZ	Клон 6 AGN P33	eDRG
Вид-источник клеточной линии	Клональная человеческая	Клональная человеческая	Клональная человеческая	Первичная крысы
Экспрессия клеточного рецептора	Эндогенный человеческий ORL1	Эндогенный человеческий ORL1	Трансфицированный человеческий ORL1	Эндогенный крысиный ORL1
Динамический диапазон	Ответ от дозы 0,03 до 20 нМ	Ответ от дозы 0,03 до 20 нМ	Ответ от дозы 0,04 до 40 нМ	Ответ от дозы 0,17 до 20 нМ
Чувствительность (EC ₅₀)	EC ₅₀ =0,75±0,1 (N=10)	EC ₅₀ =0,8±0,2 (N=9)	EC ₅₀ =2,4±0,2 (N=21)	EC ₅₀ =0,8±0,15 (N=6)
ВЛНК	20 нМ	20 нМ	20 нМ	10-20 нМ
С/Ш ВЛНК/фон	98±15 (N=10)	86±17 (N=9)	385±32 (N=19)	-300
С/Ш НЛНК/фон	12±2(N=11)	10±2 (N=9)	29±7 (N=18)	Н/П

Специфичность по сравнению с LH _N /A	≥2 log (N=4)	≥2 log (N=4)	≥2 log (N=3)	Н/П
Экспрессия SNAP-25	Эндогенная	Эндогенная	Эндогенная	Эндогенная
Конкуренция с ноцицептиновым вариантом	Полная конкуренция (n=4)	Полная конкуренция (n=4)	Частичная конкуренция (n=4)	Н/П
Ингибирование антителами против ноцицептина	Полная конкуренция (n=4)	Полная конкуренция (n=4)	Полная конкуренция (n=4)	Н/П
Ингибирование антителами анти-868	Частичная конкуренция (n=4)	Частичная конкуренция (n=4)	Частичная конкуренция (n=4)	Н/П

[0232] Для оценки чувствительности поглощения эндопептидаз с измененной нацеленностью проводили тесты на насыщение связывания лиганда. Взаимодействие большинства лигандов с их участками связывания можно охарактеризовать в смысле аффинности связывания (Руководство по Тестам NIH). Вообще, высокая аффинность связывания подразумевает более длительное время нахождения лиганда в соответствующем сайте связывания рецептора, чем в случае низкой аффинности связывания. Константу диссоциации обычно используют для описания аффинности между лигандом (L) (таким как препарат) и белком (P), т.е. степени прочности связывания лиганда с конкретным белком. В эксперименте по насыщению связывания в равновесии измеряют общее и неспецифическое связывание (НСС) при различных концентрациях радиоактивно меченного лиганда. Равновесную константу диссоциации или аффинность к радиоактивно меченному лиганду, K_d, и максимальное число участков связывания рецептора, B_{max}, можно вычислить на основании специфического связывания (общее - НСС) с использованием нелинейного регрессионного анализа. K_d для специфического связывания можно вычислить, используя нелинейный регрессионный анализ гиперболической кривой связывания с одним участком (т.е. GraphPad Prism) как показано в приведенном ниже уравнении, где B_{max} представляет собой максимальное число участков связывания (пмоль/мг или пмоль/клетку или участок/клетку), а K_d (нМ,

пМ и т.д.) представляет собой концентрацию радиоактивно меченного лиганда, необходимую для достижения половины максимального уровня связывания:

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

5

[0233] Для теста с эндопептидазой с измененной опиоидной нацеленностью клетки из клеточной линии клона №6 AGN P33 (включающей клетки, стабильно трансформированные экспрессионной конструкцией, кодирующей рецептор ORL-1), родительской клеточной линии SK-N-DZ и клональных клеточных линий SK-N-DZ №3, №15 и №22 (включающих клетки, которые экспрессируют эндогенный рецептор ORL-1) заседали по 200000 клеток на лунку в 48-луночные покрытые поли-D-лизином планшеты в среду без сыворотки RPMI 1640, содержащую добавки 1×N2 и 1×B27, и инкубировали в течение ночи при 37°C в инкубаторе с 5%-м CO₂. Среду удаляли, и клетки вместе со 150 мкл буфера для связывания на основе Tris добавляли в лунки для оценки общего связывания, а 100 мкл буфера для связывания на основе Tris добавляли в лунку для оценки неспецифического связывания. В лунки для оценки неспецифического связывания добавляли около 50 мкл 4х конечной концентрации немеченого ноцицептина (2,5 мкМ для клеточных линий SK-N-DZ и 1 мкМ для клональной клеточной линии №6 AGN P33), и 50 мкл 4х конечной концентрации ³H-ноцицептина (0 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,2 нМ, 0,4 нМ, 0,8 нМ, 1,6 нМ, 3,1 нМ, 6,3 нМ, 12,5 нМ, 25 нМ и 50 нМ для клеточных линий SK-N-DZ и 0, 0,01 нМ, 0,02 нМ, 0,039 нМ, 0,078 нМ, 0,156 нМ, 0,313 нМ, 0,625 нМ, 1,25 нМ, 2,5 нМ, 5,0 нМ и 10 нМ для клональной клеточной линии №6 AGN P33) добавляли как в лунки для оценки общего связывания, так и в лунки для оценки неспецифического связывания до конечного объема 200 мкл. После инкубации при 37°C в течение 30 минут лунки дважды промывали 0,5 мл холодного Буфера для Промывки. Клетки денатурировали в 200 мкл 2N NaOH и переносили сцинтилляционные флаконы на 20 мл, содержащие 5 мл сцинтилляционной жидкости. Исходные данные использовали для построения кривых доза-эффект и вычисления K_d для каждого образца. Полученные исходные данные переносили в SigmaPlot v10.0 и использовали подбор Насыщения Одного Участка для построения кривых доза-эффект в категории уравнений Связывания Лиганда. Получали графические отчеты, которые содержали следующие параметры: R² (коэффициент корреляции), B_{max} и K_d±SE (Коэффициент ± стандартная ошибка). Кривые общего связывания, специфического связывания и неспецифического связывания получали в тестах, выполненных на клетках клональных клеточных линий №3, №15 и №22 SK-N-DZ и клональной клеточной линии №6 AGN P33. Клональные клеточные линии №3 и №22 SK-N-DZ демонстрировали зависимое от концентрации и насыщаемое связывание ³H-ноцицептина. В тех же самых экспериментальных условиях клональная клеточная линия №15 SK-N-DZ демонстрировала зависимый от дозы ответ на ³H-ноцицептин, но не достигала насыщения при самой высокой дозе 50 нМ. По сравнению с клеточными линиями SK-N-DZ, экспрессирующими эндогенный ORL-1, клетки из клональной клеточной линии №6 AGN P33 демонстрировали значительно более высокую аффинность связывания с ³H-ноцицептином (самая высокая доза составляла 10 нМ по сравнению с 50 нМ для SK-N-DZ) при низком неспецифическом связывании.

45

[0234] Кривые насыщения связывания для клональных клеточных линий №3, №22 и №15 SK-N-DZ и клональной клеточной линии №6 AGN P33 использовали для оценки

значений K_d и B_{max} из трех независимых экспериментов по связыванию для каждой клеточной линии, проведенных в три разные дня. Ранжированный порядок этих четырех клеточных линий таков: клональная клеточная линия №6 AGN P33 ($K_a=1,86$ нМ и $B_{max}=2,9$ фмоль/клетку) > клональная клеточная линия №3 SK-N-DZ ($K_d=14$ нМ и $B_{max}=0,6$ фмоль/клетку) ≥ клональная клеточная линия №22 SK-N-DZ ($K_d=17$ нМ и $B_{max} = 0,6$ фмоль/клетку) >> клональная клеточная линия №15 SK-N-DZ ($K_d>50$ нМ). Для получения данных доза-эффект с насыщением для клональной клеточной линии №15 SK-N-DZ необходимо использовать более высокий диапазон доз 3H -ноцицептина. Таблица 16 обобщает данные исследования участков специфического связывания ноцицептина в плазматической мембране стабильных клеточных линий, три из которых представляют собой клональные клеточные линии №3, №15 и №22 SK-N-DZ, а четвертая - клональную клеточную линию №6 AGN P33. Данные показали следующее: 1) наличие у клональной клеточной линии №6 AGN P33 участка связывания с высокой аффинностью и очень низким неспецифическим связыванием (K_d 1,8 нМ и B_{max} 2,9 фмоль на клетку); 2) связывание ноцицептина может происходить на нативных клетках SK-N-DZ, экспрессирующих эндогенный рецептор; 3) клональная клеточная линия №6 AGN P33 обладала аффинностью к ноцицептину, которая примерно в 10 раз превышала таковую у клеточных линий SK-N-DZ; 4) по наблюдениям в клеточном тесте на активность, клональные клеточные линии №3 и №22 SK-N-DZ (K_o 14-17 нМ, B_{max} 0,6 фмоль на клетку) содержали больше рецепторных участков в пересчете на клетку, чем клональная клеточная линия №15 SK-N-DZ (не достигающая насыщения в том же самом диапазоне доз).

Таблица 18. Обзор тестов насыщения связывания 3H -ноцицептина на четырех ведущих клеточных линиях (n=3 независимых экспериментов)

Клеточные Линии	K_d (нМ±CO)	B_{max} (фмоль/клетку)
SK-N-DZ №3	14±1,6	0,59
SK-N-DZ №15	>50	НО
SK-N-DZ №22	16,7±1,1	0,58
Клональная клеточная линия №6 AGN P33	1,86±0,1	2,89

[0235] Для оценки чувствительности поглощения эндопептидаз с измененной нацеленностью, количество рецепторов эндопептидаз с измененной нацеленностью, экспрессируемых на уровне мРНК, оценивали с помощью ПЦР-РВ. Количество рецептора, экспрессируемого в клетках, является важным аспектом исследования клеточной линии, используемой для тестирования, и связано с чувствительностью к эндопептидазе с измененной нацеленностью. Количество экспрессируемого рецептора эндопептидазы с измененной нацеленностью может также являться инструментом для скрининга других потенциальных клеточных линий и исключения клеточных линий, которые не экспрессируют рецептор-мишень. Одним из методов для измерения экспрессии рецептора является определение количества мРНК рецептора эндопептидазы с измененной нацеленностью с использованием ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

[0236] Для исследования рецептора эндопептидазы с измененной опиоидной нацеленностью РНК выделяли из клеток нетрансфицированной родительской клеточной линии SiMa, клеток из клональной клеточной линии №6 AGN P33, клеток из родительской клеточной линии SK-N-DZ и клеток из клональных клеточных линий №3 и №22 SK-N-

DZ выращенных в среде без сыворотки или в среде с сывороткой. мРНК преобразовывали в кДНК, и ORL-1 амплифицировали и измеряли в реальном времени для определения относительного количества, присутствующего в каждой клеточной линии, используя следующие олигонуклеотидные праймеры для ORL-1: прямой 5'-CACTCGGCTGGTGGTGGTGG-3' (SEQ ID NO: 148) и обратный 5'-AATGGCCACGGCAGTCTCGC-3' (SEQ ID NO: 149). Количество ДНК определяли с использованием красителя SYBR[®] green, флуоресценция которого пропорциональна количеству двухцепочечной ДНК (ПЦР-продукта), присутствующему в реакции.

Логистическую кривую для каждой реакции строили, связывая количество флуоресценции с числом циклов. Чем быстрее реакция достигает линейной фазы кривой, тем больше кДНК рецептора ORL-1 присутствует в реакции. Контрольную реакцию ОТ, в которую не добавляли фермент, использовали для проверки наличия загрязнений. Поскольку в данной реакции отсутствует фермент ОТ, не будет происходить синтез кДНК. ПЦР-продукт не может быть синтезирован на матрице РНК, поэтому единственной возможностью появления кривой ПЦР в реакции -ОТ является загрязнение геномной ДНК. В реакциях -ОТ появление кривой ПЦР не наблюдалось, подтверждая минимальный уровень загрязнения геномной ДНК (данные не показаны). В Таблице 18 приведены клеточные линии и соответствующие им значения СТ. СТ представляет собой число циклов ПЦР, необходимое для того, чтобы сигнал соответствующей реакции ПЦР превысил заданный порог. Количество мРНК рецептора ORL-1 в клеточной линии можно сравнить с данными для других клеточных линий по соответствующим значениям СТ. Согласно значениям СТ, содержание мРНК ORL-1 в клетках из клональной клеточной линии №6 AGN P33 значительно превышало таковое у клеток из родительской клеточной линии SiMa как на среде без сыворотки (Ср. СТ: 28,6 и 17,3), так и на среде с сывороткой (Ср. СТ: 26,1 и 16,5). Кроме того, отличия в количестве мРНК, полученной из клеток из 6 пассажа по сравнению с клетками из 16 пассажа клональной клеточной линии №6 AGN P33, по-видимому, минимальны. Также, отличия значений СТ и кривых между родительской клеточной линией SK-N-DZ и клональными клеточными линиями №3 и №22 минимальны. Это заключение справедливо для клеток, выращенных на среде с сывороткой и на среде без сыворотки, и отражает сходство этих клеточных линий, наблюдаемое в клеточном тесте на активность Nos/A.

Таблица 19.		
Средние значения СТ с обеспечением экспрессии ORL-1 в клеточных линиях		
Среда	Клеточная линия	Среднее СТ
Среда без сыворотки	Родительская SiMa p26	28,6
	Клон №6 SiMa hORL-1 p6	17,3
	Клон №6 SiMa hORL-1 p16	17,3
Полная среда	Родительская SiMa p26	26,1
	Клон №6 SiMa hORL-1 p6	16,4
	Клон №6 SiMa hORL-1 p16	16,6
Среда без	SK-N-DZ	26,3

Таблица 19.		
Средние значения СТ с обеспечением экспрессии ORL-1 в клеточных линиях		
Среда	Клеточная линия	Среднее СТ
сыворотки	Клон №3 SK-N-DZ	25,9
	Клон №22 SK-N-DZ	26,6
Полная среда	SK-N-DZ	26,2
	Клон №3 SK-N-DZ	25,8
	Клон №22 SK-N-DZ	26,4

Пример VII

Получение моноклональных анти-SNAP-25 антител, которые выборочно связывают эпитоп SNAP-25, имеющий свободный карбокси-конец в остатке P_i разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoMT/A

[0237] Следующий пример иллюстрирует изготовление моноклональных аНТН-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связывать эпитоп SNAP-25 с карбокси-концом в остатке P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A.

1. Создание моноклональных аНму-SNAP-25 антител

[0238] Для создания моноклональных аНТН-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связывать SNAP-25 с карбокси-концом в остатке P_i разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, авторы создали пептид с 13 остатками CDSNKTRIDEANQ_{COOH} (SEQ ID NO: 38) в качестве антигена продукта расщепления SNAP-25. Этот пептид включает гибкую связующую область, N-концевой остаток Цистеина для сопряжения с KLH, аминокислоты 186-197 SNAP-25 человека (SEQ ID NO: 5) и карбоксилированный глютамин на C-конце (SEQ ID NO: 38). Генерация моноклональных антител к хорошо подобранным, уникальным последовательностям пептида обеспечивает контроль над нацеленностью эпитопа, позволяя идентификацию особой субпопуляции белка среди множества близких друг к другу изоформ. Поиски Blast показали, что у этого пептида есть высокая гомология только, со SNAP-25 и почти нет возможности перекрестной реактивности с другими белками в нервных клетках. Последовательность также тщательно исследовали, при помощи компьютерных алгоритмов, для определения индекса гидрофобности, вероятности поверхности белка, гибких областей, и вероятной вторичной структуры, после чего следовала надлежащая ориентация и представление выбранной последовательности пептида. Пептид синтезировали и конъюгировали с гемоцианином улитки (KLH), для увеличения иммуногенности. Шесть мышей Balb/c были иммунизированы этим пептидом, и после трех иммунизации, произведенных в течение приблизительно восьми недель, у мышей брали кровь для анализа. Крови позволяли свернуться, инкубируя ее при 4°C в течение 60 минут. Свернувшуюся кровь центрифугировали при 10000x g в 4°C в течение 10 минут для осаждения продуктов распада клеток. Образцы полученной сыворотки разделяли на аликвоты по 50 мкл и хранили в -20°C для дальнейшего использования.

[0239] Подобная стратегия, основанная на других антигенах SNAP-25, раскрытых в настоящем описании, используются, для получения моноклональных анти-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связаться со SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A. Например, антиген SNAP-25 SEQ ID NO: 45 может конъюгировать с KLH вместо антигена SNAP-25 с SEQ ID NO: 38. В качестве другого примера можно привести аминокислоты 186-197 из SNAP-25 человека из антигена SNAP-25 SEQ ID NO: 38, которые могут быть заменены на SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44.

2. Скрининг на наличие моноклональных анти-SNAP-25 антител

[0240] Для определения наличие моноклональных анти-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связываться с антигеном SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, выполняли сравнительный твердофазный ИФА и клеточный тест расщепления, с использованием извлеченной из мышей сыворотки. Для сравнительного твердофазного

ИФА сконструировали два сшитых белка: BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ с SEQ ID NO: 48 и BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ с SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ представлял собой пептид BirA из 16 аминокислот, биотинилированный в природных условиях, SEQ ID NO: 50, который с N-конца был связан с пептидом SNAP-25, включающим аминокислоты 134-197 из SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ представлял собой биотинилированный в природных условиях пептид BirA из 16 аминокислот с SEQ ID NO: 50 связанный своим N-концом с пептидом SNAP-25, включающим аминокислоты 134-206 из SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ и BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ разводили в 1 × ФБР до концентрации 10 мкг/мл. BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ и BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ наносили на отдельные планшеты, добавляя приблизительно 100 мкл подходящего Раствора Субстрата и инкубируя пластины при комнатной температуре в течение одного часа. Отмытые планшеты инкубировали при 37°C в течение одного часа в 0,5% BSA в 1 × TBS, содержащем разведение от 1:10 до 1:100 содержащей антитела сыворотки, полученной от одной из шести иммунизированных мышей (Мышь 1, Мышь 2, Мышь 3, Мышь 4, Мышь 5, и Мышь 6). Планшеты, помеченные первичными антителами, отмывали четыре раза по 5 минут в 200 мкл TBS, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). Вымытые планшеты инкубировали в 37°C в течение 1 часа в 1 × TBS, содержащем, разведенные 1:10000, поликлональные козы антитела против мышинового IgG, конъюгированные с пероксидазой Хрена (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс), в качестве вторичных антител. Планшеты, помеченные вторичными антителами, отмывали четыре раза в 200 мкл TBS, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). Хромогенное детектирование помеченных продуктов SNAP-25 производили с использованием набора субстратов ImmunoPure TMB (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс). Формирование желтой окраски на планшетах, покрытых BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇, но не на планшетах, покрытых BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆, указало на то, что анти-SNAP-25 антитела избирательно распознавали продукт расщепления SNAP-25₁₉₇. В результате, авторы показали, что из шести мышей, использованных для иммунизации, три мыши (Мышь 2, Мышь 3, и Мышь 4) имели более высокие титры и большую специфичность к антигену SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку Pi разрезаемой связи в сайте расщепления токсином ВоNT/A.

[0241] Эти результаты подтвердили, при помощи исследования активности твердофазного ИФА с легкой цепью. Планшеты Reacti-Bind с 96 лунками, покрытые Стрептавидином (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс), готовили, добавляя приблизительно 100 мкл следующих Растворов Субстратов: Ряды А-С покрывали 100 мкл BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ в двенадцати различных концентрациях; Ряды D-H покрывали 100 мкл BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ в концентрации 10 мкг/мл. Планшеты отмывали путем отбора раствора субстрата водоструйным насосом и трехкратного ополаскивания каждой лунки 200 мкл TBS, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). Разбавления ВоNT/A предварительно восстанавливали в 37°C в течение 20 минут в Инкубационном Буфере ВоNT/A (50 мМ HEPES, pH 7,4, 1% эмбриональная бычья сыворотка, 10 мкМ ZnCl₂, 10 мМ дитиотриэтол), 100 мкл

предварительно восстановленного ВоNT/A добавляли на покрытые субстратом планшеты и инкубировали при 37°C в течение 90 минут. Планшеты, обработанные ВоNT/A, отмывали путем отбора Инкубационного Буфера ВоMT/A водоструйным насосом и трехкратного ополаскивания каждого планшета 200 мкл TBS, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). Отмытые планшеты инкубировали при 37°C в течение одного часа в 1 × TBS с 0,5% BSA, содержащем разведения проверяемой, содержащей антитела, сыворотки от 1:10 до 1:100. Планшеты, помеченные первичными антителами, отмывали четыре раза по 5 минут в 200 мкл TBS, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). Отмытые планшеты инкубировали при 37°C в течение 1 часа в 1 × TBS содержащем разведенные 1:10000 поликлональные козы антитела против мышинового IgG, конъюгированные с пероксидазой Хрена (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс), в качестве вторичных антител. Планшеты, помеченные вторичными антителами отмывали четыре раза в 200 мкл TBS, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). Хромогенное детектирование помеченных продуктов SNAP-25 производили с использованием набора субстратов ImmunoPure TMB (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс). При исследовании сыворотки, содержащей антитела, полученной из всех шести иммунизированных мышей (Мышь 1, Мышь 2, Мышь 3, Мышь 4, Мышь 5, и Мышь 6), развитие желтого цвета, которое коррелировало с наличием продукта расщепления SNAP-25₁₉₇, обнаружили в образцах, обработанных ВоNT/A, но не в необработанных контрольных группах. Таким образом сравнительный анализ твердофазный ИФА показал, что среди мышей, использованных для иммунизации, у трех мышей (Мышь 2, Мышь 3, и Мышь 4) были более высокие титры и большая специфичность к антигену SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку Рi разрезаемой связи в сайте расщепления токсином ВоNT/A.

[0242] Для клеточного теста расщепления, клетки РС1₂ подходящей плотности, высевали на планшеты для тканевых культур площадью 60 мм², содержащие 3 мл подходящей питательной среды на основе сыворотки (Таблица 1). Клетки растили в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа до достижения подходящей плотности. 500 мкл раствора для трансфекции готовили, добавляя 250 мкл восстановленной питательной среды ОПТИ-МЕМ на основе сыворотки, содержащей 15 мкл LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Карлсбад, Калифорния), инкубированной при комнатной температуре в течение 5 минут, к 250 мкл восстановленной питательной среды ОПТИ-МЕМ на основе сыворотки, содержащей 10 мкг конструкции с обеспечением экспрессии (SEQ ID NO: 51) pQBI-25/GFP-ВоNT/A-LC. Конструкция с обеспечением экспрессии pQBI-25/GFP-ВоNT/A-LC состоит из экспрессионного вектора pQBI-25 (Qbiogene Inc., Карлсбад, Калифорния), промоторные элементы которого функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим GFP сшитый с легкой цепью ВоNT/A SEQ ID NO: 52. Эту смесь для трансфекции инкубировали при комнатной температуре в течение приблизительно 20 минут. Питательные среды заменяли новыми неполными питательными средами, и к клеткам добавляли 500 мкл раствора для трансфекции. Затем их растили в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа в течение приблизительно 6-18 часов. Клетки отмывали и собирали как описано в Примере II. Для детектирования наличия расщепленного продукта SNAP-25₁₉₇, аликвоту, взятую от каждого собранного образца, анализировали с помощью Вестерн блоттинга как описано в Примере II, за исключением того, что первичное антитело представляло собой разведенную 1:1000 сыворотку, содержащую антитело, а вторичные антитела

представляли собой разведение 1:20000 мышинных антител α -IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс). Используя сыворотку, содержащую антитела, полученную из трех мышей (Мышь 2, Мышь 3, и Мышь 4), единственную окрашенную полосу, соответствующую продукту расщепления SNAP-25₁₉₇, детектировали в образцах, обработанных ВоNT/A, но не в необработанных контрольных группах. Таким образом, клеточный тест расщепления показал, что из мышей, использованных для иммунизации, у трех (Мышь 2, Мышь 3, и Мышь 4) были более высокие титры и большая специфичность к антигену SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку Р₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсинном ВоNT/A.

3. Получение гибридом

[0243] Для создания гибридом, производящих моноклональные анти-SNAP-25 антитела, которые могут селективно связываться с антигеном SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку Р₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсинном ВоNT/A, селезенку Мыши 2 извлекли через три дня, после заключительной "активаторной" иммунизации, клетки селезенки гибридизовали с клетками миеломы Р3-Х63 Ag8.653 с использованием стандартных протоколов гибридом. Эти клетки высевали на пять планшетов с 96-ю лунками, гибридов отбирали на питательной среде НАТ. В течение 8-14 дней после слияния выполняли первый скрининг приблизительно 480 родительских клонов, с использованием сравнительного твердофазного ИФА с пептидами BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ и BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆, нанесенными на два различных планшета. Сравнительный твердофазный ИФА обеспечило быстрый способ скрининга, для идентификации гибридом, производящих антитела, специфичные для продукта расщепления SNAP-25₁₉₇. 18 лучших клонов подвергали дальнейшему скринингу, с использованием клеточного теста расщепления, описанного выше и иммунологического окрашивания клеток, трансфецированных LC/A. (Таблица 20).

Таблица 20.

Анализ супернатантов, содержащих моноклональные анти-SNAP-25 антитела						
Клон	Сравнительный твердофазный ИФА				Тест в клетках	
	OD SNAP-25i97	OD SNAP-25206	Отношение 197/206	Отношени [®] 206/197	SNAP-25i97	SNAP-25206
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	++	-
3C2	0,809	0,052	15,56	0,06	++	-
3E1	0,086	0,155	0,55	1,80	0	-
3E8	2,048	0,053	38,64	0,03	+++	--
3G2	0,053	0,158	0,34	2,98	-	-
4D1	0,106	0,218	0,49	2,06	-	-
4G6	0,061	0,159	0,38	2,61	-	-
5A5	0,251	0,106	2,37	0,42	+	-
5F11	0,243	0,061	3,98	0,25	-	-

[0244] Клоны 1D3, 1G10, 2E2, 3C1, 3C2, и 3E8 повторно клонировали, путем

ограничивающего разбавления, поскольку модифицированные питательные среды, полученные от этих клонов, включали анти-SNAP-25 антитела с избирательной нацеленностью связывания, имеющей отношение_{197/206} продукта расщепления SNAP-25₁₉₇ к нерасщепленному субстрату SNAP-25²⁰⁶ по меньшей мере 4:1, и детектировали продукт расщепления SNAP-25₁₉₇ в клеточном тесте расщепления и иммунологическом окрашивании клеток PC12, трансфицированных GFP-LC/A. Аналогично клоны 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 и 4G6 повторно клонировали, путем ограничивающего разбавления, потому что модифицированные питательные среды, полученные от этих клонов, включали анти-SNAP-25 антитела с избирательной нацеленностью связывания, имеющей отношение_{206/197} по меньшей мере 1,5:1 нерасщепленного субстрата SNAP-25²⁰⁶ к продукту расщепления SNAP-25₁₉₇, и детектировали нерасщепленный субстрат SNAP-25²⁰⁶, в клеточном тесте расщепления. Эти произошедшие от единственной клетки клоны, снова подвергали скринингу с использованием сравнительного твердофазного ИФА, клеточный тест расщепления и иммунологического окрашивания для подтверждения их средства и специфичности, антитела изотипировали с использованием стандартных процедур. Асцитную жидкость получали от клонов 1D3B8 (IgM.k), 1G10A12 (IgGS.k), 2C9B10 (IgGS.k), 2E2A6 (IgGS.k), 2F11B6 (IgM.k), 3C1A5 (IgG2a.k), и 3C3E2 (IgG2a.k). Клон 3E8 прекратил производить антитела во время процесса клонирования и не мог быть оценен.

4. Оценка специфичности связывания моноклональных анти-SNAP-25 антител

[0245] Для оценки специфичности связывания моноклональных анти-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связываться с антигеном SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P_i разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, асцитную жидкость от клонов 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5, и 3C3E2 использовали для детектирования продуктов расщепления SNAP-25, при помощи клеточного теста активности, иммуноцитохимического и иммунопреципитационного анализа.

[0246] Для клеточного теста активности, специфичность связывания определяли путем анализа способности асцитной жидкости, содержащей анти-SNAP-25 антитела, детектировать нерасщепленный субстрат SNAP-25²⁰⁶ и продукты расщепления SNAP-25₁₉₇ путем Вестерн блоттинга. Культуру клеток PC1₂ подходящей плотности высевали на планшеты для тканевых культур площадью 60 мм², содержащие 3 мл подходящей питательной среды на основе сыворотки, выращивали в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа, до подходящей плотности клеток, и трансфицировали как раствором для трансфекции без экспрессионной конструкции pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (не трансфицированные клетки), так и раствором для трансфекции, содержащим экспрессионную конструкцию pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (трансфицированные клетки), как описано выше. Клетки отмывали и собирали как описано в Примере I. Для детектирования присутствия как нерасщепленного субстрата SNAP-25²⁰⁶ так и продуктов расщепления SNAP-25₁₉₇, из каждого образца отбирали аликвоту и анализировали Вестерн блоттингом как описано в Примере I, за исключением того, что первичные антитела представляли собой разведение 1:100 асцитной жидкости, содержащей моноклональные анти-SNAP-25 антитела, а вторичные антитела представляли собой разведение 1:20000 антител против IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс). Кроме того, авторы проверили три коммерчески доступных моноклональных мышинных анти-SNAP-25 антител. Антитела SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Лютервиль, Мэриленд) а-SNAP-

25, которые, как указывает изготовитель, детектируют как нерасщепленный субстрат SNAP-25₂₀₆ так и продукт расщепления SNAP-25₁₉₇, использовались в разведении 15000 согласно рекомендациям производителя. Антитела MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Лас-Вегас, Невада) α-SNAP-25, которые, как указывает изготовитель, детектируют как нерасщепленный субстрат SNAP-25₂₀₆ так и продукт расщепления SNAP-25₁₉₇, использовался в разведении 1:100 согласно рекомендациям производителя. Антитела MC-6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Лас-Вегас, Невада) α-SNAP-25, которые, как указывает изготовитель, детектируют только продукт расщепления SNAP-25₁₉₇, использовался в разведении 1:100 согласно рекомендациям производителя.

[0247] В Таблице 21 приведены асцитные жидкости, содержащие анти-SNAP-25 антитела, которые детектировали только продукт расщепления SNAP-25₁₉₇. Клеточный тест расщепления показал, что в асцитной жидкости, полученной от клонов 1D3B8, 2C9 B10, 2E2A6, 3C1A5, и 3C3E2, синтезируются моноклональные анти-SNAP-25 антитела, имеющие высокую специфичность связывания с продуктом расщепления SNAP-25₁₉₇, что позволяет избирательное узнавание этого продукта расщепления относительно нерасщепленного субстрата SNAP-25₂₀₆. Коммерческие антитела SMI-81 детектировали нерасщепленный субстрат SNAP-25₂₀₆, но слабо распознавали продукт расщепления SNAP-25₁₉₇ (Таблица 21). Удивительно, что коммерческие антитела MC-6050 детектировали только нерасщепленный субстрат SNAP-25₂₀₆, и не смогли распознать продукт расщепления SNAP-25₁₉₇ (Таблица 21). Еще более удивительно то, что коммерческие антитела MC-6050 детектировали только нерасщепленный субстрат SNAP-25₂₀₆, и не могли распознать продукт расщепления SNAP-25₁₉₇, даже при том, что изготовитель заявляет, что эти антитела селективно детектируют продукт расщепления SNAP-25₁₉₇ (Таблица 21). Таким образом этот анализ показал что, в то время как 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, и 3C3E2 проявляют подходящую избирательность для продукта расщепления SNAP-25₁₉₇, 1G10A12 и 2F11B6 такой селективности не проявляют. Кроме того, коммерческие антитела SMI-81, MC-6050 и MC-6053 не являются подходящими для иммунологических методов, описанных в настоящей заявке, потому что они все не могут селективно детектировать продукт расщепления SNAP-25₁₉₇.

[0248] Для иммуноцитохимического анализа, специфичность связывания определяли, анализируя способность асцитной жидкости, содержащей анти-SNAP-25 антитела, детектировать нерасщепленный субстрат SNAP-25₂₀₆ и продукт расщепленная SNAP-25₁₉₇ путем иммунологического окрашивания. См., например, Ester Fernandez-Salas et al., Plasma Membrane Localization Signals in the Light Chain of Botulinum Neurotoxin, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 101(9): 3208-3213 (2004). Культуру клеток PC12 подходящей плотности высевали на планшеты, выращивали, и трансфецировали раствором для трансфекции, без экспрессионной конструкции pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (не трансфецированные клетки) или раствором для трансфекции, содержащим экспрессионную конструкцию pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (трансфецированные клетки), как описано выше. Клетки отмывали в 1 × ФБР и фиксировали в 5 мл PAF при комнатной температуре в течение 30 минут. Фиксированные клетки отмывали в фосфатном буферном солевом растворе, инкубировали в 5 мл 1 × ФБР, содержащим, 0,5% Triton[®] X-100 (эфир октилфенола и полиэтиленгликоли), отмывали в 1 × ФБР и увеличивали проницаемость их мембран в 5 мл метанола при -20°C в течение шести минут. Клетки

с повышенной проницаемостью мембран блокировали в 5 мл 100 мМ глицина при комнатной температуре в течение 30 минут, отмывали в 1 × ФБР, и блокировали в 5 мл 0,5% BSA в 1 × ФБР при комнатной температуре в течение 30 минут.

Заблокированные клетки отмывали в 1 × ФБР и инкубировали при комнатной температуре в течение двух часов в 0,5% BSA в 1 × ФБР, содержащем разведенную 1:10 асцитную жидкость от проверяемой клональной клеточной линии гибридомы. Клетки, обработанные первичными антителами, отмывали три раза по 5 минут в 1 × ФБР. Отмытые клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов в 1 × ФБР, содержащем разведение 1:200 поликлональных козьих антител, конъюгированных с ALEXA® FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Карлсбад, Калифорния), против тяжелых и легких цепей мышинового иммуноглобулина G (IgG, H+L), в качестве вторичных антител. Клетки, обработанные вторичными антителами, отмывали три раза по 5 минут в 1 × ФБР. Отмытые клетки готовили к микроскопическому исследованию, фиксируя их в средах для фиксирования VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Берлингем, Калифорния) и покрывая их покровными стеклами. Изображения, для определения сигнала, получали на конфокальном микроскопе Leica, используя подходящие параметры настройки лазера. Таблица 21 показывает, асцитные жидкости, содержащие анти-SNAP-25 антитела, которые специфически детектировали продукт расщепления SNAP-25₁₉₇.

Иммуноцитохимический анализ показал, что в асцитной жидкости, полученной от клонов 1D3B8, 2C9 B10, 2E2A6, 3C1A5, и 3C3E2, синтезируются моноклональные анти-SNAP-25 антитела, имеющие высокую специфичность связывания с продуктом расщепления SNAP-25₁₉₇, что приводит к преимущественному распознаванию этого продукта расщепления по сравнению с нерасщепленным субстратом SNAP-25₂₀₆.

[0249] Для анализа методом иммунопреципитации, специфичность связывания определяли, анализируя способность моноклональных аНТН-SNAP-25 антител, очищенных Белком А(HiTrap™ ВД Колонки с Белком А, GE Healthcare, Amersham, Пискэтэуэй, Нью-Джерси), преципитировать нерасщепленный субстрат SNAP-25₂₀₆ и расщепленный продукт SNAP-25₁₉₇. См. например главу 8 Storing and Purifying Antibodies, pp.309-311, Harlow & Lane, см. выше., 1998а. Культуру клеток PC12 подходящей плотности высевали на планшеты, выращивали, и трансфецировали раствором для трансфекции, содержащим экспрессионную конструкцию pQBI-25/GFP (контрольные клетки; SEQ ID NO: 53) или раствором для трансфекции, содержащим экспрессионную конструкцию pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (экспериментальные клетки), как описано выше. Экспрессионная конструкция pQBI-25/GFP представляет собой экспрессионный вектор, промоторные элементы которого функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим GFP SEQ ID NO: 54. После инкубации в течение ночи клетки отмывали, отбирая питательную среду водоструйным насосом и ополаскивая каждую лунку 200 мкл 1 × ФБР. Для сборки клеток, ФБР удаляли водоструйным насосом, клетки лизировали добавлением литического буфера для иммунопреципитации, состоящего из 50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl₂, 1 мМ EGDT, 10% глицерина, 1% Triton® X-100 (эфир октилфенола и полиэтиленгликоли) и 1 × коктейля из ингибиторов протеаз COMPLETE™ (Roche Applied Biosciences, Индианаполис, Индиана), и инкубирования при 4~С в течение одного часа. Лизированные клетки центрифугировали при 3000 × g при 4°С в течение 10 минут, для удаления продуктов распада клеток, супернатант переносили в чистую пробирку и разводили до концентрации белка приблизительно 1 мг/мл. Примерно 5 мкг очищенных моноклональных антител добавляли к 0,5 мл разбавленного супернатанта и инкубировали при 4°С в течение двух часов. После

инкубации с первичными антителами, к разбавленному супернатанту добавляли приблизительно 50 мкл иммобилизованного белка G (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс) и инкубировали при 4°C в течение одного часа. Проинкубированный супернатант отмывали три раза по 30 минут, добавлением 0,5 мл литического буфера для иммунопреципитации, центрифугированием при 300 × g в 4°C в течение одной минуты для осаждения гранул с иммобилизованным белком G, с последующим удалением супернатанта. После отмывки осадок повторно взвешивали в 30 мкл 1 × буфера для загрузки на основе ДСН, и полученный образец нагревали до 95°C в течение 5 минут. Для детектирования наличия как нерасщепленного субстрата SNAP-25206 так и расщепленного продукта SNAP-25₁₉₇, аликвоты от каждого собранного образца анализировали Вестерн блоттингом как описано в Примере I, за исключением того, что первичные антитела были разведением 1:1000 поликлональной сыворотки анти-SNAP-25 антител (см. Пример V), а вторичные антитела были разведением 1:20000 антител кролика α-IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс). Таблица 21 указывает асцитную жидкость содержащую анти-SNAP-25 антитела, которая специфически осаждала продукт расщепления SNAP-25₁₉₇ в процессе иммунопреципитации. Анализ методом иммунопреципитации показал, что в асцитной жидкости, полученной от клонов 2E2A6 и 3C1A5, синтезируются моноклональные анти-SNAP-25 антитела, имеющие высокую специфичность связывания с продуктом распада SNAP-25₁₉₇, что приводит к преимущественному распознаванию этого продукта распада по сравнению с нерасщепленным субстратом SNAP-25206.

Таблица 21ю

Анализ асцитной жидкости из клонов, содержащей моноклональные анти-SNAP-25 антитела						
Клон	Тест в клетках		Иммуноцитохимический тест		Иммунопреципитация	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
1D3B8	++	-	++	-	Не Тестировали	Не Тестировали
IG10A12	++	++	Не Тестировали	Не Тестировали	Не Тестировали	Не Тестировали
2C9 B10	++	-	++	-	Не Тестировали	Не Тестировали
2E2A6	++	-	++	-	++	-
2F11B6	+	+	+	+	Не Тестировали	Не Тестировали
3C1A5	++	-	++	-	++	-
3C3E2	+	-	Не Тестировали	Не Тестировали	Не Тестировали	Не Тестировали
MC- 6050	-	+	Не Тестировали	Не Тестировали	Не Тестировали	Не Тестировали
MC- 6053	-	+	Не Тестировали	Не Тестировали	Не Тестировали	Не Тестировали
SMI- 81	-/+	++	Не Тестировали	Не Тестировали	Не Тестировали	Не Тестировали

5. Оценка аффинности связывания моноклональных anti-SNAP-25 антител

[0251] Для определения аффинности связывания моноклональных анти-SNAP-25 антител, проявляющих высокую специфичность связывания или к продукту расщепления SNAP-25₁₉₇ или к нерасщепленному субстрату SNAP-25₂₀₆, выполняли тест аффинности связывания на инструменте BIAcore 3000, используя чипы с сенсорами на основе карбоксиметил декстрана (CM5) (BIAcore, Inc., Пискэтэуэй, Нью-Джерси). Запуски проводились при 25°C с буфером HBS-EP, состоящим из 10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM хлорида натрия, 3 mM ЭДТА, 0,005% (об.) сурфактанта P₂O, при скорости потока 10 мкл/мин. Пептиды SNAP-25, состоящие из аминокислот 134-197 из SEQ ID NO: 5 (SNAP-25134-197) или аминокислот 134-206 из SEQ NO: 5 (SNAP-25134-206) ковалентно присоединяли к поверхности CM5 сенсора чипа при помощи стандартного механизма

сшивки с амином. Вкратце, чипы CM5 активизировали инъекцией смеси 0,2 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида и 0,05 М N-гидроксисукцимида в течение 7 минут; пептиды SNAP-25 в 10 мМ ацетате натрия (pH 4,0) вводили в течение 20 минут при скорости потока 10 мкл/мин; не прореагировавшие сложные эфиры сукцимида
 5 блокировали инъекцией 1 М этаноламин гидрохлорида pH 8,5 в течение 7 минут. Иммуобилизация этого количества SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ или SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ на чипе отразилась

в увеличении единиц ответа на 100-150 (около 0,10-0,15 нг/мм²). Образцы антител, состоящие из асцитной жидкости или очищенных моноклональных антител, полученных
 10 от клонов 1D3B8, 2C9 B10, 2E2A6, 3C1A5, и 3C3E2, также как и коммерчески доступных анти-SNAP-25 антител пропускали по поверхности чипов CM5, так что время ассоциации составляло 10 минут, а время диссоциации - 20 минут. Поверхности восстанавливали между тестами путем инъекции 10 мМ Глицин-HCl (pH 2,5) в течение 1 минуты при скорости потока 15 мкл/мин. В программе BIAevaluation 3.0, кривые сенсограммы соответствовали кинетической модели связывания 1:1.

15 [0252] Результаты показали, что как 2E2A6, так и 3C1A5 были очень специфичными к продукту расщепления SNAP-25₁₉₇ по сравнению с нерасщепленным субстратом SNAP-25 (Таблица 22). По сравнению с аффинностью связывания MC-6050 и MC-6053, 1D3B6 имел в 10 раз большую равновесную константу диссоциации для продукта
 20 расщепления SNAP-25 (Таблица 22). Интересно, что у 2E2A6 равновесная константа диссоциации, для продукта расщепления SNAP-25, была не на много ниже, чем у этих коммерческих антител (0,405 нМ против 0,497 и 0,508) (Таблица 22). Поскольку ни одно из этих коммерческих анти-SNAP-25 антител избирательно не распознавало продукт расщепления SNAP-25 (Таблица 21), равновесная константа диссоциации ниже, чем
 25 приблизительно 0,5 нМ, по-видимому, хотя бы отчасти, является важным условием, для достижения такой избирательности. Аналогично, при сравнении аффинностей связывания MC-6050 и MC-6053, 2E2A6 имел по меньшей мере на порядок более медленную константу скорости обратной реакции/константу диссоциации ($6,74 \times 10^{-5}$
 30 против $8,82 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $1,18 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$) (Таблица 22). Это предполагает, что константа скорости обратной реакции/константа диссоциации, ниже приблизительно $8,82 \times 10^{-4}$, по-видимому, хотя бы отчасти, является важным условием для достижения избирательного связывания продукта расщепления SNAP-25. Этот результат согласуется с данными о 1D3B8, которое имеет константу скорости обратной реакции/константу
 35 диссоциации $5,78 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ (Таблица 22).

Таблица 22. Анализ аффинности связывания моноклональных aH-ni-SNAP-25 антител

Параметр ППР	1D3B8		2E2A6	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^a	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^a
40 Ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	1,06×10 ⁶	-	1,70×10 ⁶ (1,66×10 ⁵)	(-)
Kd (c ⁻¹)	5,78×10 ⁻⁵	-	1,53×10 ⁻⁴ (6,74×10 ⁻⁵)	(-)
KD (нМ)	0,050	-	0,090 (0,405)	(-)
Параметр ППР	3C1A5		2C9B10	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^b	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^r
45 Ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	2,17×10 ⁵	-	1,15×10 ⁴	-
Kd (c ⁻¹)	2,88×10 ⁻⁴	-	3,11×10 ⁻⁴	-
KD (нМ)	1,33	-	27,1	-
Параметр ППР	MC-6050		MC-6053	

	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
Ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	1,78×10 ⁶	3,06×10 ²	2,32×10 ⁶	1,06×10 ²
Kd (c ⁻¹)	8,82×10 ⁻⁴	6,07×10 ⁻³	1,18×10 ⁻³	2,56×10 ⁻⁵
KD (нМ)	0,497	19800	0,508	240

5 ^a При пропускании по поверхности сенсорных чипов CM5 до 125 нМ моноклональных анТН-SNAP-25 антител 1D3B8 после 10-минутного времени ассоциации, связывания не наблюдалось.

^b При пропускании по поверхности сенсорных чипов CM5 до 10 мкМ моноклональных анТН-SNAP-25 антител 2E2A6 после 10-минутного времени ассоциации, связывания не наблюдалось.

^B При пропускании по поверхности сенсорных чипов CM5 до 100 нМ моноклональных

10 анти-SNAP-25 антител 3C1A5 после 10-минутного времени ассоциации, связывания не наблюдалось.

^Г При пропускании по поверхности сенсорных чипов CM5 до 100 нМ моноклональных анти-SNAP-25 антител 2C9 B10 после 10-минутного времени ассоциации, связывания не наблюдалось.

[0253] Для сравнения шести различных антител, константы скорости прямой реакции (ka) и обратной реакции (kd) для каждого из них нормировали, используя программное обеспечение VIA evaluation 4.1. Для констант скорости прямых реакций данные по
15 отдельности обрезали, удаляя часть, отвечающую пику инъекции, и нормируя к масштабу от 0 до 100. Для сравнения констант скорости обратной реакции данные нормировали к точке прекращения/вершины инъекции. Этот анализ показал, что 2C9 B10 имел
20 намного более медленную константу скорости прямой реакции, чем другие антитела (ФИГ.7А), и что у МС-6053 константа скорости обратной реакции (диссоциации) намного более быстрая чем у других антител (ФИГ.7В). Быстрая константа скорости обратной реакции МС-6053, указывает на то, что это антитело не будет
удовлетворительно проявлять себя в методах, описанных в настоящей заявке, потому что этому антителу будет сложно оставаться связанным с антигеном субстрата во время
25 стадий промывки.

6. Секвенирование эпитопа изолированных моноклональных анти-SNAP-25 антител

[0254] Для определения эпитопов изолированных моноклональных анти-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связываться с антигеном SNAP-25, карбоксильный
конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления
30 токсином ВоNT/A, секвенировали молекулы полинуклеотидов, кодирующих переменную тяжелую (V_H) и переменную легкую (V_L), цепи моноклонального anti-SNAP-25 антитела, полученного от гибридом 1D3B8, 2C9 B10, 2E2A6, 3C1A5 и 3C3E2. мРНК из каждой гибридомы выделяли и очищали, используя стандартные протоколы, подвергали обратной транскрипции для получения кДНК, используя в качестве
35 антисмыслового праймера олигодезокситимидин или специфический для гена праймер (мышинный IgG1 CH и каппа CL). Для определения изотипа антитела, полученную кДНК амплифицировали методом ПЦР с использованием специфических мышинных и человеческих праймеров к постоянным доменам. Вырожденные праймеры V_H и V_L
использовали, для амплификации переменных областей на матрице кДНК. Для 5'RACE
40 гомопримерный дЦТФ хвост добавляли к 3' концу кДНК. Затем тяжелые и легкие цепи амплифицировали с олигодезоксигуанозином в качестве смыслового праймера и специфического для гена антисмыслового праймера (CH/KC). ПЦР продукты включали последовательность сигнального пептида, переменных и постоянных областей вплоть
45 до антисмыслового праймера. ПЦР продукты очищали методом гель-электрофореза, для удаления маленьких фрагментов, и клонировали в вектор для клонирования по тупым концам или в вектор ТА для секвенирования. Пять независимых клонов для каждой цепи секвенировали, строили выравнивание для цепей V_H и V_L и определяли

консенсусную последовательность. Методы, использованные для определения последовательности аминокислот для V_H и V_L описаны, например, в Roger A. Sabbadini, et al., Novel Bioactive Lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same, публикация патента 2007/0281320; и Peter Amersdorfer, et al., Molecular Characterization of Mucosal Humoral Immune Response to Botulinum Neurotoxin Type A Binding Domain as Assessed by Using Phage Antibody Libraries, 65(9) Infect. Immun. 3743-3752, каждая из которых включена в настоящую заявку посредством ссылки. Кроме того, доступны коммерческие услуги по секвенированию переменных тяжелой (V_H) и переменных легкой (V_L) цепей антител и идентификации CDR области, см. например, Fusion Antibodies Ltd., Северная Ирландия. В одном случае, для домена V_L 3C1A5, аминокислотную последовательность также определяли путем разделения антител, прошедших аффинную очистку, с помощью двухмерного электрофореза с высоким разрешением и последующего фингерпринт-анализа пептидных фрагментов на наноЖХ-ТМС после протеолитического расщепления.

[0255] Последовательности полинуклеотидов, составляющих цепи V_H и V_L моноклональных анти-SNAP-25 антител, полученных из гибридом, описанных настоящей заявкой, следуют далее: 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 вариант 1 (SEQ ID NO: 79), 3C3E2 V_H вариант 2 (SEQ ID NO: 81), 3C3E2 V_H вариант 3 (SEQ ID NO: 132), 1D3B8VL (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), и 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 91). Последовательность аминокислот, составляющих цепи V_H и V_L моноклональных анти-SNAP-25 антител, полученных из гибридом, раскрытых в настоящем описании, следуют далее: 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 вариант 1 (SEQ ID NO: 80), 3C3E2 V_H вариант 2 (SEQ ID NO: 82); 3C3E2 V_H вариант 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), и 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 92).

Последовательность аминокислот, составляющих CDR области цепей V_H и V_L моноклональных анти-3MAP-25 антител, полученных из гибридомами 1D3B8, 2C9 B10, 2E2A6, 3C1A5, и 3C3E2, приведены в Таблице 23.

Таблица 23.

Последовательности CDR доменов V_H и V_L моноклональных анти-SNAP-25 антител			
CDR	Последовательность	Детектирована в	SEQ ID NO:
V_H CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5	93
V_H CDR 1	TFTNYVIH	3C3E2	94
V_H CDR1	IFTDHALH	1D3B8	95
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V_H CDR 2	YLFPNGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5	97
V_H CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C3E2	98
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V_H CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5	100
V_H CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
V_H CDR 3	ARMDY	3C3E2var1	102

	V _H CDR 3	ARMGY	3C3E2var2	134
	V _H CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C3E2var3	135
	V _L CDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
	V _L CDR1	RTTENIYSYFV	2C9 B10	104
5	V _L CDR 1	KSSQSLLYTNGKTYLT	2E2A6	105
	V _L CDR 1	KSSQSLLNTNGKTYLT	3C1A5	106
	V _L CDR1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
	V _L CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
	V _L CDR 2	NAKSLAE	2C9 B10	109
10	V _L CDR 2	LVSELD	2E2A6	110
	V _L CDR 2	LVSKLDS	3C1A5	111
	V _L CDR 2	YASQSIG	3C3E2	112
	V _L CDR 3	FQGSHPPT	1D3B8	113
	V _L CDR 3	QHHTGTPYT	2C9 B10	114
15	V _L CDR 3	LQSAHFPPT	2E2A6	115
	V _L CDR 3	LQSSHFPPT	3C1A5	116
	V _L CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

[0256] Неограничивающие примеры последовательностей аминокислот, составляющих варианты участка CDR цепи V_H моноклональных анти-SNAP-25 антител, полученных из гибридом, описанных в настоящей заявке, включает варианты V_H CDR1 SEQ ID NO: 118 для 1D3B8; вариант V_H CDR1 SEQ ID NO: 119 для V_H 2C9B10, 2E2A6 и 3C1A5; вариант V_H CDR1 SEQ ID NO: 120 для V_H 3C1A5 и 3C3E2 вариант 3; вариант V_H CDR2 SEQ ID NO: 121 для 1D3B8 и 2E2A6; вариант V_H CDR2 SEQ ID NO: 122 для V_H 2C9B10 и 3C1A5; вариант V_H CDR2 SEQ ID NO: 123 для V_H 3C1A5 и 3C3E2 вариант 3; вариант V_H CDR3 MDY для 1D3B8 и 2C9B10; вариант V_H CDR3 MGY для V_H 2E2A6 и 3C1A5; вариант V_H CDR3 SEQ ID NO: 124 для V_H 3C1A5 и 3C3E2 вариант 3. Неограничивающие примеры последовательностей аминокислот, составляющих варианты области CDR V_L цепи моноклональных анти-SNAP-25 антител, полученных из гибридом, описанных в настоящем описании, включает варианты V_L CDR1 SEQ ID NO: 125 для 1D3B8; вариант V_L CDR1 SEQ ID NO: 126 для 2C9B10; вариант V_L CDR1 SEQ ID NO: 127 для 2E2A6; вариант V_L CDR1 SEQ ID NO: 128 для 3C1A5; вариант V_L CDR1 SEQ ID NO: 129 для 3C3E2; вариант V_L CDR2 KVS для 1D3B8; вариант V_L CDR2 NAK для 2C9B10; вариант V_L CDR2 LVS для 2E2A6; вариант V_L CDR2 YAT для 3C1A5; и вариант V_L CDR2 YAS для 3C3E2.

Пример VIII

Разработка поликлональных анти-SNAP-25 антител, которые избирательно связывают эпитоп SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A

[0257] Следующий пример иллюстрирует получение поликлональных анти-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связываться с эпитопом SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A.

[0258] Для получения поликлональных анти-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связываться со SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует

остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, в качестве антигена продукта расщепления SNAP-25 создали пептид из 10 аминокислотных остатков CGGGRIDEANQ (SEQ ID NO: 46). Этот пептид включал остаток Цистеина на N-конце для сопряжения с KLH, гибкий G-разделитель (GGG) связанный с аминокислотами 191-197 из SNAP-25 человека (SEQ ID NO: 5) и карбоксилированный глутамин на C-конце. Поиски Blast показали, что у этого пептида есть высокая гомология только со SNAP-25 и нет почти никакой возможности перекрестной реактивности с другими белками в нервных клетках. Последовательность также тщательно исследовали, используя компьютерные алгоритмы, для определения индекса гидрофобности, вероятности поверхности белка, гибких областей, и вероятной вторичной структуры, за чем следовала надлежащая ориентация и представление выбранной последовательности пептида. Пептид синтезировали и конъюгировали с гемоцианином улитки (KLH), для увеличения иммуногенности. Прежде, чем иммунизировать животных, не подвергавшихся воздействию кроликов анализировали методом Вестерн блоттинга с лизатами от клеточных линий-кандидатов, для идентификации животных, у которых отсутствовала иммунореактивность к белкам, присутствующим в этих лизатах. Двух подвергнутых предварительному скринингу кроликов иммунизировали этим пептидом, и после трех иммунизации произведенных в течение приблизительно восьми недель, из кроликов добывали кровь для анализа. Крови позволяли свернуться, инкубируя ее при 4°C в течение 60 минут. Свернувшуюся кровь центрифугировали при 10000 × g в 4°C в течение 10 минут для осаждения продуктов распада клеток. Образцы полученной сыворотки разделяли на аликвоты по 50 мкл и хранили при -20°C до дальнейшего использования.

[0259] Подобная стратегия, основанная на других антигенах SNAP-25, раскрытая в настоящем описании, используется для получения моноклональных анти-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связываться со SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A. Например, SNAP-25 SEQ ID NO: 47 может быть конъюгирован с KLH вместо антигена SNAP-25 SEQ ID NO: 46. В качестве другого примера можно привести аминокислоты 191-197 из SNAP-25 человека из антигена SNAP-25 SEQ ID NO: 38 которые могут быть заменены на SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44.

2. Скрининг на наличие поликлональных анти-SNAP-25 антител

[0260] Для определения наличия поликлональных анти-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связываться с антигеном SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P_i разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, выполняли сравнительный твердофазный ИФА и клеточный тест расщепления, с использованием извлеченной из кролика сыворотки, как описано в Примере III. Сыворотка от обоих кроликов содержала поликлональные анти-SNAP-25 антитела, способные избирательно связываться с антигеном SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoMT/A. Поликлональные антитела кролика α-SNAP-25 назвали NTP 22 и NTP 23.

3. Очистка поликлональных анти-SNAP-25 антител

[0261] Для выделения поликлональных анти-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связываться с антигеном SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, антитела NTP 22 и NTP 23 из сыворотки кролика выделяли, используя колонки для

аффинной хроматографии, содержащие SNAP-25 антиген SEQ ID NO: 46.

4. Оценка специфичности связывания поликлональных анти-SNAP-25 антител

[0262] Для оценки специфичность связывания поликлональных анти-SNAP-25 антител, которые могут избирательно связываться с антигеном SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, использовали очищенные поликлональные анти-SNAP-25 антитела NTP 22 и NTP 23 для детектирования продукта расщепления, клеточного теста активности, иммуноцитохимии и иммунопреципитации как описано в Примере III. Клеточный тест расщепления, иммуноцитохимический анализ и анализ иммунопреципитации, показали, что поликлональные анти-SNAP-25 антитела NTP 22 и NTP 23 не реагируют с нерасщепленным антигеном SNAP-25. Таким образом как NTP 22 так и NTP 23 имеют высокую специфичность связывания с продуктом расщепления SNAP-25₁₉₇, что приводит к преимущественному распознаванию этого продукта распада по сравнению с нерасщепленным субстратом SNAP-25₂₀₆. Аффинность к антигенам можно определить, используя ППР по методу ViScore как описано в Примере III.

Пример IX Подготовка компонентов и условий для "сэндвич"-метода твердофазного ИФА

[0263] Следующий пример иллюстрирует идентификацию и подготовку компонентов и условий, необходимых для проведения тестов с помощью "сэндвич"-метода твердофазного ИФА, подходящего для использования в иммунологических способах детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью путем детектирования продукта расщепления SNAP-25 с использованием моноклональных анти-SNAP-25 антител, специфичных для SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A.

1. Приготовление клеточных лизатов из клеток, обработанных эндопептидазой с измененной нацеленностью

[0264] Для получения лизатов из клеток, обработанных эндопептидазой с измененной нацеленностью, для анализа, клеточную культуру подходящей плотности клеток из запасной культуры Neuro-2a заседали во флакон T175, содержащий 50 мл среды без сыворотки, содержащей Минимальную Необходимую Среду, 2 mM GlutaMAX™ I с солями Эрла, добавку 1xB27, добавку 1xN2, 0,1 mM заменимых аминокислот, 10 mM NEPES. Эти клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе с содержанием углекислого газа 5% до наступления дифференцировки клеток, которую оценивали в соответствии со стандартными и обычными морфологическими критериями, такими как блокировка роста и вытягивание нейрита (приблизительно 2-3 дня). В качестве контроля, клеточную культуру подходящей плотности клеток из запасной культуры Neuro-2a заседали во флакон T175, содержащий 50 мл соответствующей питательной среды (Таблица 1). Эти недифференцированные контрольные клетки выращивали при 37°C в инкубаторе с содержанием углекислого газа 5% до достижения 50%-й конfluenceности (приблизительно 18 часов). Среду из дифференцированной и контрольной недифференцированной культур удаляли аспирацией из каждой лунки и заменяли свежей средой, содержащей 0 (необработанный образец) или 10 нМ эндопептидазы с измененной нацеленностью. После инкубации в течение ночи клетки промывали и собирали путем лизиса в свежеприготовленном буфере для лизирования с Triton X-100 (50 mM NEPES, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100) при 4°C в течение 30 минут с постоянным перемешиванием. Лизированные клетки центрифугировали при 4000 об./мин. в течение 20 минут при 4°C для удаления остатков клеток, используя настольную

центрифугу. Концентрации белка в лизатах клеток измеряли методом Брэдфорда.

2. Приготовление и идентификация компонентов "сэндвич-метода твердофазного ИФА [0265] Для идентификации подходящей пары антитело для захвата-детектирующее антитело, с помощью «сэндвич»-метода твердофазного ИФА с усиленной хемилюминесценцией проводили анализ двадцати шести различных комбинаций пар антител для захвата и детектирующих антител, включающих одиннадцать различных антител для захвата а-SNAP-25 и семь различных детектирующих анти-3МАР-25 антител (Таблица 12). Используемые анти-3МАР-25 антитела представляли собой описанные в настоящей заявке мышинные моноклональные анти-SNAP-25 антитела 2E2A6 и 3C1A5, описанные в настоящей заявке мышинные моноклональные анти-SNAP-25 антитела SMI-81, MC-6050 и MC-6053, описанные в настоящей заявке кроличьи поликлональные анти-SNAP-25 антитела NTP 23, кроличьи поликлональные анти-SNAP-25 антитела S9684 (Sigma, Сент-Луис, Миссури), кроличьи поликлональные анти-SNAP-25 антитела H-50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Санта-Круз, Калифорния), козы поликлональные анти-SNAP-25 антитела C-18 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Санта-Круз, Калифорния), козы поликлональные анти-SNAP-25 антитела N-19 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Санта-Круз, Калифорния) и мышинные поликлональные анти-SNAP-25 антитела SP12 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Санта-Круз, Калифорния).

[0266] Для приготовления раствора антител для захвата, моноклональные аНТН-SNAP-25 антитела, содержащиеся в асцитной жидкости гибридомных клеточных линий 2E2A6 и 3C1A5, как и моноклональные анти-SNAP-25 антитела MC-6050 и MC-6053, выделяли с помощью стандартного протокола очистки с использованием белка А. Все прочие анти-SNAP-25 антитела были приобретены в очищенном виде.

[0267] Для приготовления раствора детектирующих антител, соответствующие анти-SNAP-25 антитела конъюгировали с реактивом для мечения на основе сложного эфира рутений (II)-трис-бипиридин-(4-метисульфоната) и N-ГС (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд) согласно инструкциям изготовителя (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд). Реакцию конъюгации проводили путем добавления 30 мкл раствора для разведения MSD SULFO-TAG™, разведенного в дистиллированной воде, к 200 мкл поликлональных анти-SNAP-25 антител в концентрации 2 мг/мл и инкубации реакционной смеси при комнатной температуре в течение 2 часов в темноте. Помеченные антитела очищали, используя стандартный протокол с использованием спин-колонок, и концентрацию белка определяли с помощью стандартного колориметрического теста на белок. Поглощающую способность конъюгатов анти-SNAP-25 антител/MSD SULFO-TAG™ измеряли с помощью спектрофотометра при 455 нм для определения концентрации в молях на литр. Раствор детектирующих антител хранили при 4°C до использования.

[0268] Для приготовления твердофазной подложки, содержащей антитела для захвата, которые специфичны к продукту расщепления SNAP-25, приблизительно 5 мкл соответствующего раствора моноклональных анти-SNAP-25 антител (20 мкг/мл в 1 × ФБР) добавляли к каждой лунке 96-луночного планшета MSD High Bind, и раствор сушили на воздухе в биологически чистом помещении в течение 2-3 часов до испарения жидкости из раствора. Затем лунки с иммобилизованными антителами для захвата блокировали путем добавления в них 150 мкл блокирующего буфера, содержащего 2% Amersham Blocking Reagent (GE Life Sciences, Пискатауэй, Нью-Джерси) и 10% козьей сыворотки (VWR, Уэст-Честер, Пенсильвания) на 2 часа при комнатной температуре. Заблокированные планшеты запечатывали и хранили при 4°C до использования.

[0269] Для детектирования присутствия расщепленного продукта расщепления SNAP-

25 ECL "сэндвич"-методом твердофазного ИФА, из лунок сохраненных планшетов удаляли аспирацией блокирующий буфер и к каждой лунке добавляли 25 мкл лизата клеток, обработанных эндопептидазой с измененной нацеленностью как описано выше, и планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи. Лунки планшета трехкратно промывали, удаляя аспирацией клеточный лизат и три раза ополаскивая каждую лунку 200 мкл 1 × ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После отмывки, в каждую лунку добавляли 25 мкл раствора детектирующих антител в концентрации 5 мкг/мл, содержащего 2% блокирующего реактива Amersham в 1 × ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат), планшет запечатывали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа со встряхиванием. После инкубации с детектирующими антителами, лунки трехкратно промывали 200 мкл 1 × ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После промывки в каждую лунку добавляли 150 мкл 1 × буфера для считывания (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд) и анализировали планшеты, используя устройство для считывания изображений SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд). Вычисляли отношение сигнала, полученного при дозе 10 нМ для каждой пары антител, к сигналу, полученному при дозе 0 нМ для каждой пары антител (Таблица 24). Эти результаты показали, что среди двадцати шести различных комбинаций исследованных пар антител только у трех пар антител отношение сигнала к шуму было выше 10:1 для наиболее высокой протестированной дозы: Пара №1 (мышинное mAb 2E2A6 и кроличье pAb S9684), Пара №4 (мышинное mAb 3C1A5 и кроличье pAb S9684) и Пара №18 (кроличье pAb S9684 и мышинное mAb 2E2A6). Пара антител 1 была выбрана для дальнейшей разработки теста.

Таблица 24.

Скрининг комбинаций анти-SNAP-25 антител

№ пары антител	Антитело для захвата	Детектирующее антитело	Детектирование продукта расщепления SNAP-25	Детектирование нерасщепленного субстрата SNAP-25	Отношение сигнал/шум (10 нМ/0 нМ)
1	Мышиное mAb 2E2A6	Кроличье pAb S9684	Да	Нет	26,6:1
2	Мышиное mAb 2E2A6	Козье pAb N-19	Да	Нет	7,3:1
3	Мышиное mAb 2E2A6	Кроличье pAb H-50	Да	Нет	0,9:1
4	Мышиное mAb 3C1A5	Кроличье pAb S9684	Да	Нет	12,1:1
5	Мышиное mAb 3C1A5	Козье pAb N-19	Да	Нет	1,9:1
6	Мышиное mAb 3C1A5	Кроличье pAb H-50	Да	Нет	0,9:1
7	КозьерАБС-18	Кроличье pAb S9684	Нет	Нет	0,8:1
8	Козье pAb C-18	Козье pAb N-19	Нет	Нет	0,9:1
9	Козье pAb C-18	Кроличье pAb H-50	Нет	Нет	0,9:1
10	Кроличье pAb H-50	Мышиное mAb 2E2A6	Да	Нет	0,9:1
11	Кроличье pAb H-50	КозьерАБС-18	Нет	Нет	1,0:1
12	Козье pAb N-19	Мышиное mAb 2E2A6	Да	Нет	0,9:1
13	Козье pAb N-19	Козье pAb C-18	Нет	Нет	1,1:1
14	Кроличье pAb NTP23	Козье pAb N-19	Да	Нет	1,2:1
15	Кроличье pAb NTP23	Козье pAb C-18	Нет	Нет	1,1:1
16	Кроличье pAb NTP23	Мышиное pAb SP12	Да	Нет	1,3:1
17	Кроличье pAb NTP23	Кроличье pAb H-50	Да	Нет	1,1:1

18	Кроличье pAb S9684	Мышиное mAb 2E2A6	Да	Нет	21,3:1
19	Кроличье pAb S9684	КозьерАБС-18	Нет	Нет	0,7:1
20	Кроличье pAb S9684	Мышиное mAb SMI-81	Да	Да	1,2:1
21	Мышиное mAb SMI-81	Кроличье pAb S9684	Да	Да	1,1:1
22	Мышиное mAb SMI-81	Козье pAb N-19	Да	Да	1,0:1
23	Мышиное mAb SMI-81	КозьерАБС-18	Нет	Нет	0,8:1
24	Мышиное pAb SP12	Козье pAb C-18	Нет	Нет	1,0:1
25	Мышиное mAb MC-6050	Кроличье pAb S9684	Да	Да	5,0:1
26	Мышиное mAb MC-6053	Кроличье pAb S9684	Да	Да	7,1:1

Пример X

Иммунологический способ детектирования эндопептидаз с измененной нацеленностью, обладающих ферментативной активностью легкой цепи ВоNT/A, с помощью «сэндвич»-метод а твердофазного ИФА с усиленной хемилюминесценцией

[0270] Следующий пример иллюстрирует иммунологические способы детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью путем детектирования продукта расщепления SNAP-25 с использованием моноклональных анти-SNAP-25 антител, специфичных к продукту расщепления SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку Рi разрезаемой связи в сайте расщепления токсином ВоNT/A, с помощью «сэндвич»-метода твердофазного ИФА с усиленной хемилюминесценцией.

[0271] Для получения лизатов из клеток, обработанных эндопептидазой с измененной нацеленностью, обладающей ферментативной активностью легкой цепи ВоNT/A, клеточную культуру подходящей плотности клеток из стабильной клеточной линии засеивали в лунки 96-луночных планшетов для культур тканей, содержащих 100 мл соответствующей среды. Эти клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе с содержанием углекислого газа 5% в течение 24 часов. Среду от клеток удаляли аспирацией из каждой лунки и заменяли свежей средой, содержащей 0 (необработанный образец) или одну из доз, определенных в эксперименте по ответу на дозы этой эндопептидазы с измененной нацеленностью. После инкубации в течение 24 часов клетки промывали и собирали.

[0272] Для приготовления раствора антител для захвата а-SNAP-25, моноклональные анти-SNAP-25 антитела, содержащиеся в асцитной жидкости гибридомной клеточной линии 2E2A6, выделяли с помощью стандартного протокола очистки с использованием белка А. Для приготовления раствора детектирующих анти-SNAP-25 антител, кроличьи поликлональные анти-SNAP-25 антитела S9684 (Sigma, Сент-Луис, Миссури) конъюгировали с реактивом для мечения на основе сложного эфира рутений (11)-трис-бипиридин-(4-метисульфоната) и N-ГС (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд) согласно инструкциям изготовителя (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд). Реакцию конъюгации, очистку меченных анти-SNAP-25 антител, определение концентрации и хранение проводили как описано в Примере VI.

[0273] Для приготовления твердофазной подложки, содержащей антитела для захвата, которые специфичны к продукту расщепления SNAP-25, приблизительно 5 мкл раствора моноклональных анти-SNAP-25 антител 2E2A6 (20 мкг/мл в 1 × ФБР) добавляли к каждой лунке 96-луночного планшета MSD High Bind, и раствор сушили на воздухе в биологически чистом помещении в течение 2-3 часов до испарения жидкости из раствора. Затем лунки с иммобилизованными антителами для захвата блокировали и использовали непосредственно для детектирования активности эндопептидазы с измененной нацеленностью.

[0274] Для детектирования присутствия расщепленного продукта SNAP-25 ECL "сэндвич"-методом твердофазного ИФА, из лунок сохраненных планшетов удаляли

аспирацией блокирующий буфер и к каждой лунке добавляли 25 мкл лизата клеток, обработанных эндопептидазой с измененной нацеленностью, и планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи. Лунки планшета трехкратно промывали, удаляя аспирацией клеточный лизат и три раза ополаскивая каждую лунку 200 мкл 1 x ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После отмывки, в каждую лунку добавляли 25 мкл раствора детектирующих антител в концентрации 5 мкг/мл, содержащего 2% блокирующего реактива Amersham в 1 x ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат), планшет запечатывали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа со встряхиванием. После инкубации с детектирующими антителами, лунки трехкратно промывали 200 мкл 1 x ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После промывки в каждую лунку добавляли 150 мкл 1 x буфера для считывания (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд) и анализировали планшеты, используя устройство для считывания изображений SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд). Собранные данные анализировали и вычисляли EC₅₀ как описано в Примере VI. Для эндопептидаз с измененной опиоидной нацеленностью эти результаты показали, что в среднем при EC₅₀ детектировали 1,0 нМ Noc/A (в диапазоне примерно от 0,3 нМ до 2,0 нМ) при отношении сигнала к шуму для нижней асимптоты примерно от 15:1 до 20:1 и отношении сигнала к шуму для верхней асимптоты примерно от 180:1 до 300:1.

20 Пример XI

Иммунологический способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью с помощью CL "сэндвич"-метода твердофазного ИФА

[0275] Следующий пример иллюстрирует иммунологические способы детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью путем детектирования продукта расщепления SNAP-25 с использованием моноклональных анти-SNAP-25 антител, специфичных к SNAP-25, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, с помощью CL "сэндвич"-метода твердофазного ИФА.

[0276] Лизат из клеток, обработанных эндопептидазой с измененной нацеленностью, и раствор антител для захвата α-SNAP-25 получали как описано в Примере VII.

[0277] Для приготовления раствора детектирующих анти-SNAP-25 антител, поликлональные анти-SNAP-25 антитела S9684 (Sigma, Сент-Луис, Миссури) конъюгировали с пероксидазой хрена (HRP) согласно инструкциям изготовителя (Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс). Реакцию конъюгации проводили путем добавления 500 мкл поликлональных 3НТН-SNAP-25 антител в концентрации 1 мг/мл в пробирку, содержащую лиофилизированную активированную пероксидазу, смешивания компонентов и последующего добавления 10 мкл цианоборогидрида натрия. Эту реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа под вытяжкой. После остановки реакции меченные антитела выделяли, используя стандартный протокол с использованием спин-колонок, и концентрацию белка определяли с помощью стандартного колориметрического теста на белок. Поглощающую способность конъюгатов поликлональных анти-SNAP-25 антител/HRP измеряли с помощью спектрофотометра при 455 нм для определения концентрации в молях на литр. Раствор детектирующих анти-SNAP-25 антител хранили при 4°C до использования.

[0278] Для приготовления твердофазной подложки, содержащей антитела для захвата α-SNAP-25, которые специфичны к продукту расщепления SNAP-25, приблизительно 100 мкл раствора моноклональных анти-SNAP-25 антител 2E2A6 (1 мг/мл в 1 x ФБР)

добавляли к каждой лунке 96-луночного белого планшета Greiner, планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи и избыток раствора антител удаляли. Затем лунки с иммобилизованными антителами для захвата блокировали путем добавления в них 150 мкл блокирующего буфера, содержащего 2% Amersham Blocking Reagent (GE Life Sciences, Пискатауэй, Нью-Джерси) и 10% козьей сыворотки (VWR, Уэст-Честер, Пенсильвания) на 1 час при комнатной температуре. Блокирующий буфер удаляли и планшеты насухо промакивали с помощью бумажных полотенец путем переворачивания и постукивания. Затем лунки с иммобилизованными антителами для захвата блокировали и использовали непосредственно для детектирования активности эндопептидазы с измененной нацеленностью.

[0279] Для детектирования присутствия расщепленного продукта SNAP-25 с помощью CL "сэндвич"-метода твердофазного ИФА, к каждой лунке добавляли 50 мкл лизата клеток, обработанных эндопептидазой с измененной нацеленностью, планшеты запечатывали и инкубировали на встряхивателе со скоростью 500 об./мин. при 4°C от 2-4 до целой ночи. Лунки планшета трехкратно промывали, удаляя аспирацией клеточный лизат и три раза ополаскивая каждую лунку 200 мкл 1 × ФБР, 0,05% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После промывки, в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора детектирующих поликлональных анти-SNAP-25 антител/HRP в концентрации 1 мг/мл, содержащего 2% блокирующего реактива Amersham в 1 × ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат), планшет запечатывали и инкубировали на встряхивателе со скоростью 650 об./мин. при комнатной температуре в течение 1 часа. После инкубации с детектирующими антителами, лунки трехкратно промывали 200 мкл 1 × ФБР, 0,05% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После промывки в каждую лунку добавляли 100 мкл смеси SuperSignal ELISA Pico 1:1 (Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс) и анализировали планшеты, используя люминометр (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния) на 395 нм. Собранные данные анализировали и вычисляли EC₅₀ как описано в Примере VI.

Пример XII

Иммунологический способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью с помощью многоканального «сэндвич"-метода твердофазного ИФА с усиленной хемилюминесценцией

[0280] Следующий пример иллюстрирует многоканальные иммунологические способы детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью путем детектирования продукта расщепления SNAP-25 с использованием моноклональных анти-SNAP-25 антител, специфичных к продукту расщепления SNAP-25, и второй пары антител к другому белку.

[0281] Тест на активность эндопептидазы с измененной нацеленностью можно провести с помощью многоканального «сэндвич"-метода твердофазного ИФА с усиленной хемилюминесценцией. Такой тест описан в родственной заявке на патент на имя Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, заявка на патент США №12/403531, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки, и его можно использовать с клеточными линиями, эндопептидазами с измененной нацеленностью и соответствующими клеточными линиями, описанными в настоящей заявке.

Пример XIII Иммунологический способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью с помощью многоканального ЕС "сэндвич"-метода твердофазного ИФА

[0282] Следующий пример иллюстрирует многоканальные иммунологические способы детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью путем детектирования продукта расщепления SNAP-25 с использованием моноклональных анти-SNAP-25 антител, специфичных к продукту расщепления SNAP-25, и второй пары антител к другому белку.

[0283] Тест на активность эндопептидазы с измененной нацеленностью можно провести с помощью многоканального «сэндвич»-метода твердофазного ИФА с усиленной хемилюминесценцией. Такой тест описан в родственной заявке на патент на имя Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity /Assays, заявка на патент США №12/403531, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки, и его можно использовать с клеточными линиями, эндопептидазами с измененной нацеленностью и соответствующими клеточными линиями, описанными в настоящей заявке.

Пример XIV

Иммунологический способ детектирования наномолярных количеств эндопептидаз с измененной нацеленностью

[0284] Следующий пример иллюстрирует осуществление иммунологических способов детектирования наномолярных количеств активности эндопептидаз с измененной нацеленностью.

1. Иммунологический способ детектирования эндопептидаз с измененной нацеленностью с помощью «сэндвич»-метода твердофазного ИФА с усиленной хемилюминесценцией

[0285] Для получения лизатов из клеток, обработанных эндопептидазой с измененной нацеленностью, приблизительно от 50000 до 150000 клеток из стабильной клеточной линии, подходящей для теста, заседали в лунки 96-луночных покрытых поли-D-лизинном планшетов для культур тканей, содержащих 100 мкл соответствующей среды (см. Примеры I и II). Эти клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе с содержанием углекислого газа 5% в течение 24 часов. Среду от клеток удаляли аспирацией из каждой лунки и заменяли свежей средой, содержащей 0 (необработанный образец) или подходящую дозу в соответствии с ответом, как описано в настоящей заявке для каждой эндопептидазы с измененной нацеленностью. После инкубации в течение 24 часов клетки промывали и собирали, или инкубировали в течение дополнительных двух дней в отсутствие эндопептидазы с измененной нацеленностью перед сбором. Для сбора клеток, среду удаляли аспирацией, промывали 1 × ФБР и лизировали клетки путем добавления в каждую лунку 30 мкл лизирующего буфера, содержащего 50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 1% Triton X-100, и инкубировали планшет на встряхивателе с вращением при 500 об./мин. в течение 30 минут при 4°C. Для осаждения остатков клеток планшет центрифугировали при 4000 об./мин. в течение 20 минут при 4°C, после чего супернатант переносили в 96-луночный планшет, покрытый антителами для захвата, для проведения этапа детекции.

[0286] Раствор антител для захвата α -SNAP-25, раствор детектирующих анти-SNAP-25 антител и твердофазную подложку, содержащую антитела для захвата, которые специфичны к расщепленному продукту SNAP-25, получали как описано в Примере VII.

[0287] Для детектирования присутствия расщепленного продукта SNAP-25 с помощью «сэндвич»-метода твердофазного ИФА с усиленной хемилюминесценцией, из сохраненных планшетов удаляли аспирацией блокирующий буфер, к каждой лунке добавляли 25-30 мкл лизата клеток, обработанных эндопептидазой с измененной

нацеленностью, и планшеты инкубировали при 4°C в течение 2 или 24 часов. Лунки планшета трехкратно промывали, удаляя аспирацией клеточный лизат и три раза ополаскивая каждую лунку 200 мкл 1 × ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После промывки, в каждую лунку добавляли 25 мкл раствора детектирующих aHTn-SNAP-25 антител в концентрации 5 мкг/мл, содержащего 2% блокирующего реактива Amersham в 1 × ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат), планшет запечатывали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа со встряхиванием. После инкубации с детектирующими анти-SNAP-25 антителами, лунки трехкратно промывали 200 мкл 1 × ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После промывки планшеты обрабатывали, собранные данные анализировали и вычисляли EC₅₀ как описано в Примере VI. Эти результаты показали, что в среднем при EC₅₀ детектировали 1,0 нМ Noc/A у клеток из клональной клеточной линии №3 SK-N-DZ (в диапазоне примерно от 0,3 нМ до 2,0 нМ) при отношении сигнала к шуму для верхней асимптоты примерно от 20:1 до 300:1. Кроме того, в среднем при EC₅₀ детектировали 3,7 нМ Noc/A у клеток из клональной клеточной линии №6 AGN P33 (в диапазоне примерно от 2,0 нМ до 5,5 нМ) при отношении сигнала к шуму для верхней асимптоты примерно от 20:1 до 500:1. Для клеток SK12, специфичных для эндопептидазы с измененной нацеленностью, которая содержит лиганд диноρφин А, в среднем при EC₅₀ детектировали 8,4 нМ Dуп/A у клеток SK12 (в диапазоне примерно от 4,5 нМ до 10,0 нМ) при отношении сигнала к шуму для верхней асимптоты примерно от 10:1 до 20:1. Кроме того, в среднем при EC₅₀ детектировали 8,8 нМ галанин-TVEMP у клеток из клональной клеточной линии №7 Neuro-2a (в диапазоне примерно от 5,0 нМ до 15,5 нМ) при отношении сигнала к шуму для верхней асимптоты примерно от 20:1 до 200:1. Этот способ можно также применять в многоканальном режиме как описано в Примере IX.

2. Иммунологический способ детектирования эндопептидаз с измененной нацеленностью с помощью CL "сэндвич"-метода твердофазного ИФА [0288] Лизат из клеток, обработанных эндопептидазой с измененной нацеленностью, и раствор антител для захвата α-SNAP-25 получали как описано в Примере VII. Раствор детектирующих анти-SNAP-25 антител и твердофазную подложку, содержащую антитела для захвата, которые специфичны к расщепленному продукту SNAP-25, получали как описано в Примере VIII.

[0289] Для детектирования присутствия расщепленного продукта SNAP-25 с помощью CL "сэндвич"-метода твердофазного ИФА, к каждой лунке добавляли 100 мкл лизата клеток, обработанных эндопептидазой с измененной нацеленностью, планшеты запечатывали и инкубировали на встряхивателе с вращением 500 об./мин. при 4°C в течение 2 часов или 24 часов. Лунки планшета трехкратно промывали, удаляя аспирацией клеточный лизат и три раза ополаскивая каждую лунку 200 мкл 1 × ФБР, 0,05% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После промывки, в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора детектирующих поликлональных am-n-SNAP-25 антител/HRP в концентрации 1 мг/мл, содержащего 2% блокирующего реактива Amersham в 1 × ФБР, 0,1% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат), планшет запечатывали и инкубировали на встряхивателе с вращением 650 об./мин. при комнатной температуре в течение 1 часа. После инкубации с детектирующими антителами, лунки трехкратно промывали 200 мкл 1 × ФБР, 0,05% TWEEN-20® (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолауреат). После промывки в каждую лунку добавляли 100 мкл смеси SuperSignal ELISA Pico 1:1 (Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс) и анализировали

планшеты, используя люминометр (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния) на 395 нм. Собранные данные анализировали и вычисляли EC₅₀ как описано в Примере VI. Этот способ можно также применять в многоканальном режиме как описано в Примере IX.

5 Пример XV

Иммунологический способ детектирования нейтрализующих антител против эндопептидазы с измененной нацеленностью

[0290] Следующий пример иллюстрирует осуществление иммунологического способа, способного детектировать присутствие нейтрализующих анти-Noc/A антител.

10 [0291] В настоящее время Noc/A проходит оценку на предмет пригодности для лечения болезненных состояний, некоторые из которых являются хроническими. При повторном долгосрочном лечении с помощью Noc/A у пациента могут появиться нейтрализующие анти-Noc/A антитела к эндопептидазе с измененной нацеленностью, что приведет к иммунной резистентности. Нейтрализующие антитела Noc/A ингибируют активность
15 эндопептидазы с измененной нацеленностью, блокируя поглощение эндопептидазы с измененной нацеленностью нейронными и прочими клетками-мишенями путем связывания с нацеливающим лигандным доменом и/или транслокационным доменом (H_N) эндопептидазы с измененной нацеленностью. На сегодняшний день отсутствует
20 утвержденный тест для определения присутствия нейтрализующих анти-Noc/A антител в крови пациента. Разработка клеточного теста для детектирования нейтрализующих антител у пациентов, проходящих лечение с помощью эндопептидаз с измененной нацеленностью, позволит повысить экономическую эффективность и экономию времени.

[0292] Для детектирования присутствия или отсутствия нейтрализующих анти-Noc/A антител можно использовать иммунологические способы определения активности
25 эндопептидаз с измененной нацеленностью, описанные в настоящей заявке. Одним из таких способов является определение количества продукта расщепления SNAP-25, присутствующего после обработки различными концентрациями Noc/A, посредством детектирования с помощью Вестерн блоттинга, другим способом является
30 детектирование с помощью «сэндвич"-метода твердофазного ИФА с усиленной хемилюминесценцией.

[0293] Для приготовления образца, содержащего нейтрализующие анти-Noc/A антитела, выделяли сыворотку из крови обезьяны, иммунизированной α-Noc/A, и получали из нее антитела с помощью аффинной очистки. Также проводили иммунизацию кроликов пептидом варианта ноцицептина, нацеливающего лиганда, который
35 присутствует в молекуле Noc/A, собирали их сыворотку и выделяли антитела с помощью аффинной очистки (с использованием поликлональных антител против ноцицептина).

[0294] Для получения лизата из клеток, обработанных образцом, содержащим Noc/A, клетки из клональной клеточной линии №3 SK-N-DZ и клетки из клональной
40 клеточной линии №6 AGN P33 заседали в 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином, на 16-18 часов. Поликлональные антитела против ноцицептина в концентрации 0-3 мкг/мл разбавляли СБС RPMI (с добавками N2, B27 и NGF), содержащей 1 нМ Noc/A, и проводили предварительную инкубацию смеси при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем растворы добавляли к клеткам и инкубировали в течение 24 ч
45 перед проведением тестов по ECL-методу твердофазного ИФА. Данные антитела против варианта ноцицептина полностью блокировали поглощение 1 нМ Noc/A при концентрации 1 мкг/мл (>90% ингибирования) в обеих клеточных линиях. Обезьяны поликлональные антитела против Noc/A также протестировали с этими клеточными линиями. Клетки заседали в 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином, по

100000 клеток на лунку в питательную среду RPMI, содержащую N2, B27 и NGF, на 24 часа. Поликлональные антитела против Noc/A в концентрации 0-20 мкг/мл разбавляли средой, содержащей 1 нМ Noc/A, и проводили предварительную инкубацию смеси при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем смесь добавляли к клеткам и инкубировали в течение 24 ч перед проведением тестов по ECL-методу твердофазного ИФА. У клеточной линии SK-N-DZ наблюдали ингибирование до 60% при наивысших концентрациях поликлональных антител против Noc/A 6-20 мкг/мл и около 30% у клональной клеточной линии №6 AGN P33. Это можно объяснить тем, что поликлональные антитела против Noc/A не специфичны по отношению к участку связывания и включают другие антитела, которые связываются с другими участками молекулы, достигая лишь частичного блокирования при исследованных концентрациях. Для достижения полного блокирования могут потребоваться более высокие концентрации.

[0295] Для детектирования присутствия расщепленного продукта SNAP-25 с помощью Вестерн блоттинга, из каждой лунки удаляли аспирацией питательную среду, клетки суспендировали в 50 мкл буфера для загрузки ДСН-ПААГ и нагревали образцы при 95°C в течение 5 минут. Аликвоты от каждого собранного образца анализировали Вестерн блоттингом как описано в Примере I, за исключением того, что собранные образцы разделяли на ДСН-ПААГ, используя 12% гели Criterion на 26 лунок (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния), и в качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные анти-SNAP-25 антитела₁₉₇ (см. Пример V). Результаты позволили идентифицировать наименьшую концентрацию эндопептидазы с измененной нацеленностью, которая приводит к появлению детектируемой полосы на Вестерн блоте, соответствующей продукту расщепления SNAP-25.

[0296] Для детектирования присутствия расщепленного продукта SNAP-25 с помощью «сэндвич»-метода твердофазного ИФА с усиленной хемилюминесценцией, из каждой лунки удаляли среду и лизировали клетки как описано в Примере VI. Раствор антител для захвата α -SNAP-25, раствор детектирующих анти-SNAP-25 антител и твердофазную подложку α -SNAP-25 получали как описано в Примере VIII. Супернатанты наносили на твердофазную подложку α -SNAP-25 и тест по ECL "сэндвич"-методу твердофазного ИФА проводили в соответствии с подробным описанием из Примера VI. Собранные данные анализировали и вычисляли EC_{50} как описано в Примере VI, за исключением того, что EC_{50} представляла собой разведение сыворотки, необходимое для ингибирования активности эндопептидазы с измененной нацеленностью до $1/2$ ее максимального значения, а отношение максимального сигнала ($Signal_{Max}$) к минимальному сигналу ($Signal_{Min}$) получали путем деления интенсивности сигнала от продукта расщепления SNAP-25, полученного при наибольшем разведении антител, на интенсивность сигнала, полученного при наименьшем разведении антител.

[0297] Результаты продемонстрировали возможность детектирования присутствия нейтрализующих анти-Noc/A антител в сыворотке обезьяны и антител против варианта ноцицептина у кролика. Активность молекул Noc/A, проинкубированных с антителами, прошедшими аффинную очистку из иммунизированного животного, снижалась по мере снижения степени разведения антител. Тот же самый тест проводили с соединениями Дун/A и галанин-TVEMP с использованием клеточных линий, специфичных для каждого тестируемого соединения.

Пример XV

Разработка клеточного теста на эндопептидазу с измененной галаниновой

нацеленностью

[0298] Следующий пример иллюстрирует идентификацию стабильных клеточных линий, обладающих способностью поглощать эндопептидазы с измененной нацеленностью, необходимых для разработки клеточного теста на активность.

1. Выращивание запасных культур клеточных линий-кандидатов

[0299] Для выращивания клеточных линий, культуру подходящей плотности клеток из тестируемой клеточной линии заседали во флаконы для культур тканей на 162 см², содержащие 30 мл подходящей питательной среды (см. Таблицу 25), и инкубировали при 37°C в инкубаторе с содержанием углекислого газа 5% или 10% до достижения клетками желаемой плотности.

Таблица 25. Сводная таблица всех клеточных линий и соответствующих им сред		
Тип клеток; описание; источник	Полная среда (ПС) Все от Invitrogen (если не указано иное)	Среда без сыворотки (СБС) Все от Invitrogen (если не указано иное)
SiMa (Клеточная линия нейробластомы человека, DSMZ#ACC 164, Брауншвейг, Германия) SiMa H1 (клонированная клеточная линия из клеток SiMa)	RPМI 1640 (90%) Эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС, 10%) ЗАК (0,1 мМ), НЕРЕС (10 мМ), Пируват натрия (1 мМ) Пенициллин (100 ед. на мл) Стрептомицин (100 мкг на мл),	RPМI 1640(90%)ЗАК (0,1 мМ), НЕРЕС (10 мМ), Пируват натрия (1 мМ) Пенициллин (100 ед. на мл) Стрептомицин (100 мкг на мл) Добавка N2 (1x) Добавка B27(1x)
Neuro-2a (Нейробластомы мыши: (ATCC#CC1131, Манассас, Вирджиния)	МНС Эрла (90%) Эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС, 10%) ЗАК (0,1 мМ), НЕРЕС (10 мМ), Пируват натрия (1 мМ), Пенициллин (100 ед. на мл), Стрептомицин (100 мкг на мл)	МНСЭ (90%)ЗАК (0,1 мМ), НЕРЕС (10 мМ), Пируват натрия (1 мМ), Пенициллин (100 ед. на мл), Стрептомицин (100 мкг на мл)
PC-12 Феохромоцитома крысы (ATCC#CRL-1721)	RPМI 1640 (90%) Диализированная ЭБС (5%) Сыворотка лошади (10%) НЕРЕС (10 мМ) Пируват натрия (1 мМ) D-глюкоза (0,5%, Sigma) Пенициллин (100 ед. на мл); Стрептомицин (100 мкг на мл) Добавка N2 (1x)	Среда для дифференцировки: RPМI 1640 (90%) НЕРЕС (10 мМ) Пируват натрия (1 мМ) D-глюкоза (0,5%, Sigma) Пенициллин (100 ед. на мл); Стрептомицин (100 мкг на мл) Добавка N2 (1x) Альбумин бычьей сыворотки (0,2% вес./об.) MCP(50нгна мл, Promega)
P19 Эмбриональная карцинома мыши	МНС Alpha (90%) Эмбриональная телячья сыворотка (7,5%)	МНС Alpha (90%) ЭБС (2,5%)
(ATCC#CRL-1825)	ЭБС (2,5%) Пенициллин (100 ед. на мл); Стрептомицин (100 мкг на мл)	Пенициллин (100 ед. на мл); Стрептомицин (100 мкг на мл)

ЗАК: заменимые аминокислоты, МНС: минимальная необходимая среда. МНСД: МНС Дульбекко. МНСЭ - МНС Эрла. Следует обратить внимание на то, что дифференцировку клеток PC-12 проводили в среде для дифференцировки, а не в СБС.

2. Скрининг коммерческих клеточных линий на чувствительность к соединениям галанин - TVEMP

[0300] Проводили скрининг коммерческих клеточных линий на чувствительность к соединениям галанин-TVEMP, измеряемую по расщеплению SNAP25 после обработки соответствующими соединениями. Для скрининга и тестирования использовали различные соединения галанин-TVEMP. Клетки PC-12, Neuro-2a, SiMa и P19 заседали в среду без сыворотки на три дня или в ПС на один день. Эти дифференцированные и не подвергавшиеся обработке клетки обрабатывали в течение 18 часов галанин-TVEMP из серии А в концентрациях 0 и 75 нМ. Галанин-TVEMP из серии А продемонстрировал активность как в клетках PC-12, так и в клетках Neuro-2a, о чем судили по увеличению присутствия расщепленного SNAP25, и клетки Neuro-2a в дифференцированном состоянии более чувствительны к соединениям TVEMP с лигандом галанина, чем не подвергавшиеся обработке клетки. По критерию активности клеток, PC-12 находится на первом месте, за которыми следуют Neuro-2a, и наконец, клетки SiMa. Было необходимо определить, являлось ли поглощение специфичным для этих соединений с измененной галаниновой нацеленностью, и поэтому было важно протестировать эти клетки с другими соединениями, которые не содержат галанинового лиганда. Noc/A представляет собой соединение с измененной нацеленностью, которое содержит в

качестве лиганда вариант ноцицептина, а также соединение LH_N/A (отрицательный контроль), у которого отсутствует домен связывания. Поглощение LH_N/A является неспецифичным и должно иметь значительно более низкую активность, чем поглощение соединения галанин-TVEMP, если клеточная линия обладает специфичным поглощением соединений с измененной нацеленностью. Как было показано ранее, соединение Noc/A специфически поглощается клетками SiMa, и это соединение использовалось в качестве базового уровня при тестировании клеточных линий. Подходящая клеточная линия должна обладать низким уровнем поглощения соединений LH_N/A и Noc/A и высоким уровнем поглощения соединения галанин-TVEMP. Таблица 26 демонстрирует результаты этого эксперимента.

Таблица 26.

Скрининг клеток PC-12, Neuro-2a и SiMa в различных условиях с помощью галанин-TVEMP					
		Галанин-TVEMP из серии А	Галанин-TVEMP из серии В	LH _N /A	Noc/A
Конц. (мг/мл)		0,168	0,175	1,63	1,00
Значения EC ₅₀ (нМ)	PC-12, не подвергавшиеся обработке	73,4±10,7	105,6±16,0	>200	72,9±26,9
	SiMa, не подвергавшиеся обработке	138,6±43,9	133,8±24,2	>300	48,3±18,1
	Neuro-2a, не подвергавшиеся обработке	122,4±15,7	116±17,5	>200	>150
	SiMa, Диф ночь	>400	>150	>400	16,1±11,9
	Neuro-2a Диф 4 Д		34,5±7,5	39,7±5,6	105,9±44,3
	SiMa, Диф 4 д	101,8±20,5	65,3±7,8	>150	88,7±23,3

Тестирование галанин-TVEMP из серий А и В и контролей LH_N/A и Noc/A с различными клеточными линиями и условиями роста/дифференцировки. Сводная таблица демонстрирует подробную информацию о каждом протестированном соединении и значения EC₅₀.

[0301] Результаты демонстрируют, что в протестированных клеточных линиях кривые или значения EC₅₀ для галанин-TVEMP из серии А и галанин-TVEMP из серии В сходны с отрицательными контролями или более активны лишь в 1-2 раза. Эти данные подразумевают, что нативные клетки не обладают достаточной чувствительностью и их необходимо трансфицировать плазмидами, кодирующими белки-рецепторы галанина GalR1 или GalR2.

3. Стабильная трансфекция клеток PC-12, Neuro-2a и SiMa с помощью GaIR

[0302] За один день до трансфекции клетки высевали с плотностью $0,5 \times 10^6$ клеток/лунка в 6-луночные планшеты, покрытые коллагеном IV (Cat#354554: BD Biosciences) (SiMa, PC-12) или 6-луночные планшеты Costar (Cat# 3516: Corning) (Neuro-2a). Трансфекции проводили, разбавляя 12 мкл реагента Lipofectamine™ 2000 (Cat # 52758, Invitrogen) в 250 мкл среды с восстановленной сывороткой Opti-MEM® I (Cat# 3195, Invitrogen) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Четыре микрограмма плазмидной ДНК GaIR смешивали с 0,4 мкг вектора pAdVantage™ (1 мг на мл, Cat#E1711, Promega) в 250 мкл среды с восстановленной сывороткой Opti-MEM® I в течение 5 минут. После 5 минут инкубации разбавленный Lipofectamine™ 2000 и разбавленную плазмидную ДНК смешивали и инкубировали в течение еще 20 минут при комнатной температуре для образования комплекса. Тем временем клетки промывали OPTI-MEM®, и к каждой лунке добавляли 0,5 мл OPTI-MEM®. После 20-минутной инкубации, 0,5 мл, содержащих комплексы разбавленного Lipofectamine™ 2000 и разбавленной плазмидной ДНК, осторожно добавляли к лункам с клетками в 0,5 мл OPTI-MEM®. Планшет инкубировали при 37°C в течение 5 часов, а затем добавляли 1 мл полной среды. На следующий день среду заменяли питательной средой

на 48 часов. На 4 день, после того, как клетки восстанавливались после трансфекции, питательную среду заменяли свежей питательной средой, содержащей Geneticin® (Cat #10131: Invitrogen) в концентрации 0,5 мг на мл (разбавление 1:100), и инкубировали в течение еще 3 дней. На 7 день после трансфекции клетки переносили в покрытый коллагеном IV флакон на 75 см (Cat# 35423: BD Biosciences), содержащий питательную среду и генетицин (0,5 мг на мл, разбавление 1:100). После этого переноса приблизительно 90% клеток гибли и их удаляли при смене среды. Питательную среду, содержащую генетицин (0,5 мг на мл, разбавление 1:100), заменяли каждые два дня до дня 21.

[0303] Для отбора стабильных клеток, способных поглощать соединения галанин-TVEMP, использовали параметры для скрининга на клоны, которые производили наибольший процент расщепления SNAP25 при обработке галанин-TVEMP в ECL "сэндвич"-методе твердофазного ИФА с использованием планшетов с иммобилизованными моноклональными антителами 2E2A6 для захвата и поликлональных сульфомеченных детектирующих антител SNAP25 (Sigma Cat # S9684). Значения EC₅₀ в Таблице 27 показывают, что галанин-TVEMP из серии D демонстрирует поглощение, по меньшей мере 10-кратно превышающее показатель в отрицательном контроле, для клеток SiMa и Neuro-2a, трансфицированных GalR1 и GalR2, и лишь 2-4-кратно превышающее показатель в отрицательном контроле для трансфицированных клеток PC-12. Поскольку трансфицированные клетки PC-12, по-видимому, характеризуются более низкой чувствительностью и нацеленностью по сравнению с клетками SiMa и Neuro-2a, их не клонировали. Кроме того, поскольку 1-16-мерный галаниновый лиганд в составе соединений галанин-TVEMP связывается с рецептором GALR1 с большей аффинностью, чем с GALR2, клонировали только клетки, трансфицированные GALR1. Фигура также показывает, что галанин-TVEMP из серий C и D демонстрируют поглощение, 9-10-кратно превышающее показатели как для 1-Nm/A, так и для соединения с измененной ноцицептиновой нацеленностью ноцицептин-TVEMP, в Neuro-2a GalR1.

Таблица 27.

Тест стабильно трансфицированных, но неклональных популяций SiMa, Neuro-2a и PC12, трансфицированных рецепторами GalR1 или GalR2

		Галанин-TVEMP C	Галанин-TVEMP D	LH _N /A	Ноцицептин - TVEMP
Конц. (мг/мл)		1,260	0,303	1,46	1,00
EC ₅₀ Значения (нМ)	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	
	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

[0304] Неклональные отобранные популяции не подходят для использования на регулярной основе, потому что они содержат смесь клеток, экспрессирующих разные уровни рецептора, и эти популяции могут изменяться со временем. Для получения стабильных клеточных линий, образовавшихся из единичных клеток, начали клонирование с помощью разведения. На 21 день трансфицированные клетки трипсинизировали, разделяли с помощью иглы и подсчитывали. Оставшиеся трансфицированные клеточные линии замораживали для использования в будущем. Клетки последовательно разводили до плотности 10 клеток на мл в питательной среде, содержащей генетицин (0,5 мг на мл, разбавление 1:100). Клетки засевали в 2×96-луночные планшеты, покрытые коллагеном IV (SiMa, PC-12), или в 2×96-луночные

планшеты Costar (Neuro-2a) по 100 мкл в лунку для достижения плотности 1 клетка на лунку. Планшеты возвращали в инкубатор и оставляли нетронутыми в течение двух недель для образования колоний. После двух недель (35 день), лунки тщательно проверяли на присутствие единичных колоний, образовавшихся на дне лунок (всю лунку тщательно проверяли на наличие множественных колоний). При обнаружении лунки с единственной группой клеток, всю эту лунку тщательно исследовали, чтобы удостовериться, что присутствовала одна и только одна группа клеток. Эту единственную группу фотографировали. Если присутствовали какие-либо сомнения о наличии дополнительных групп, такую лунку не отбирали. На 36 день отобранные клоны отделяли с помощью TrypLE и добавляли 0,5 мл полной среды, содержащей генетицин (0,5 мг на мл, разбавление 1:100), для остановки реакции трипсинизации. Весь объем переносили в 6-луночные планшеты, а затем разбавляли дополнительными 3,0 мл полной среды, содержащей генетицин (0,5 мг на мл, разбавление 1:100). Клоны культивировали до достижения 90%-й конфлюентности, затем снова трипсинизировали и переносили во флаконы на 75 см, покрытые коллагеном IV, или флаконы Costar с 10,0 мл полной среды, содержащей генетицин (0,5 мг на мл, разбавление 1:100). По достижении 90%-й конфлюентности клетки использовали для заполнения трех криопробирок для хранения в замороженном виде или для скрининга в тесте с твердофазным ИФА на соединения с измененной галаниновой нацеленностью.

[0305] Эталонное соединение галанин-TVEMP из серии С использовали для проверки этих клонов с помощью двух исполнителей, проводящих независимые тесты. Клоны SiMa GalR1 росли медленно и были в это время недоступны для тестирования. К счастью, клоны Neuro-2a росли быстрее, и в скором времени достаточные количества 8 из 12 клонов были доступны для тестирования. Эти клональные клетки Neuro-2a GalR1 тестировали с полным диапазоном доз соединений галанин-TVEMP (0-300 нМ), и результаты тестирования девяти из этих клонов приведены ниже. Оставшиеся четыре клона росли очень медленно и не были протестированы. Отобранные, но неклональные родительские клетки высевали наряду с клонами, чтобы использовать их в качестве точки отсчета. В Таблице 28 представлена активность каждого из восьми клонов вместе с отобранными неклональными клетками Neuro-2a GalR1 при тестировании с соединением галанин-TVEMP. Из восьми протестированных клонов только клоны №4, 7 и 12 показали хорошее поглощение соединения галанин-TVEMP с приемлемыми значениями EC₅₀. Клоны №1, 3 и 10 Neuro-2a GalR1 не поглощали соединение галанин-TVEMP, в то время как клоны №5, 11 и 13 вместе с неклональной популяцией демонстрировали очень высокие значения EC₅₀, и эти клетки исключили из дальнейшего тестирования.

Таблица 28.

Результаты скрининга клонов Neuro-2a GalR1, полученных из единичных клеток, с помощью галанин-TVEMP из серии С			
EC ₅₀ ± Станд. ошибка (нМ)			
Планшет	Тип клеток	Исполнитель 1	Исполнитель 2
1	N2A Неклональные	82,1±9,6	92,0±10,8
1	N2A GALR1 Клон №1	>300	>300
1	N2A GALR1 Клон №3	>300	>300
1	N2A GALR1 Клон №4	39,7±3,4	39,4±6,6
	N2A Неклональные	211,2±167,7	116,0±26,8
2	N2A GALR1 Клон №5	202,6±82,9	113,0±18,1
2	N2A GALR1 Клон №7	23,1±3,3	15,5±1,8
2	N2A GALR1 Клон №10	>300	>300
3	N2A GALR1 Клон №7	20,3±1,6	38,0±6,3

3	N2A GALR1 Клон №11	270,0±243	247,0±101
3	N2A GALR1 Клон №12	43,2±5,2	57,5±14,3
3	N2A GALR1 Клон №13	144,1±143	184,7±15,6

4. Исследование экспрессии GalR1 в клональных клеточных линиях

5 [0306] Скрининг клонов показал, что только клоны №4,7 и 12 были более чувствительны, чем неклональные клетки. Из этих 3 клонов, как и из нетрансфицированных родительских и стабильно трансфицированных неклональных клеток Neuro-2a, выделяли матричную РНК (мРНК) для исследования с помощью ПЦР-РВ с использованием условий ПЦР-РВ, описанных в Примере V, и праймеров, описанных
10 в Таблице 29.

Таблица 29.		
Праймеры, специфичные для GALR1 и GALR2		
Название	Последовательность	SEQ ID NO:
GALR1 fwd	5'CCCCATCATGTCATCCACCT 3'	150
GALR1 rev	5'ATGGGGTTCACCGAGGAGTT 3'	151
GALR2 fwd	5'CATCGTGGCGGTGCTTTT 3'	152
GALR2 rev	5'AGCGGGAAGCGACCAAAC 3'	153

[0307] Результаты в Таблице 30 демонстрируют, что у трансфицированных неклональных клеток и клонов количество мРНК GALR1 намного больше, чем у
20 родительских клеток. Клеточный скрининг с помощью галанин-TVEMP показал, что клон №7 являлся самым чувствительным к галанин-TVEMP. Также было показано, что клон №7 содержал наибольшее количество мРНК GALR1 согласно Таблице 30. Значения СТ для клона 7 Neuro-2a GalR1 (Neuro-2a №7) были самыми низкими, а за ними следовали значения для клона 4 и затем для клона 12. Неклональные клетки, протестированные
25 на тот момент времени, демонстрировали значения СТ, близкие к значениям для клона 12, однако эти клетки содержали постоянно меняющиеся популяции клеток с варьирующими концентрациями рецептора GalR1 и поэтому не считались хорошей популяцией для дальнейшей работы. Из трех клонов с низкими значениями EC₅₀, клон №12 Neuro-2a GalR1 (Neuro-2a №12) характеризовался наибольшей скоростью роста, а
30 за ним следовали клон №7 Neuro-2a и наконец, клон №4 Neuro-2a. В дополнение к медленной скорости роста, клон №4 Neuro-2a не тестировали в дальнейшем, потому что чувствительность клона №7 Neuro-2a было намного лучше, чем у клона №4.

Таблица 30.					
Высокие отличия уровней мРНК GALR1 между трансфицированными клональными клетками Neuro-2a и трансфицированными неклональными и родительскими клетками.					
Клеточная линия	Родительская	Неклональная	Клон 4	Клон 7	Клон 12
Средн. СТ	32,0	21,7	20,8	19,3	21,6
кратность разницы уровней мРНК	1,0	1269,5	2418,7	6793,8	1332,6

5. Сравнение чувствительности и специфичности клонов Ns 7 и 12 Neuro-2a к соединениям галанин-TVEMP

[0308] Два клона параллельно протестировали с целью идентификации наиболее чувствительного и специфичного из них, чтобы можно было уверенно собирать данные от клона с лучшими характеристиками. Таблица 31 демонстрирует результаты этих
45 двух клонов при обработке галанин-TVEMP из серии C и LH_N/A для исследования соответственно чувствительности и избирательности. Оба клона показывали высокие значения отношения сигнала к шуму. Клон №7 Neuro-2a продемонстрировал EC₅₀ 5,5 нМ, в то время как EC₅₀ для клона №12 Neuro-2a составляло 68,4 нМ. Клон №12 Neuro-

2а необходимо тестировать в диапазоне доз 0-300 нМ, в то время как клон №7 Neuro-2а можно тестировать в диапазоне доз 0-30 нМ для достижения плато при наибольшей используемой концентрации. Оба клон показывали хорошее разделение между LН_N/А и галанин-ТВЕМР из серии С. Клон №12 Neuro-2а демонстрировал некоторое неспецифическое поглощение при высоких концентрациях, в то время как клон №7 Neuro-2а не демонстрировал его. Как явствует из приведенных в таблице результатов, диапазон для тестирования с помощью клеток Neuro-2а №7 в 10 раз ниже, чем диапазон для клеток Neuro-2а №12, что приводит к использованию в 10 раз меньшего количества соединения с Neuro-2а №7, чем с Neuro-2а №12. Neuro-2а №7 в 8 раз более селективен, чем клон №12 Neuro-2а при использовании LН_N/А для сравнения. Отношение сигнала к шуму составляло более 100 для обоих клонов, однако для разработки клеточного теста на активность достаточно значения отношения, равного 10. ЕС₅₀ для клон №7 Neuro-2а составляла 5,5 нМ и была примерно в 12 раз ниже, чем ЕС₅₀ для Neuro-2а №12, которая составляла 68,4 нМ. Более низкий диапазон доз для тестирования, 24-кратная избирательность по сравнению с LН_N/А, высокое значение отношения сигнала к шуму, превосходная чувствительность, приводящая к низкому значению ЕС₅₀ и низкому количеству белка, необходимому для каждого теста - все эти характеристики говорили о том, что клон №7 Neuro-2а являлся предпочтительным клоном для разработки клеточного теста на активность, используемого для определения отношений активности соединений галанин-ТВЕМР.

Таблица 31. Сравнение характеристик клонов №7 и №12 Neuro-2а

	Neuro-2а №7	Neuro-2а №12
Диапазон	0-30 нМ	0-300 нМ
Избирательность	24-кратная	3-кратная
Отношение сигнала к шуму	190	547
Процент максимального сигнала LН _N /А по сравнению с максимальным сигналом гал-ТВЕМР	4,3%	37,6%
ЕС ₅₀	5,5 нМ	68,4 нМ
Необходимое количество белка	~1 мкг	~10 мкг

Neuro-2а №7 и №12 обрабатывали галанин-ТВЕМР из серии С и 1-Нм/А в течение 16 часов в ПС. Активность детектировали с помощью ECL-метода твердофазного ИФА.

Пример XVI

Получение клональных клеточных линий, сверхэкспрессирующих рецептор KOR-1 для поглощения эндопептидазы с измененной нацеленностью динорфин А

[0309] Следующий пример описывает исследование и сравнение нескольких клональных клеточных линий, полученных из стабильной клеточной линии путем ее трансфекции рецептором-мишенью и последующего клонирования этой клеточной линии. Данный конкретный пример относится к идентификации и исследованию клональных клеточных линий, трансфицированных hKOR-1, которые были впервые описаны в Примере III, Таблице 9.

[0310] Четыре клон AGN P33-KOR (клоны номер 8, 9, 10 и 12 из Таблицы 9 в Примере III) отобрали и протестировали с Дун/А на полнодозовый ответ при 0-150 нМ. В то же самое время, два клон SiMa-KOR (клоны номер 12 и 16 из Таблицы 9 в Примере III) отобрали и протестировали с Дун/А на полнодозовый ответ при 0-150 нМ. В этом эксперименте клоны 8, 9 и 12 AGN P33-KOR продемонстрировали очень низкое поглощение и поэтому их исключили из дальнейшего исследования; клон 10 AGN P33-KOR продемонстрировал хороший уровень поглощения и для него получили значение ЕС₅₀, составляющее 30,3 нМ. Два протестированные клон SiMa-KOR показали хороший

уровень поглощения, и для клона 16 получили значение EC_{50} , составляющее 26,6 нМ, а для клона 12 получили значение EC_{50} , составляющее 11,8 нМ. Затем эти три клона протестировали на чувствительность и избирательность путем сравнения поглощения соединения-мишени Dyn/A с отрицательным контролем LHN/A, у которого отсутствует нацеливающий лиганд, и с контролем Noc/A. Сравнение трех клонов и родительских клеток SiMa с помощью полнодозового ответа при 0-150 нМ приведено в Таблице 32.

Клеточная линия	EC_{50} Dyn/A (нМ)	EC_{50} LHN/A (нМ)	EC_{50} Noc/A (нМ)
Родительская SiMa	>100	>100	5,4
Клон 10 AGN P33-KOR	9,7	>150	9,4
Клон 16 SiMa-KOR	10,6	>100	1,6
Клон 12 SiMa-KOR	4,65	>150	19,7

[0311] Наблюдалось заметное увеличение поглощения Dyn/A у клонов, трансфицированных KOR-1, при обработке Dyn/A, в то время как родительские клетки SiMa демонстрировали минимальное поглощение этого соединения (уровень поглощения был сходен с таковым в отрицательном контроле LHN/A). Во всех клеточных линиях, включая родительские клетки SiMa, присутствовало некоторое количество Noc/A. Это не было удивительно, поскольку поглощение Noc/A в клетках SiMa наблюдали при разработке теста для этого соединения с измененной нацеленностью. Более того, поглощение Noc/A было наилучшим в клеточной линии AGN P33, которая была получена специально для этой эндопептидазы с измененной нацеленностью. Отличие между поглощением Noc/A и поглощением соединения Dyn/A было больше в клональных клетках клона 12 SiMa-KOR (SK12). На всех кривых активность отрицательного контроля, l.hn/a, была минимальна, демонстрируя, что в отсутствие связывающего домена специфическое поглощение в этих клеточных линиях отсутствует, и наиболее низким было поглощение в клетках SK12, показывая, что поглощение соединения Dyn/A является высоко специфичным. На основании этих результатов клон SK12 отобрали для будущей оптимизации и исследования.

[0312] Исследования по оптимизации проводили с клетками SK12 для разработки надежного, специфичного и чувствительного теста. Было исследовано несколько параметров, включая среду для засева и плотности засева, среду для обработки и время обработки. Обобщение данных, полученных при оптимизации, приведено в Таблице 33.

Использованная среда		Время обработки	Клетки/лунка				
засев	обработка		25000	50000	75000	100000	150000
полная	полная	6 ч + на ночь	51,3	76	13,4	9,2	Н/П
полная	полная	16 ч	21,3	19,0	4,96	4,64	Н/П
полная	полная	16 ч	Н/П	Н/П	Н/П	2,1	15,3
без сыворотки	без сыворотки	16 ч	Н/П	Н/П	Н/П	9,0	12,1
полная	без сыворотки	16 ч	Н/П	10,3	5,4	8,97	8,38
полная	полная	16 ч	Н/П	7,7	4,86	13,72	11,26
без сыворотки	без сыворотки	16 ч	Н/П	11,2	8,5	8,4	9,2

[0313] Таблица В показывает, что клетки, засеянные с плотностью 100000 клеток на лунку в ПС и обработанные соединениями в ПС, демонстрировали большую изменчивость значений EC_{50} от одного эксперимента к другому (4,6; 1,2 и 13,72 нМ), в

то время как клетки, засеянные с плотностью 100000 клеток на лунку в СБС и обработанные соединениями, разбавленными СБС, демонстрировали лучшие кривые и единообразные значения EC_{50} (9,0 и 8,4 нМ). В будущем, клетки следует засеивать с

5 [0314] Клетки SK12, засеянные в покрытые поли-D-лизином планшеты с плотностью 100000 клеток на лунку в СБС на 24 часа с последующей обработкой в СБС в течение 16 часов, демонстрировали минимальное значение EC_{50} 8,4 \pm 1,1 нМ и отношению сигнала к шуму, составлявшее 12. Оба эти значения являются приемлемыми для

10 будущего использования этих клеток в КТА.
Исследование клеток SK12 в тесте насыщения связывания

[0315] Тест насыщения связывания, используемый здесь, был подробно описан в Примере V. Исследования по насыщению связывания проводили с использованием 3H -дипренорфина, который является антагонистом KOR-1, для оценки связывания. Общее, специфическое и неспецифическое связывание измеряли в нескольких экспериментах.

15 Кривая насыщения связывания 3H -дипренорфина с рецептором была построена на основании двух независимых экспериментов. Неспецифическое связывание, по-видимому, составляло около 25%, а 75% приходилось на специфическое связывание молекулы с рецептором. Аффинность молекулы к рецептору соответствовала 6,5 нМ. Значение

20 Втах говорило о том, что на клетках SK12 присутствует 23 фмоль рецепторов KOR-1 на клетку.

[0316] Если не указано обратное, все числа, выражающие количества компонентов, свойства, такие как молекулярная масса, условия реакции, и т.д. используемые в заявке и формуле изобретения, должны пониматься как дополненные термином

25 "приблизительно" во всех случаях. Соответственно, если не указано обратное, численные параметры, приведенные в описании и приложенной формуле изобретения, являются приближениями, которые могут измениться в зависимости от желаемых свойств данного изобретения, которые необходимо получить. По крайней мере, и не в качестве попытки

30 ограничить применение доктрины эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый численный параметр следует рассматривать с учетом приведенных значащих разрядов с применением обычных методов округления. Несмотря на то, что численные диапазоны и параметры, задающие широкий объем изобретения, являются приближениями, численные данные, указанные в определенных примерах, приведены настолько точно

35 насколько это возможно. Любое численное значение, однако, изначально содержит определенные ошибки, обязательно следующие из стандартного отклонения, обнаруживаемого в соответствующих экспериментальных измерениях.

[0317] Существительные и подобные обозначения, используемые в контексте описания изобретения (особенно в контексте приведенной ниже формулы изобретения), следует рассматривать как охватывающие и единственное, и множественное число, если не

40 указано обратное или из контекста явно не следует обратное. Перечисление диапазонов величин используется исключительно в качестве удобного указания на каждую отдельную величину как находящуюся в пределах диапазона. Если в данном описании не указано обратное, каждое отдельное значение считается упомянутым в данном документе. Все методы, описанные здесь, могут быть осуществлены в любом

45 подходящем порядке, если в описании не указано иное или обратное не следует явно из контекста. Использование любого из примеров, или типового выражения (например, "такой как") приведенное здесь, направлено на лучшее освещение изобретения и не накладывает ограничений на область применения изобретения, если явно не указано

обратное. Язык, применяемый в описании, не следует понимать как необходимый элемент, важный для реализации изобретения.

[0318] Группы альтернативных элементов или вариантов реализации изобретения, раскрытого здесь, не следует рассматривать как ограничения. Каждый член группы может быть упомянут и заявлен индивидуально или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, приведенными в настоящем описании. Ожидается, что один или более членов группы могут быть включены в, или удалены из группы из соображений удобства и/или патентоспособности. Когда происходит такое включение или удаление, описание следует рассматривать как содержащее измененную группу, таким образом дополняя письменное описание всех групп Маркуша, используемых в приложенной формуле изобретения.

[0319] В заявке описаны некоторые варианты реализации этого изобретения, включая лучший способ, известный авторам изобретения. Конечно, модификации описанных вариантов реализации станут очевидными специалистам в этой области техники после прочтения предшествующего описания. Автор изобретения ожидает, что квалифицированные специалисты смогут надлежащим образом использовать такие варианты, и авторы изобретения предполагают, что изобретение может быть осуществлено иначе, чем описано здесь. Соответственно, в соответствии с действующим законодательством, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта, описанного в формуле изобретения, прилагающейся к этому документу. Более того любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариациях относится к изобретению, если в данном документе не указано обратное или из контекста явным образом не следует иное.

[0320] Определенные варианты реализации, раскрытые здесь, могут быть далее ограничены в формуле изобретения при помощи выражения "состоящий из" или "по существу состоящий из". При использовании в формуле изобретения, в представлении сведений или добавлении в качестве поправки, выражение "состоящий из" исключает любой элемент, шаг или компонент, не указанный в формуле изобретения. Выражение "состоящий по существу из" ограничивает объем формулы изобретения указанными материалами или шагами и теми, которые не оказывают влияния на основную(ые) или новую(ые) характеристику(и). Охарактеризованные таким образом варианты реализации изобретения неотъемлемо или явным образом описаны и приведены в настоящем описании.

[0321] Далее, в описании сделаны многочисленные библиографические ссылки на патенты и печатные работы. Каждый цитируемый выше источник и печатная работа включены в настоящую заявку посредством ссылки.

[0322] В завершение, нужно понимать, что варианты реализации изобретения, раскрытые здесь, проиллюстрированы на основе принципов, лежащих в основе данного изобретения. В рамках этого изобретения могут быть использованы другие модификации. Таким образом, в качестве примера, но не ограничения, альтернативные конфигурации данного изобретения могут быть использованы в соответствии с сущностью данного изобретения. Соответственно, данное изобретение не ограничено только тем, что продемонстрировано и описано в настоящем описании.

Формула изобретения

1. Способ детектирования активности эндопептидаз с измененной нацеленностью, включающий этапы:

а. обработки клетки из стабильной клеточной линии образцом, содержащим

эндопептидазу с измененной нацеленностью, причем указанная клетка из стабильной клеточной линии чувствительна к активности указанной эндопептидазы с измененной нацеленностью при концентрации эндопептидазы с измененной нацеленностью около 500 пМ или ниже;

5 б. выделения из обработанной клетки компонента SNAP-25, содержащего продукт расщепления SNAP-25₁₉₇, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A;

в. осуществления контакта компонента SNAP-25 с анти-SNAP-25 антителом, иммобилизованным на твердофазной подложке,

10 при этом анти-SNAP-25 антитело связывается с эпитопом SNAP-25₁₉₇, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A, и характеризуется константой скорости ассоциации для интактного SNAP-25, составляющей менее $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ и равновесной константой диссоциации для эпитопа, составляющей менее 0,450 нМ;

15 г. детектирования присутствия комплекса антитело-антиген, включающего анти-SNAP-25 антитело и продукт расщепления SNAP-25₁₉₇, карбоксильный конец которого соответствует остатку P₁ разрезаемой связи в сайте расщепления токсином BoNT/A,

20 при этом детектирование продукта расщепления SNAP-25₁₉₇ с помощью указанного комплекса антитело-антиген является показателем того, что эндопептидаза с измененной нацеленностью активна.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что присутствие комплекса антитело-антиген детектируют с использованием "сэндвич"-метода твердофазного ИФА.

25 3. Способ по п.1, отличающийся тем, что способ характеризуется отношением сигнала к шуму для нижней асимптоты, составляющим по меньшей мере 3:1, и отношением сигнала к шуму для верхней асимптоты, составляющим по меньшей мере 10:1.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что образец содержит не более 100 пМ эндопептидазы с измененной нацеленностью.

30 5. Способ по п.1, отличающийся тем, что клетка из стабильной клеточной линии чувствительна к ингибированию экзоцитоза эндопептидазой с измененной нацеленностью при концентрации эндопептидазы с измененной нацеленностью около 100 пМ или ниже.

35 6. Способ по п.1, отличающийся тем, что способ осуществляют в одноканальном режиме или многоканальном режиме.

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Ванг, Джоанн
 Жу, Хонг
 Ходжес, Дайана Д.
 Фернандес-Салас, Эстер

<120> ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ НА АКТИВНОСТЬ ЭНДОПЕПТИДАЗ С ИЗМЕНЕННОЙ
 НАЦЕЛЕННОСТЬЮ

<130> 18496 (ВОТ)

<150> US 61/160,217
 <151> 2009-03-13

<160> 153

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 903
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Эндопептидаза с измененной нацеленностью

<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

RU 2 543 650 C2

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

RU 2 543 650 C2

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

<210> 2

<211> 908

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Эндопептидаза с измененной нацеленностью

<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

RU 2 543 650 C2

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

RU 2 543 650 C2

		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> Искусственная последовательность

<220>

<223> Эндопептидаза с измененной нацеленностью

<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		

RU 2 543 650 C2

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

RU 2 543 650 C2

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

<220>

<223> Эндопептидаза с измененной нацеленностью

<400> 4

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

RU 2 543 650 C2

			420					425				430			
Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Asp	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					480
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					560
Asn	Ile	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly	Gln	Leu	Glu
				565					570					575	
Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Glu	Leu
			580					585					590		
Asp	Lys	Tyr	Thr	Met	Phe	His	Tyr	Leu	Arg	Ala	Gln	Glu	Phe	Glu	His
		595					600					605			
Gly	Lys	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn	Ser	Val	Asn	Glu	Ala	Leu	Leu
	610					615					620				
Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Asp	Tyr	Val	Lys	Lys
625					630						635				640
Val	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Met	Phe	Leu	Gly	Trp	Val	Glu	Gln
			645						650					655	
Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asp	Glu	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Thr	Thr	Asp
			660					665					670		
Lys	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Ile	Ile	Ile	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu
	675						680					685			
Asn	Ile	Gly	Asn	Met	Leu	Tyr	Lys	Asp	Asp	Phe	Val	Gly	Ala	Leu	Ile
	690					695					700				
Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Glu	Phe	Ile	Pro	Glu	Ile	Ala	Ile
705					710					715					720
Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Ala	Asn	Lys	Val
			725						730					735	
Leu	Thr	Val	Gln	Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Ser	Lys	Arg	Asn	Glu	Lys
			740				745						750		
Trp	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn	Trp	Leu	Ala	Lys	Val
	755						760					765			
Asn	Thr	Gln	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg	Lys	Lys	Met	Lys	Glu	Ala	Leu	Glu
	770					775					780				
Asn	Gln	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn	Tyr	Gln	Tyr	Asn	Gln
785					790					795					800
Tyr	Thr	Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Asn	Ile	Asn	Phe	Asn	Ile	Asp	Asp	Leu
			805						810					815	
Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala	Met	Ile	Asn	Ile	Asn
			820					825					830		
Lys	Phe	Leu	Asn	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser	Met	Ile
	835						840						845		
Pro	Tyr	Gly	Val	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Lys	Asp
	850					855					860				
Ala	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Asn	Arg	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Gln
865					870					875					880

RU 2 543 650 C2

Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile
 885 890 895
 Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr
 900 905 910
 Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
 915

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

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

<210> 6
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

RU 2 543 650 C2

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

<210> 7
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Macaca mulatta

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

<210> 8
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 8
 Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20 25 30
 Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
 35 40 45
 Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
 50 55 60
 Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
 65 70 75 80
 Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
 85 90 95
 Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
 100 105 110
 Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
 115 120 125
 Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
 130 135 140
 Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
 145 150 155 160
 Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
 165 170 175
 Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
 180 185 190
 Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
 195 200 205

<210> 9
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

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

RU 2 543 650 C2

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

<210> 10
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<400> 11

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

RU 2 543 650 C2

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

<210> 12
<211> 204
<212> PRT
<213> Carassius auratus

<400> 12
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Ser Asp Met Gln Gln
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn Leu Asn Asp
65 70 75 80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys Asn Lys Met Lys
85 90 95
Ser Gly Gly Ser Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala
100 105 110
Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser
115 120 125
Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met
130 135 140
Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu Arg His
145 150 155 160
Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile
165 170 175
Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu
180 185 190
Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200

<210> 13
<211> 203
<212> PRT
<213> Carassius auratus

RU 2 543 650 C2

<400> 13

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

<210> 14

<211> 204

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 14

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

RU 2 543 650 C2

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

<210> 15
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Danio rerio

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

<210> 16
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Torpedo marmorata

<400> 16
 Met Glu Asn Ser Val Glu Asn Ser Met Asp Pro Arg Ser Glu Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Gln Arg Cys Ala Asp Gln Ile Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser
 20 25 30
 Thr Arg Arg Met Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile
 35 40 45
 Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile
 50 55 60
 Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys
 65 70 75 80
 Asn Leu Ser Asp Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys

RU 2 543 650 C2

				85					90				95		
Asn	Lys	Leu	Lys	Asn	Phe	Glu	Ala	Gly	Gly	Ala	Tyr	Lys	Lys	Val	Trp
			100					105					110		
Gly	Asn	Asn	Gln	Asp	Gly	Val	Val	Ala	Ser	Gln	Pro	Ala	Arg	Val	Met
		115					120					125			
Asp	Asp	Arg	Glu	Gln	Met	Ala	Met	Ser	Gly	Gly	Tyr	Ile	Arg	Arg	Ile
	130					135					140				
Thr	Asp	Asp	Ala	Arg	Glu	Asn	Glu	Met	Glu	Glu	Asn	Leu	Asp	Gln	Val
145					150					155					160
Gly	Ser	Ile	Ile	Gly	Asn	Leu	Arg	His	Met	Ala	Leu	Asp	Met	Ser	Asn
				165					170					175	
Glu	Ile	Gly	Ser	Gln	Asn	Ala	Gln	Ile	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Lys	Gly
			180					185					190		
Asp	Met	Asn	Lys	Ala	Arg	Ile	Asp	Glu	Ala	Asn	Lys	His	Ala	Thr	Lys
		195					200					205			
Met	Leu														
	210														

<210> 17
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

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> *Xenopus laevis*

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

<210> 19
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Strongylocentrotus purpuratus

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

RU 2 543 650 C2

165 170 175
 Ile Gly Ala Gln Asn Ser Gln Val Gly Arg Ile Thr Ser Lys Ala Glu
 180 185 190
 Ser Asn Glu Gly Arg Ile Asn Ser Ala Asp Lys Arg Ala Lys Asn Ile
 195 200 205
 Leu Arg Asn Lys
 210

<210> 20
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Drosophila melanogaster*

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

<210> 21
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Hirudo medicinalis*

<400> 21
 Met Ala Lys Asp Ile Lys Pro Lys Pro Ala Asn Gly Arg Asp Ser Pro
 1 5 10 15
 Thr Asp Leu Gln Glu Ile Gln Leu Gln Met Asn Ala Ile Thr Asp Asp
 20 25 30
 Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ala Met Cys Glu Glu Ser Lys
 35 40 45

RU 2 543 650 C2

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

<210> 22
<211> 212
<212> PRT
<213> Loligo pealei

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

210

<210> 23
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> *Lymnaea stagnalis*

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

<210> 24
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 24
 Met Ser Gly Asp Asp Asp Ile Pro Glu Gly Leu Glu Ala Ile Asn Leu
 1 5 10 15
 Lys Met Asn Ala Thr Thr Asp Asp Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
 20 25 30
 Leu Ala Leu Cys Glu Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ile Lys Thr Leu Val
 35 40 45
 Met Leu Asp Asp Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Cys Glu Gly Ala Leu
 50 55 60
 Asp Thr Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Asp His Leu Lys Gly
 65 70 75 80
 Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys Val Leu Pro Trp Asn Lys Thr Asp
 85 90 95

RU 2 543 650 C2

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

<210> 25
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

RU 2 543 650 C2

```

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

```

```

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

```

```

<400> 26
Met Glu Pro Leu Phe Pro Ala Pro Phe Trp Glu Val Ile Tyr Gly Ser
 1                5                10                15
His Leu Gln Gly Asn Leu Ser Leu Leu Ser Pro Asn His Ser Leu Leu
                20                25                30
Pro Pro His Leu Leu Leu Asn Ala Ser His Gly Ala Phe Leu Pro Leu
                35                40                45
Gly Leu Lys Val Thr Ile Val Gly Leu Tyr Leu Ala Val Cys Val Gly
 50                55                60
Gly Leu Leu Gly Asn Cys Leu Val Met His Thr Lys Met Lys Thr Ala
65                70                75                80
Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Thr Leu Val Leu
                85                90                95
Leu Thr Leu Pro Phe Gln Gly Thr Asp Ile Leu Leu Gly Phe Trp Pro
                100                105                110
Phe Gly Asn Ala Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Ile Asp Tyr Tyr Asn
                115                120                125
Met Phe Thr Ser Thr Phe Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Tyr
130                135                140
Val Ala Ile Cys His Pro Ile Arg Ala Leu Asp Val Arg Thr Ser Ser
145                150                155                160
Lys Ala Gln Ala Val Asn Val Ala Ile Trp Ala Leu Ala Ser Val Val
                165                170                175
Gly Val Pro Val Ala Ile Met Gly Ser Ala Gln Val Glu Asp Glu Glu
                180                185                190
Ile Glu Cys Leu Val Glu Ile Pro Thr Pro Gln Asp Tyr Trp Gly Pro
195                200                205
Val Phe Ala Ile Cys Ile Phe Leu Phe Ser Phe Ile Val Pro Val Leu
210                215                220
Val Ile Ser Val Cys Tyr Ser Leu Met Ile Arg Arg Leu Arg Gly Val
225                230                235                240
Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile
                245                250                255
Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Gly Cys Trp Thr
                260                265                270
Pro Val Gln Val Phe Val Leu Ala Gln Gly Leu Gly Val Gln Pro Ser
                275                280                285

```

RU 2 543 650 C2

Ser Glu Thr Ala Val Ala Ile Leu Arg Phe Cys Thr Ala Leu Gly Tyr
 290 295 300
 Val Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
 305 310 315 320
 Phe Lys Ala Cys Phe Arg Lys Phe Cys Cys Ala Ser Ala Leu Arg Arg
 325 330 335
 Asp Val Gln Val Ser Asp Arg Val Arg Ser Ile Ala Lys Asp Val Ala
 340 345 350
 Leu Ala Cys Lys Thr Ser Glu Thr Val Pro Arg Pro Ala
 355 360 365

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

<400> 27
 Met Glu Pro Ala Pro Ser Ala Gly Ala Glu Leu Gln Pro Pro Leu Phe
 1 5 10 15
 Ala Asn Ala Ser Asp Ala Tyr Pro Ser Ala Cys Pro Ser Ala Gly Ala
 20 25 30
 Asn Ala Ser Gly Pro Pro Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ser Leu Ala Leu
 35 40 45
 Ala Ile Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ser Ala Val Cys Ala Val Gly Leu
 50 55 60
 Leu Gly Asn Val Leu Val Met Phe Gly Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met
 65 70 75 80
 Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala
 85 90 95
 Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Met Glu
 100 105 110
 Thr Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys Ala Val Leu Ser Ile Asp
 115 120 125
 Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val
 130 135 140
 Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg
 145 150 155 160
 Thr Pro Ala Lys Ala Lys Leu Ile Asn Ile Cys Ile Trp Val Leu Ala
 165 170 175
 Ser Gly Val Gly Val Pro Ile Met Val Met Ala Val Thr Arg Pro Arg
 180 185 190
 Asp Gly Ala Val Val Cys Met Leu Gln Phe Pro Ser Pro Ser Trp Tyr
 195 200 205
 Trp Asp Thr Val Thr Lys Ile Cys Val Phe Leu Phe Ala Phe Val Val
 210 215 220
 Pro Ile Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Leu Leu Arg Leu
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg Ser Leu
 245 250 255
 Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val 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

RU 2 543 650 C2

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

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

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

RU 2 543 650 C2

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

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

<400> 30

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

RU 2 543 650 C2

Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Leu Lys Met Arg Met
 340 345 350
 Glu Arg Gln Ser Thr Ser Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
 355 360 365
 Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Gly Met Asn Lys Pro Val
 370 375 380

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

<400> 31
 Met Cys Leu His Arg Arg Val Pro Ser Glu Glu Thr Tyr Ser Leu Asp
 1 5 10 15
 Arg Phe Ala Gln Asn Pro Pro Leu Phe Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ala
 20 25 30
 Ser Glu Ser Arg Met Ala His Ala Pro Leu Leu Gln Arg Cys Gly Ala
 35 40 45
 Ala Arg Thr Gly Phe Cys Lys Lys Gln Gln Glu Leu Trp Gln Arg Arg
 50 55 60
 Lys Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Thr Arg Lys Val Ser Val Leu Leu
 65 70 75 80
 Ala Thr Ser His Ser Gly Ala Arg Pro Ala Val Ser Thr Met Asp Ser
 85 90 95
 Ser Ala Ala Pro Thr Asn Ala Ser Asn Cys Thr Asp Ala Leu Ala Tyr
 100 105 110
 Ser Ser Cys Ser Pro Ala Pro Ser Pro Gly Ser Trp Val Asn Leu Ser
 115 120 125
 His Leu Asp Gly Asn Leu Ser Asp Pro Cys Gly Pro Asn Arg Thr Asp
 130 135 140
 Leu Gly Gly Arg Asp Ser Leu Cys Pro Pro Thr Gly Ser Pro Ser Met
 145 150 155 160
 Ile Thr Ala Ile Thr Ile Met Ala Leu Tyr Ser Ile Val Cys Val Val
 165 170 175
 Gly Leu Phe Gly Asn Phe Leu Val Met Tyr Val Ile Val Arg Tyr Thr
 180 185 190
 Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala
 195 200 205
 Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Val Asn Tyr Leu
 210 215 220
 Met Gly Thr Trp Pro Phe Gly Thr Ile Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser
 225 230 235 240
 Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Cys Thr Met
 245 250 255
 Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp
 260 265 270
 Phe Arg Thr Pro Arg Asn Ala Lys Ile Ile Asn Val Cys Asn Trp Ile
 275 280 285
 Leu Ser Ser Ala Ile Gly Leu Pro Val Met Phe Met Ala Thr Thr Lys
 290 295 300
 Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Asp Cys Thr Leu Thr Phe Ser His Pro Thr
 305 310 315 320
 Trp Tyr Trp Glu Asn Leu Leu Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe
 325 330 335
 Ile Met Pro Val Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Ile Leu

<400> 34

Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A

<400> 35

Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A

<400> 36

Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1

<400> 37

Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1 5 10

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A

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

<210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A

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

<210> 40
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A

<221> SITE
 <222> (13)...(13)
 <223> карбоксилированный глутамин

<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> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1

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

<210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1 разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A

<400> 42

Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1 разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A

<400> 43

Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1 разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A

<400> 44

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

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1 разрезаемой связи в сайте расщепления VoNT/A

<400> 45

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

<210> 46

<211> 12

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится

остаток P1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A

<400> 46

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

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25, на свободном карбоксильном конце которого находится остаток P1 разрезаемой связи в сайте расщепления BoNT/A

<221> SITE

<222> (13)...(13)

<223> Карбоксилированный лизин

<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> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25

<400> 48

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

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Антиген SNAP-25

<400> 49

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

<210> 50

<211> 88

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<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> Искусственная последовательность

<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> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид BirA

<400> 52

```

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

<210> 53

<211> 7570

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Конструкция с обеспечением экспрессии рQBI-25/GFP-BoNT/A-LC.

<400> 53

```

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggctcgt gagtagtgcg 120
cgagcaaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggtttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgtatc 240
catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtccat agcccatata 360
tggagtcccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 420
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480
attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtaacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca 660
tcgctattac catgggtgat cggttttggc agtacatcaa tgggctgga tagcggttt 720
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 780
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggcg 840
gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900
cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc 960
tccgcgggcc accatggagg gcccggttac cgtaccgga tccagatc tgggcgggcc 1020
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatggtgat gttaacggcc acaagtctc 1140
tgtcagtgga gaggtggaag gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtg 1260
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gactttttca agagtgccat 1320
gcccgaaggt tatgtacagg aaaggacat cttcttcaa gatgacggca actacaagac 1380
acgtgctgaa gtcaagtttg aagggtgata cctgtttaat agaatcgagt taaaaggtat 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagaccg 1560
ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620
tggcagatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaat ctgccctttc 1680
gaaagattccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagtttghta cagctgctgg 1740
gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga ggcgagggtg gaccttttgt 1800
taataaaciaa tttaattata aagatcctgt aatgggtgtt gatattgctt atataaaaat 1860
tccaaatgca ggacaaatgc aaccagtaaa agcttttaaa attcataata aaatattgggt 1920
tattccagaa agagatacat ttacaaatcc tgaagaagga gatttaaatc caccaccaga 1980
agcaaaaaciaa gttccagttt catattatga ttcaacatat ttaagtacag ataatgaaaa 2040
agataattat ttaaaggag ttacaaaatt atttgagaga atttattcaa ctgatccttg 2100
aagaatggtt ttaacatcaa tagtaagggg aataccattt tggggtggaa gtacaataga 2160
tacagaatta aaagtattg atactaattg tattaatgtg atacaaccag atggtagtta 2220
tagatcagaa gaacttaatc tagtaataat aggaccctca gctgatatta tacagtttga 2280
atgtaaaagc tttggacatg aagttttgaa tcttacgcga aatggttatg gctctactca 2340
atacattaga tttagcccag attttacatt tggttttgag gagtcacttg aagttgatac 2400
aaatcctctt ttaggtgcag gcaaatgtgc tacagatcca gcagtaacat tagcacatga 2460
acttatacat gctggacata gattatatgg aatagcaatt aatccaaata gggtttttaa 2520
agtaataact aatgcctatt atgaaatgag tgggttagaa gtaagctttg aggaacttag 2580
aacatttggg ggacatgatg caaagtttat agatagtta caggaaaacg aatttcgtct 2640
atattattat aataagttta aagatatagc aagtacactt aataaagcta aatcaatagt 2700
aggactact gcttcattac agtatatgaa aatgtttttt aaagagaaat atctoctatc 2760
tgaagataca tctggaaaat tttcggtaga taaattaaaa tttgataagt tatacaaaaat 2820
gttaacagag atttacacag aggataattt tgtaagttt tttaaagtac ttaacagaaa 2880
aacatatttg aattttgata aagccgtatt taagataaat atagtacctt aggtaaatga 2940
cacaatatat gatggattta atttaagaaa tacaatttta gcagcaaac ttaattggtca 3000

```

aaatacagaa attaataata tgaatthttac taaactaaaa aatthttactg gattgthttga 3060
 atthttataag ttgctatgtg taagagggat aatcacttctg aatgaacgc gttggcccta 3120
 ttctatagtg tcacctaaat gctagagctc gctgatcagc ctogactgtg ctttctagtt 3180
 gccagccatc tgttgthttgc ccctcccccg tgcttctctt gaccttgaa ggtgccactc 3240
 cactgtctct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 3300
 ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaagggga ggattggaa gacaatagca 3360
 ggcagctgg ggatgoggtg ggctctatgg ctcttgaggc ggaaagaacc agtggggct 3420
 ctagggggta tccccacgcg ccctgtagcg gcgcatlaag cgcggcgggt gtgggtggtta 3480
 cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcg cgtctcttct gcttctctcc 3540
 cttcctttct cgccacgttc gccggcttct cccgtcaagc tctaaatcgg ggcacccct 3600
 tagggttccg atthtagtgc ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat taggggtgatg 3660
 gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggthttctg ccctttgacg ttggagtcca 3720
 cgttctthta tagtggtactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggctc 3780
 attctthttga thttataaggg atthttgggga thttcggcta ttggttaaaa aatgagctga 3840
 thtaacaaaa atthaacgcg aatthattct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtggaaa 3900
 gtccccaggc tccccaggca ggcagaagta tgcaaacat gcatctcaat tagtcagcaa 3960
 ccaggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaac atgcatctca 4020
 attagtcagc aacctagtc ccgcccctaa ctccgcccct cccgccccta actccgccc 4080
 gttccgccc tctctccgccc catggctgac taaththttt tatttatgca gaggccgagg 4140
 ccgctctgc ctctgagcta thccagaagt agtgaggagg cththtttga ggcctaggct 4200
 thtgcaaaaa gctcccggga gcttgatat ccaththctg atctgatcaa gagacaggat 4260
 gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcagc aggttctccg gccgcttggg 4320
 tggagaggct attcggctat gactgggac aacagacaat cggctgctct gatgccgcg 4380
 tgttccggct tcagcgcag gggcggccgg thctthttgt caagaccgac ctgtccgggtg 4440
 ccctgaatga actgcaaggc gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcggtc 4500
 cttgcgcagc tgtgctcagc gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg 4560
 aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctc tgccgagaaa gtatccatca 4620
 tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc 4680
 aagcgaacaa tcgcatcgag cgagcacgta ctccggatgga agccggtctt gtcgatcagg 4740
 atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgcagccga actgttccg aggtcaagg 4800
 cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgaccatgg cgatgcctgc ttgccgaata 4860
 tcatggtgga aaatggcccg thttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcg 4920
 accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat 4980
 gggctgaccg cttctcgtg cthttacggta tcgcccctc cgattcgcag cgcacgcct 5040
 tctatcgctt cttgacgag thcttctgag cgggactctg gggthcgaaa tgaccgacca 5100
 agcagcggc aacctgccc cagcagatth cgattccacc gccgcttct atgaaaggth 5160
 gggcttcgga atcgtthttc gggacggcg ctggatgatc ctccagcgc gggatctcat 5220
 cgttaggtht thcggccacc caactthgt tattgcagct tataatggtt acaataaag 5280
 caatgacatc acaatthca caataaagc atththttca ctgcattcta gttgtggtt 5340
 gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataccg tcgacctca gtagagctt 5400
 ggcgtaatca tggcatagc tgttctctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 5460
 caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctgggt gcctaatgag tgagctaaact 5520
 cacattaatt gcgttgctc cactgcccgc thttcagctg ggaaacctgt cgtgccagct 5580
 gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggthtt cgtattggg gctcttccgc 5640
 thctcgcctc actgactcgc tgcgctcgg ctgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 5700
 ctcaaaaggc gtaatcgggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 5760
 agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggc gcgttgctg cgtthttcca 5820
 taggctccgc cccctgacg agcatcaaa aatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 5880
 cccgacagga ctataaagat accaggcgtt thccctgga agctccctcg tgcgctctcc 5940
 tgttccgacc ctgcccgtta ccggatacct gthcgcctth ctccctcgg gaagcgtggc 6000
 gctthctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagthcgggt taggtcgtt cgtccaagct 6060
 gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cagccgctgc gccttatccg gtaactatcg 6120
 thttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt atcggcactg gcagcagcca ctggtaacag 6180
 gattagcaga gcgaggtat taggcgggtc tacagagtht ttgaagtgtt ggcctaacta 6240
 cggctacact agaaggacag thtttggtat ctgcgctctg ctgaagccag thacctcgg 6300
 aaaaagagth ggtagctctt gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gthgththtt 6360
 thtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc cthttgatct 6420

```

ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag 6480
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aatgaagtt ttaaatcaat 6540
ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 6600
tatctcagcg atctgtctat ttogttcacc catagttgcc tgactccccg tctgtgatag 6660
aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc 6720
acgctcaccg gctccagatt taccagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 6780
aagtggctcct gcaactttat ccgcctccat ccagtcattt aattggtgcc gggagctag 6840
agtaagtagt tgcocagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt 6900
gggtgcacgc tctgctgttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 6960
agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 7020
tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatgggt atggcagcac tgcataattc 7080
tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 7140
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 7200
taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg 7260
aaaactctca aggatcttac cgtctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc 7320
caactgatct tcagcatcct ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag 7380
gcaaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7440
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 7500
tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagc ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 7560
acctgacgctc                                     7570

```

<210> 54

<211> 682

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность аминокислот легкой цепи GFP-BONT/A.

<400> 54

```

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

```

RU 2 543 650 C2

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

Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu
 660 665 670
 Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys
 675 680

<210> 55
 <211> 6259
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Конструкция с обеспечением экспрессии pQBI-25/GFP.

<400> 55
 gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggtcgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgcg gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggtagt gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgtatc 240
 catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
 gattattgac tagtattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 360
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc 420
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480
 attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 540
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 660
 tcgctattac catgggtgat cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 720
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 780
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 840
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900
 cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc 960
 tccgcggggc accatggagg gcccggttac cggtagccga tccagatatc tgggcggccg 1020
 ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
 cactggagtt gtccaattc ttgttgaatt agatgggtgat gttaacggcc acaagttctc 1140
 tgtcagtgga gagggtgaag gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga agttcatctg 1200
 cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
 tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gactttttca agagtgccat 1320
 gcccgaaagt tcaagatagg aaaggaccat ctcttcaaaa gatgacggca actacaagac 1380
 acgtgctgaa gtcaagtgtg aaggtgatac ccttggttaat agaatcgagt taaaaggat 1440
 tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
 caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagaccgc 1560
 ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620
 tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaa ctgccctttc 1680
 gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagttttaa cagctgctgg 1740
 gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga ggcggaggtg gatgaacgcg 1800
 ttggccctat tctatagtgt cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc 1860
 cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctccccctg gccttccttg accctggaag 1920
 gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcatcgcg tgctctgagta 1980
 ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtgg ggcaggacag caagggggag gattgggaa 2040
 acaatagcag gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca 2100
 gctggggctc taggggggtat ccccacgccc cctgtagcgg cgattaagc gcggcgggtg 2160
 tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcggcc gctcctttcg 2220
 ctttcttccc ttcttttctc gccacgttcg cgggctttcc cgtcaagct ctaaattggg 2280
 gcatcccttt aggtttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt 2340
 aggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt 2400
 tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaac tggaaacaaca ctcaacccta 2460
 tctcggctca ttcttttgat ttataagggg ttttggggat ttcggcctat tggttaaaaa 2520

atgagctgat ttaacaaaaa ttttaacgcga attaattctg tggaaatgtgt gtcagttagg 2580
 gtgtggaaaag tccccaggct ccccaggcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 2640
 agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 2700
 tgcattctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccac ccgcccctaa 2760
 ctccgcccag ttccgcccac tctccgcccc atggctgact aatttttttt ttttttgcag 2820
 aggccgaggc cgctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 2880
 gcctaggctt ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatata cattttcgga tctgatcaag 2940
 agacaggatg aggatcgttt cgcattgatt aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3000
 ccgcttgggt ggagaggcta ttccgctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3060
 atgccgcctg gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggg tctttttgtc aagaccgacc 3120
 tgtccgggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3180
 cgggcgttcc ttgctcagct gtgctcagc ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3240
 tattgggoga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag 3300
 tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtg tgatccggct acctgccat 3360
 tcgaccacca agcgaaacat cgcattcgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 3420
 tcgatcagga tgatctggac gaagagcacc aggggctcgc gccagccgaa ctgttccgca 3480
 ggctcaaggc gcgatgccc gacggcggag atctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct 3540
 tgccgaatat catgggtgaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg 3600
 gtgtggcggg ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg tgatattgct gaagagcttg 3660
 gcggcgaatg ggctgaccgc ttctcgtgct tttaccggat cgcgcctccc gattcgcagc 3720
 gcatcgctct ctatgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 3780
 gaccgaccaa cgcagcctca acctgccatc accgatttcc gattccaccg ccgcttcta 3840
 tgaaggttg ggcttcgaa tctgtttccg ggacgcccgc tggatgatcc tccagcgcgg 3900
 ggatctcatg ctggagttct tcccccacc caacttgttt attgcagctt ataatggtta 3960
 caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag 4020
 ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt cgacctctag 4080
 ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttctctgt tgaaattggt atccgctcac 4140
 aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggt cctaatgagt 4200
 gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgct 4260
 gtgccagctg cattaatgaa tccggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg 4320
 ctcttccgct tctcgcctca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg 4380
 atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 4440
 gaacatgtga gcaaaaaggc agcaaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgcctggc 4500
 gtttttccat aggtccgccc cccctgacga gcatcaciaa aatcgacgct caagtcaag 4560
 gtggcgaaac ccgacaggac tataagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt 4620
 gcgctctcct cttccgacct tgcgccttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg 4680
 aagcgtggcg ttttctcaat gctcagctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg 4740
 ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaacccc cgttcagccc gaccgctcgc ccttatccgg 4800
 taactatcgt cttgagtcca acccggtaa acacgactta tccgactgg cagcagccac 4860
 tggtaacagg attagcagag cgaggatgt agggcgtgct acagagttct tgaagtgggtg 4920
 gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt 4980
 taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg 5040
 tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 5100
 tttgatcttt tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt 5160
 ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt 5220
 taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 5280
 tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcttcatcc atagttgcct gactccccgt 5340
 cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc cccagtgctg caatgatacc 5400
 gcgagacca cgtcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 5460
 cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgtgccc 5520
 ggaagctaga gtaagtagtt cgcagttaa tagtttgcgc aacgttggtg ccattgctac 5580
 aggcacgtg gtgtcagct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 5640
 atcaaggcga gttacatgat cccccatggt gtgcaaaaa gcggttagct ccttcggctc 5700
 tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact 5760
 gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 5820
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttccc cggcgtcaat 5880
 acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 5940


```

ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctggtgaga tccagttcga tgtaacccac 6000
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 6060
aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact 6120
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 6180
atacatattht gaatgtattht agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 6240
aaaagtgccca cctgacgtc

```

<210> 56
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность аминокислот GFP.

<400> 56
 Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 50 55 60
 Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
 65 70 75 80
 His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85 90 95
 Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 100 105 110
 Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 115 120 125
 Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 130 135 140
 Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 145 150 155 160
 Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
 165 170 175
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 180 185 190
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
 195 200 205
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220
 Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly
 245

<210> 57
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Гибкий спейсер G-спейсер

<400> 57
 Gly Gly Gly Gly
 1

<210> 58
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Гибкий спейсер G-спейсер

<400> 58
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 59
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Гибкий спейсер A-спейсер

<400> 59
 Ala Ala Ala Ala
 1

<210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Гибкий спейсер A-спейсер

<400> 60
 Ala Ala Ala Ala Val
 1 5

<210> 61
 <211> 3359
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 gtcgaggtgc tcatagtga gccctggctc ccggggcggac ggagccgcac ggtagtagat 60
 ggggggtgtg ccgtggcccc cgactctgct cggcggggcc gttcctgctt tgccatccgt 120
 gtgggacttc caccacagtg gaggcacgag agctggggcc catatgctgc ttgcccagct 180
 tgggaaagag gaggctgctg caaaggaccg atcggcggct tcgggctgcc ggctcactcg 240

gctgctgctgct ctggtctggc gtctgctgag aagatcctct tctaccctgc tctgcacctg 300
 tgctcgactg ccagccggct gaggcgggg gtctccacgg tggccccagc tcccaggag 360
 gttgcagaag taccgtacag agtggatttg cagggcagtg gcatggagcc cctcttcccc 420
 gcgccgttct gggagggtat ctacggcagc caccttcagg gcaacctgtc cctcctgagc 480
 cccaaccaca gtctgctgcc cccgcatctg ctgctcaatg ccagccacgg cgccttctctg 540
 ccctcgggc tcaaggtcac catcgtgggg ctctacctgg cagtgtgtgt cggaggggctc 600
 ctggggaact gcttgtcat gtacgtcatc ctacggcaca ccaaaatgaa gacagccacc 660
 aatatttaca tctttaacct ggccctggcc gacactctgg tcctgctgac gctgcccttc 720
 cagggcacgg acatcctcct gggcttctgg cgtttggga atgctgctg caagacagtc 780
 attgccattg actactacaa catgttcacc agcaccttca ccctaactgc catgagtgtg 840
 gatcgtatg tagccatctg ccaccccatc cgtgccctcg acgtccgac gtccagcaaa 900
 gccaggtctg tcaatgtggc catctgggcc ctggcctctg ttgtcgggtg tcccgttgcc 960
 atcatgggct cggcacaggt cgaggatgaa gagatcgagt gcctggtgga gatccctacc 1020
 cctcaggatt actggggccc ggtgtttgcc atctgcatct tcctcttctc ctctcatctc 1080
 cccgtgctcg tcatctctgt ctgctacagc ctcatgatcc ggcgctccg tggagtccg 1140
 ctgctctcgg gctcccgaga gaaggaccgg aacctgcggc gcatcactcg gctgggtgctg 1200
 gtggtagtgg ctgtgttcgt gggctgctgg acgctgtcc aggtcttctg gctggcccaa 1260
 gggctggggg ttcagccgag cagcgagact gccgtggcca ttctgctct ctgcacggcc 1320
 ctgggctacg tcaacagctg cctcaacccc atcctctacg ccttctctgga tgagaacttc 1380
 aaggcctgct tccgcaagtt ctgctgtgca tctgcctctg gccgggacgt gcaggtgtct 1440
 gaccgcgtgc gcagcattgc caaggacgtg gccctggcct gcaagacctc tgagacggta 1500
 ccgcgcccg catgactagg cgtggacctg ccatgggtgc ctgtcagccc gcagagccca 1560
 tctacgcccacacagagct cacacaggtc actgctctct aggcggacac accctgggcc 1620
 ctgagcatcc agagcctggg atgggctttt cctgtggggc cagggatgct cggtcccaga 1680
 ggaggacctgacatcat gggacaggtc aaagcattag ggccacctcc atggccccag 1740
 acagactaaa gctgccctcc tgggtgcagg cggaggggac acaaggacct acctggaagc 1800
 agctgacatg ctggtggacg gccgtgactg gagcccgtgc cctccctcc ccgtgcttca 1860
 tgtgactctt ggctctctg ctgctgcgtt ggcagaacct tgggtgggca ggcacccgga 1920
 ggaggagcag cagctgtgtc atcctgtgcc ccccatgtgc tgtgtgctgt ttgcatggca 1980
 gggctccagc tgcttcagc cctgtgacct ctcctcaggg cagctggaca ggcttggcac 2040
 tgcccgggaa gtgcagcagg cagcttttct ttgggggtgg acttgccctg agcttggagc 2100
 tgccacctgg aggacttggc tgttccgact ccacctgtgc agccggggcc accccaggag 2160
 aaagtgtcca ggtgggggct ggcagtcctt ggctgcagac cccgagctgg ccctgggcca 2220
 gccgcacctc tgaagggttt ctgtgtgctg cacgggtgac gcctcatccc tgactgcage 2280
 ttgactctgg gcccacccc catttccctt caggagacca gcgagaggcc ctggcccatt 2340
 ccctccagcg gtgcaatgaa ctatcatgct gtggacctc aaccagccc tgccttctcag 2400
 tgtggggcag gtgtctcagg acgaaggcgc cgcgtgacca catgggcagc tctgttcaca 2460
 aagtggaggc ctcgttttcc tggctttgac tgcctgtttt ggggtgggaga agattctctg 2520
 ggggtccccca catcctccca aggtccctt cacagcctct cctttgcttg aagccagagg 2580
 tcagtggccg tgctgtgttg cgggggaagc tgtgtggaag gagaagctgg tggccacagc 2640
 agagtctctg tctggggacg cctgcttcat ttacaagcct caagatggct ctgtgtaggg 2700
 cctgagcttg ctgcccacg ggaggatggc ttacagcag agccagcatg aggggtgggg 2760
 cctggcaggg cttgcttgag ccaaactgca aaggctgtgg tggctgtgag gacactgcgg 2820
 gggttggggg gggggcgtct gtacctcagg ggatgccccg ctgtggtcac ccagagaatc 2880
 acccttctg gtctacagat ggaagctgca ggttgggtgac tttgcaaatg cacttctctac 2940
 agatgaacta ttaaaagacc tgcaacattg aaaaaactca tttttccac caaaacctg 3000
 gccagtaac ctaccttagg cacctgcaaa gacaggaag tgatggctgt ctgcgaacag 3060
 agcctgggct gctcctctg ctctggggag tctaggccgt ggggactgtt ctggggaggc 3120
 tcatgctgtc tccatgacgt ctgtggcagg agtccctgag gacgggagct gcctagctac 3180
 agttttcttg ccaaggcgag gtgttttgtg aatctgtgct gatgtaatgt gcacctcac 3240
 gtatttatgc atgtggcaag cgttacttcc tgtgcacgta gccagccctg ggtctgtctc 3300
 tggggaatg aaaaaggacc ctaataaaca cctgctcact ggctgggtat tcttcgtaa 3359

<210> 62
 <211> 1134
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 ttgcagggca gtggcatgga gcccctcttc cccgogccgt tctgggaggt tatctacggc 60
 agccaccttc agggcaacct gtccctcctg agccccaacc acagtctgct gcccccgcat 120
 ctgctgctca atgccagcca cggcgccttc ctgcccctcg ggctcaaggt caccatcgtg 180
 gggctctacc tggcgtgtg tgctggaggg actgccttgt catgcacacc 240
 aaaatgaaga cagccaccaa tatttacatc tttaacctgg ccctggccga cactctggtc 300
 ctgctgacgc tgccttcca gggcacggac atcctcctgg gcttctggcc gtttgggaat 360
 gcgctgtgca agacagtcac tgccattgac tactacaaca tgttcaccag caccttcacc 420
 ctaactgcca tgagtgtgga tcgctatgta gccatctgcc accccatccg tgcctcgcac 480
 gtcgcacagt ccagcaaagc ccaggctgtc aatgtggcca tctgggcctt ggctctgtt 540
 gtcgggtgttc ccgttgccat catgggctcg gcacaggtcg aggatgaaga gatcagatgc 600
 ctggtggaga tcctacccc tcaggattac tggggcccgg tgtttgccat ctgcactctc 660
 ctcttctcct tcctcgtccc cgtgctcgtc atctctgtct gctacagcct catgatccgg 720
 cggctccgtg gagtccgctt gctctcgggc tcccagagaga aggaccggaa cctgcggcgc 780
 atcactcggc tgggtcgtgt ggtagtggct gtgttcgtgg gctgctggac gcctgtccag 840
 gtcttcgtgc tggcccaagg gctgggggtt cagccgagca gcgagactgc cgtggccatt 900
 ctgctcttct gcacggccct gggctacgtc aacagctgcc tcaaccccat cctctacgcc 960
 ttctctggatg agaacttcaa ggctgcttc cgcaagttct gctgtgcatc tgccctgcgc 1020
 cgggacgtgc aggtgtctga ccgctgcgc agcattgcca aggacgtggc cctggcctgc 1080
 aagacctctg agacgggtacc gcggcccga tgactaggcg tggacctgcc catg 1134

<210> 63
 <211> 1774
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 ccgaggagcc tgcggctgct cctggctcac agcgtccgg gcgaggagag cgggcggacg 60
 cggggggctg ggccgggtgc ggccggcagg caggcggacg aggcgcagag acagcggggc 120
 ggccggggcg cggcagccgg cggcgtcggg gccgcggcct ctgccttgcc gctcccctcg 180
 cgtcggatcc ccgcgcccag ggcgcacggt ggagagggac gcgcgggagc cggccggcag 240
 ccatggaacc ggccccctcc gccggcgccg agctgcagcc ccgctcttc gccaacgct 300
 cggacgccta ccctagcgcc tgccccagcg ctggcgcca tgcgtcgggg ccgccaggcg 360
 cgcggagcgc ctctcctc gccttgcaa tcgccatcac cgcgctctac tggccggtgt 420
 ggcgggtggg gctgtgggc aacgtgctt acatgttcgg catcgtccgg tacactaaga 480
 tgaagacggc caccaacatc tacatctca acctggcct agccgatgcg ttggccacca 540
 gcacgtgcc tttccagagt gccaaagtacc tgatggagac gtggcccttc ggcgagctgc 600
 tctgcaaggc tgtgctctcc atcgactact acaatatgtt caccagcatc ttacgctca 660
 ccatgatgag tgttgaccgc tacatcgtct tctgccaccc tgtcaaggcc ctggacttcc 720
 gcacgcctgc caaggccaag ctgatcaaca tctgtatctg ggtcctggcc tcaggcgttg 780
 gcgtgcccac catggtcatg gctgtgacc gtcccggga cggggcagtg gtgtgcatgc 840
 tccagttccc cagcccagc tggactggg acacggtgac caagatctgc gtgttctct 900
 tgccttctgt ggtgccatc ctcatcatca ccgtgtgcta tggcctcatg ctgctgcgc 960
 tgcgcagtgt gcgctgctg tcgggctcca aggagaagga ccgcagcctg cggcgcatca 1020
 cgcgcagtgt gctggtggt gtgggcgctt cgtggtgtg ttgggcgccc atccacatct 1080
 tctcctcgt ctggacgct gtggacatcg accggcgcg caacccctggt gtggctgcgc 1140
 tgcacctgtg catcgcgtg ggctacgcca atagcagcct caaccccgct ctctacgctt 1200
 tctcgcagca gaactcaag cgctgcttc gccagctctg ccgcaagccc tgcggccgcc 1260
 cagaccccag cagcttcagc cgcgcccgc aagccacggc ccgcgagcgt gtcaccgct 1320
 gcaccccgtc cgatggtccc ggcggtggcg ctgcgcctg accaggccat cggccccca 1380
 gagcggccct ccctagtgc ccggaggcca catgagctcc agtgggagg gcgagccatg 1440
 atgtggagtg gggcagtaga aggtcggagg cttgggaccg ccagatgggg cctctgtttc 1500
 ggagacggga ccggccgct agatgggcat ggggtgggc tctggtttgg ggcgaggcag 1560
 aggacagatc aatggcgag tgctctggt ctgggtgccc cgtccacggc tctaggtggg 1620
 gcgggaaagc cagtgactcc aggagaggag cgggacctgt ggctctaaa ctgagtcctt 1680
 aaacagggca tctccaggaa ggcggggctt caaccttgag acagcttcgg tttctaactt 1740

ggagccggac tttcggagtt gggggtcggg gccc

1774

<210> 64

<211> 1773

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 64

```

ccgaggagcc tgcgctgctc ctggctcaca gcgctccggg cgaggagagc gggcggaccg 60
gggggctggg ccggtgcggg cggcgaggca ggcggacgag gcgcagagac agcggggcgg 120
ccggggcgcg gcacgcggcg ggtcggggcc ggcctctgcc ttgccgctcc cctcgcgctc 180
gatccccgcg cccaggcagc cgggtggagag ggacgcggcg gacgccggca gccatggaac 240
cggccccctc cgccggcgcc gagctgcagc cccgctctt cgccaacgcc tcggacgcct 300
accctagcgc ctccccagc gctggcgcca atgctcggg gccgccaggc gcgcggagcg 360
cctcgtccct cgccctggca atcgccatca ccgctctta ctcggccgtg tgcgccgtgg 420
ggctgctggg caactgtctt gtcattgttc gcatcgtccg gtacactaag atgaagacgg 480
ccaccaacat ctacatcttc aacctggcct tagccgatgc gctggccacc agcacgctgc 540
ctttccagag tgccaagtac ctgatggaga cgtggccctt cggcgagctg ctctgcaagg 600
ctgtgctctc catcgactac tacaatatgt tcaccagcat cttcacgctc accatgatga 660
gtgttgaccg ctacatcgct gtctgccacc ctgtcaaggc cctggacttc cgcacgcctg 720
ccaaggccaa gctgatcaac atctgtatct gggctcctggc ctcaggcgctt ggcgtgccc 780
tcattggtcat ggtgtgacc cgtccccggg acggggcagt ggtgtgcatg ctccagttcc 840
ccagccccat ctggtactgg gacacgggtg ccaagatctg cgtgttcctc ttcgccttcg 900
tggtgcccat cctcatcatc accgtgtgct atggcctcat gctgctgcg ctgcgcagtg 960
tgccgctgct gtcgggctcc aaggagaagg accgcagcct gcggcgcatc acgcgcatgg 1020
tgctgggtgt tgtggcgccc ttcgtggtgt gttggcgccc catccacatc ttcgtcatcg 1080
tctggacgct ggtggacatc gaccggcgcg acccgctggt ggtggctgcy ctgcacctgt 1140
gcatcgcgct gggctacgcc aatagcagcc tcaaccccgt gctctacgct ttctcgcagc 1200
agaacttcaa gcgctgcttc cgccagctct gccgcaagcc ctgcggccgc ccagacccca 1260
gcagcttcag ccgcgcccgc gaagccacgg cccgcgagcg tgcaccgcc tgcaccccg 1320
ccgatggtcc cggcggtggc gctgccgctt gaccaggcca tccggcccc agacgccct 1380
ccctagttgt acccgaggc cacatgagtc ccagtgggag gcgcgagcca tgatgtggag 1440
tggggccagt agataggtcg gagggtttg ggaccgccag atggggcctc tgtttcggag 1500
acgggaccgg gccgctagat gggcatgggg tgggcctctg gtttggggcg aggcagagga 1560
cagatcaatg gcgcagtgcc tctggtctgg gtgccccgt ccacggctct aggtggggcg 1620
ggaaagccag tgactccagg agaggagcgg gacctgtggc tctacaactg agtccttaaa 1680
cagggcatct ccaggaaggc ggggcttcaa ccttgagaca gcttcggttt ctaacttga 1740
gccggacttt cggagtggg ggtccgggg ccc 1773

```

<210> 65

<211> 1154

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 65

```

atggactccc cgatccagat cttccgcggg gagccgggccc ctacctgcgc cccgagcgcc 60
tgctgcccc ccaacagcag cgcttggttt ccggctggg ccgagcccga cagcaacggc 120
agcgcgggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc catcccggtc 180
atcatcacgg cgtctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tgggtggcaa ctcgtggtc 240
atgttcgtga tcatccgata cacaagatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300
ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac ggtctacttg 360
atgaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480
tgccaccccg tgaaggcttt ggaactccgc acaccctga aggcaaagat catcaatata 540
tgcattctgg tgctgtcgtc atctgttggc atctctgcaa tagtccttgg aggcacccaaa 600
gtcaggggag acgtcgatgt cattgagtgc tcttgcagt tcccagatga tgactactcc 660
tgggtggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcattcttg ccttcgtgat cctgtctc 720

```

```

atcatcatcg tctgctacac cctgatgac ctgcgctctca agagcgtccg gtcctttct 780
ggctcccag agaaagatcg caacctgcgt aggatcacca gactggtcct ggtggtggtg 840
gcagtcttcg tcgtctgctg gactcccatt cacatattca tcctggtgga ggctctgggg 900
agcacctccc acagcacagc tgcctctctcc agctattact tctgcatcgc cttaggctat 960
accaacagta gcctgaatcc cattctctac gcctttcttg atgaaaactt caagcggtgt 1020
ttccgggact tctgctttcc actgaagatg aggatggagc ggcagagcac tagcagagtc 1080
cgaaatacag ttcaggatcc tgcttacctg agggacatcg atgggatgaa taaaccagta 1140
tgactagtcg tgga                                     1154

```

```

<210> 66
<211> 1143
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 66
atggaatccc cgattcagat cttccgcggg gagccggggc ctacctgcgc cccgagcggc 60
tgcctgcccc ccaacagcag gcctgggtt cccggctggg ccgagcccga cagcaacggc 120
agcgcgggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccgc catcccggtc 180
atcatcacgg cggctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tggggggcaa ctcgctggtc 240
atggtcgtga tcatccgata cacaagatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300
ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac ggtctacttg 360
atgaattcct gccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480
tgccaccccg tgaaggcttt ggacttccgc acacccttga aggcaaagat catcaatata 540
tgcactctggc tgctgtctc atctgttggc atctctgcaa tagtcttgg aggacacaaa 600
gtcaggggaag acgtcagatg cattgagtgc tccttgcagt tcccagatga tgactactcc 660
tgggtgggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcactcttg ccttcgtgat cctgtcctc 720
atcatcatcg tctgctacac cctgatgac ctgcgctctca agagcgtccg gtcctttct 780
ggctcccag agaaagatcg caacctgcgt aggatcacca gactggtcct ggtggtggtg 840
gcagtcttcg tcgtctgctg gactcccatt cacatattca tcctggtgga ggctctgggg 900
agcacctccc acagcacagc tgcctctctcc agctattact tctgcatcgc cttaggctat 960
accaacagta gcctgaatcc cattctctac gcctttcttg atgaaaactt caagcggtgt 1020
ttccgggact tctgctttcc actgaagatg aggatggagc ggcagagcac tagcagagtc 1080
cgaaatacag ttcaggatcc tgcttacctg agggacatcg atgggatgaa taaaccagta 1140
tga                                     1143

```

```

<210> 67
<211> 2738
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 67
cctgtaaaga aatgatgag ggctaaatcc atcagcacca aagctgggaa gccctccagg 60
ttcattttgga agaaaatact cctctgagct caaaggaagt gtgatctgtc acaatattgt 120
atgcctgcac taagtttgca tcctgaaaac tcaactggaag ataggaaagc aagcatgaaa 180
aagcagccgg gtcagacagg cttctggatt cagtgtgtgg acatgacttt gcctgcatga 240
attgcccctt tctcctaaa acaagagaat tgggtcaagt ggatgtggca gaactgggct 300
gctctgagat gatagaaaag ggctcctgct tttcctgtaa ttgcagcccc ttgttcttgt 360
ggttgctaca tgcaataaat gtaattctat gagaaggacc agcccttaca tcccatcaaa 420
atgtttcctg gaaacctgga gcacagaact ctgatatacct ctcacactgt ggcaggagaa 480
gcagcacaag gcacaatgct gaaatagcat ggtccaggat gtgtttgcac agaagagtgc 540
ccagtgaaga gacctactcc ttggatcgct ttgogcaaaa tccaccctt tccctcctc 600
cctcccctcc agcctccgaa tcccgcattg cccacgctcc cctcctgcag cgggtcgggg 660
cagccaggac tggtttctgt aagaaacagc aggagctgtg gcagcggcga aaggaagcgg 720
ctgaggcgct tggaaaccga aaagtctcgg tgctcctggc tacctgcac agcgggtccc 780
gcccggccgt cagtaccatg gacagcagcg ctgccccac gaacgccagc aattgactgt 840
atgccttggc gtactcaagt tgctccccag caccagccc cggttcctgg gtcaacttgt 900

```

cccacttaga tggcaacctg tccgacccat gcggtccgaa ccgcaccgac ctgggcccga 960
 gagacagcct gtgccctccg accggcagtc cctccatgat cacggccatc acgatcatgg 1020
 ccctctactc catcgtgtgc gtggtggggc tcttcggaaa cttcctggtc atgtatgtga 1080
 ttgtcagata caccaagatg aagactgcca ccaacatcta cttttccaac cttgctctgg 1140
 cagatgcctt agccaccagt accctgccct tccagagtggt gaattaccta atgggaacat 1200
 ggccatttgg aaccatcctt tgcaagatag tgatctccat agattactat aacatgttca 1260
 ccagcatatt caccctctgc accatgagtg ttgatcgata cattgcagtc tgccaccctg 1320
 tcaaggcctt agatttccgt actccccgaa atgccaaaat tatcaatgtc tgcaactgga 1380
 tcctctcttc agccatttgg cttcctgtaa tgttcatggc tacaacaaaa tacaggcaag 1440
 gttccataga ttgtacacta acattctctc atccaacctg gtactgggaa aacctgctga 1500
 agatctgtgt tttcatcttc gccttcatta tgccagtgtc catcattacc gtgtgctatg 1560
 gactgatgat cttgcgcctc aagagtgtcc gcatgctctc tggctccaaa gaaaaggaca 1620
 ggaatcttcc aaggatcacc aggatgggtg tgggtgggtg ggctgtgttc atcgtctgct 1680
 ggactcccat tcacattttac gtcacatta aagccttggg tacaatccca gaaactacgt 1740
 tccagactgt ttcttggcac ttctgcattg ctctaggtta cacaaacagc tgccctcaacc 1800
 cagtccttta tgcatttctg gatgaaaact tcaaacgatg cttcagagag ttctgtatcc 1860
 caacctcttc caacattgag caacaaaact ccaactcgaat tcgtcagaac actagagacc 1920
 accctccac ggccaatata gtggatagaa ctaatcatca gctagaaaat ctggaagcag 1980
 aaactgctcc gttgccctaa cagggctctca tgccattccg accttacca agcttagaag 2040
 ccaccatgta tgtggaagca ggttgcttca agaattgtga ggaggctcta attctctagg 2100
 aaagtgcctg cttttaggtc atccaacctc tttcctctc ggccactctg ctctgcacat 2160
 tagagggaca gccaaaaagta agtggagcat ttggaaggaa aggaatatac cacaccgagg 2220
 agtccagttt gtgcaagaca cccagtggaa ccaaaacca tcgtggtatg tgaattgaag 2280
 tcatcataaa aggtgaccct tctgtctgta agattttatt ttcaagcaaa tatttatgac 2340
 ctcaacaaag aagaaccatc ttttgtaag ttcaccgtag taacacataa agtaaagtct 2400
 acctctgatc aaagcacctt gaatggaagg tccgagtctt tttagtgttt tgcaagggaa 2460
 tgaatccatt attctatttt agacttttaa cttcacctta aaattagcat ctggctaagg 2520
 catcattttc acctccattt cttggttttg tattgtttaa aaaaataaca tctctttcat 2580
 ctagctccat aattgcaagg gaagagatta gcatgaaagg taactctgaa cacagtcatg 2640
 tgtcagctgt agaaaggttg attctcatgc actgcaataa cttccaaaaga gtcacatcatg 2700
 gggatttttc attcttaggc tttcagtggt ttgttctc 2738

<210> 68

<211> 2053

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 68

catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
 gctgtctttc cttccctccc tgctcggcgg ctcaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
 ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacctgtcac tgacccccca 180
 gccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
 agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtgcctg gaaagcacc 300
 gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact ttggttatgt 360
 tggatgaaca aggagaacaa ctcgatcgtg tcgaagaagg catgaacat atcaaccaag 420
 acatgaagga ggctgagaaa aatttaaaag atttaggaa atgctgtggc cttttcatat 480
 gtccttghaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
 acggagtggg gccagccag cctgctcgtg tagtgacga acgggagcag atggccatca 600
 gtggcggcct catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aatgaaatg gatgaaaacc 660
 tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
 agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
 ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaaagtgg taagtgtgcc 840
 caccctgtt ctctccaaa tgctgtcggg caagatagct cttcatgct tttctcatgg 900
 tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtc acccccattg tgaatgttgt 960
 cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata cttgtgtct tttgttctc cttggctctc 1020
 ttctttccaa aggttgtaaa tagtggtcat ttggtggctc taactccttg atgtcttgag 1080
 tttcattttt cttttctct cctcgggtggc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140

tcaatgtgct	gttgattctt	tcaatccaca	gtattgttct	tgtaaaactg	tgacattcca	1200
cagagttact	gccacgggcc	tttgagtgtc	aggctctgaa	tctctcaaaa	tggtgccgtct	1260
ttggttcctc	atggctgtta	tctgtcttta	tgatttcatg	attagacaat	gtggaattac	1320
ataacaggca	ttgcaactaa	agtgatgtga	tttatgcatt	tatgcatgag	aactaaatag	1380
atTTTTtagat	tcctacttaa	acaaaaactt	tccatgacag	tagcatactg	atgagacaac	1440
acacacacac	acaaaacaac	agcaacaaca	acagaacaac	aacaaagcat	gctcagtatt	1500
gagacactgt	caagattaag	ttataccagc	aaaagtgcag	tagtgtcact	TTTTTcctgt	1560
caatatatag	agacttctaa	atcataatca	tcctTTTTta	aaaaaaagaa	TTTTAAAAA	1620
gatggatttg	acacactcac	catttaataca	tttccagcaa	aatatatgtt	tggtgaaat	1680
tatgtcaaat	ggatgtaata	tagggtttgt	ttgctgcttt	tgatggctac	gttttgagaga	1740
gagcaatctt	gctgtgaaac	agtgtggatg	taaattttat	aaggctgact	cttactaacc	1800
accatttccc	ctgtggtttg	ttatcagtac	aattctttgt	tgcttaatct	agagctatgc	1860
acaccaaatt	gctgagatgt	ttagtagctg	ataaagaaac	cttttaaaaa	aataatataa	1920
atgaatgaaa	tataaactgt	gagataaata	tcattatagc	atgtaatatt	aaattcctcc	1980
tgtctcctct	gtcagtttgt	gaagtgattg	acattttgta	gctagttaa	aattattaaa	2040
aattatagac	tcc					2053

<210> 69

<211> 2053

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 69

catctttgat	gagggcagag	ctcacgttgc	attgaagacg	aaacctcggg	gaggtcaggc	60
gctgtctttc	cttccctccc	tgctcggcgg	ctccaccaca	gttgcaacct	gcagaggccc	120
ggagaacaca	accctcccga	gaagcccagg	tocagagcca	aacctcgtac	tgacccccca	180
gcccaggcgc	ccagccactc	cccaccgcta	ccatggccga	agacgcagac	atgcgcaatg	240
agctggagga	gatgcagcga	aggctgacc	agttggctga	tgagtcgctg	gaaagcacc	300
gtcgtatgct	gcaactggtt	gaagagagta	aagatgctgg	tatcaggact	ttggttatgt	360
tgatgaaaca	aggagaacaa	ctggaacgca	ttgaggaagg	gatggaccaa	atcaataagg	420
acatgaaaga	agcagaaaag	aatttgacgg	acctaggaaa	attctgctggg	ctttgtgtgt	480
gtccctgtaa	caagcttaaa	tcaagtgatg	cttacaacaa	agcctggggc	aataatcagg	540
acggagtggg	ggccagccag	cctgctcgtg	tagtggacga	acgggagcag	atggccatca	600
gtggcggcct	catccgcagg	gtaacaaaat	atgcccgaga	aatgaaatg	gatgaaaacc	660
tagagcaggt	gagcggcatc	atcgggaacc	tcogtcacat	ggccctggat	atgggcaatg	720
agatcgatac	acagaatcgc	cagatcgaca	ggatcatgga	gaaggctgat	tccaacaaaa	780
ccagaattga	tgaggccaac	caacgtgcaa	caaagatgct	gggaagtgtt	taagtgtgcc	840
cacccgtgtt	ctctccaaa	tgctgtcggg	caagatagct	ccttcatgct	tttctcatgg	900
tattatctag	taggtctgca	cacataaac	acatcagtc	acccccattg	tgaatgttgt	960
cctgtgtcat	ctgtcagctt	cccacaata	ctttgtgtct	tttgttctct	cttggctctct	1020
ttctttccaa	aggttgtaca	tagtggctcat	ttggtggctc	taactccttg	atgtcttgag	1080
tttcattttt	cattttctct	cctcgggtgg	atTTTgctgaa	taacaacaat	ttaggaatgc	1140
tcaatgtgct	gttgattctt	tcaatccaca	gtattgttct	tgtaaaactg	tgacattcca	1200
cagagttact	gccacgggcc	tttgagtgtc	aggctctgaa	tctctcaaaa	tggtgccgtct	1260
ttggttcctc	atggctgtta	tctgtcttta	tgatttcatg	attagacaat	gtggaattac	1320
ataacaggca	ttgcaactaa	agtgatgtga	tttatgcatt	tatgcatgag	aactaaatag	1380
atTTTTtagat	tcctacttaa	acaaaaactt	tccatgacag	tagcatactg	atgagacaac	1440
acacacacac	acaaaacaac	agcaacaaca	acagaacaac	aacaaagcat	gctcagtatt	1500
gagacactgt	caagattaag	ttataccagc	aaaagtgcag	tagtgtcact	TTTTTcctgt	1560
caatatatag	agacttctaa	atcataatca	tcctTTTTta	aaaaaaagaa	TTTTAAAAA	1620
gatggatttg	acacactcac	catttaataca	tttccagcaa	aatatatgtt	tggtgaaat	1680
tatgtcaaat	ggatgtaata	tagggtttgt	ttgctgcttt	tgatggctac	gttttgagaga	1740
gagcaatctt	gctgtgaaac	agtgtggatg	taaattttat	aaggctgact	cttactaacc	1800
accatttccc	ctgtggtttg	ttatcagtac	aattctttgt	tgcttaatct	agagctatgc	1860
acaccaaatt	gctgagatgt	ttagtagctg	ataaagaaac	cttttaaaaa	aataatataa	1920
atgaatgaaa	tataaactgt	gagataaata	tcattatagc	atgtaatatt	aaattcctcc	1980
tgtctcctct	gtcagtttgt	gaagtgattg	acattttgta	gctagttaa	aattattaaa	2040

aattatagac tcc

2053

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

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

<210> 71
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

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

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

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

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

<400> 73
 caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
 tcttgaagc cttctgggta caccttcaact gaccattcta ttcactgggt gaagcagaag 120
 cctggacagg gcttagaatg gattggatat cttttcccg gaaatggtaa ttttgaatat 180
 aatgagaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctocag cactgcctac 240
 atgcacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaagatggac 300
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tctca 336

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

<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> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 75
 caggttcagc tgcagcagtc cgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaggg cttctggcta caccttcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagcag 120
 cctggccagg gcttggaatg gatcggatat atttttcccg gaaatggaaa tattgaatac 180
 aatgacaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccgg cactgcctac 240
 atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300
 tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctca 336

<210> 76
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<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> ДНК
 <213> Mus musculus

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

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

<400> 78
 Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

RU 2 543 650 C2

tcttgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120
 cctgggcagg gccttgagt gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggccctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaatggg 300
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

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

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

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

<400> 83
 gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttctt 300
 cctacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ct 342

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

<400> 84
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

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

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

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

<400> 89
 gatggtgtga tgacccaaac tccactcact ctgtcgggtga ccattggaca accagcgttc 60
 atctcttgca agtccagtca gagcctcttt aacactaatg gcaaaaccta tttgacttgg 120
 ttaattcaga ggccaggcca gtctccacag cgctgatct atctgggtgc caaattggac 180
 tctggcgtcc cggacagggt cagtggcagt ggctcagga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgcc tgcagagtag ccattttccg 300
 tttacgttcg gctcgggcac caagctggaa atcaaacgg 339

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

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

Arg

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

<400> 91
 gatgttgatgc taactcagtc tctgtccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtcagt 60
 ctttcctgca gggccagcca aaatattggc aactacctac actgggtatca acagaaatca 120
 catgagcttc caaggcttct catcaagtat gttcccagt ccatctctgg gatcccctcc 180
 aggttcagtg gcagtggatc agtcacagat ttcactctca atatcaacag tgtggagact 240
 gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtgacacct ggcctctcac gttcgggtgct 300
 gggaccaagc tggagctgaa acgggct 327

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

<400> 92
 Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Asn Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Thr
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Thr Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 97
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 98
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 99
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 100
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 100
 Lys Arg Met Gly Tyr
 1 5

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

<400> 101
 Lys Lys Met Asp Tyr
 1 5

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

<400> 102
 Ala Arg Met Asp Tyr
 1 5

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

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

<210> 104
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

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

<400> 105

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

<210> 106

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 106

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

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 107

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

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 108

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 109

Asn Ala Lys Ser Leu Ala Glu
 1 5

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 110

Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser
 1 5

<210> 111

<211> 7

<212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 112
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 113
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 114
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 115
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

RU 2 543 650 C2

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

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

<400> 118
Asp His Ser Ile His
1 5

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

<400> 119
Asn Tyr Val Ile His
1 5

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

<400> 120
Asp His Ala Leu His
1 5

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

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

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

<400> 122

RU 2 543 650 C2

Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu
1 5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

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

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

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

<400> 125
Ser Asn Gly Asn Thr
1 5

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

<400> 126
Glu Asn Ile Tyr Ser
1 5

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

<400> 127
Thr Ser Gly Tyr Ser
1 5

<210> 128
<211> 5
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 128

Gln Asp Ile Lys Ser
1 5

<210> 129

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 129

Gln Asn Ile Gly Asn
1 5

<210> 130

<211> 911

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Эндопептидаза с измененной нацеленностью

<400> 130

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

RU 2 543 650 C2

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

RU 2 543 650 C2

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

<210> 131

<211> 904

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Эндопептидаза с измененной нацеленностью

<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

RU 2 543 650 C2

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

RU 2 543 650 C2

<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> Mus musculus

<400> 134
 Ala Arg Met Gly Tyr
 1 5

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

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

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

<400> 136
 Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Trp Pro
 1 5 10 15
 Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
 20 25 30
 Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
 35 40 45
 Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
 50 55 60
 Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
 65 70 75 80
 Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
 85 90 95

RU 2 543 650 C2

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

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

<400> 137
 Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Trp Pro
 1 5 10 15
 Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
 20 25 30
 Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
 35 40 45
 Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
 50 55 60
 Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
 65 70 75 80
 Asp Leu Ala Tyr Leu 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

RU 2 543 650 C2

	130					135					140				
Ser	Leu	Arg	Val	Ser	Arg	Asn	Ala	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Cys	Ile	Trp
145						150				155					160
Ala	Leu	Ser	Ile	Ala	Met	Ala	Ser	Pro	Val	Ala	Tyr	His	Gln	Gly	Leu
				165					170					175	
Phe	His	Pro	Arg	Ala	Ser	Asn	Gln	Thr	Phe	Cys	Trp	Glu	Gln	Trp	Pro
			180					185					190		
Asp	Pro	Arg	His	Lys	Lys	Ala	Tyr	Val	Val	Cys	Thr	Phe	Val	Phe	Gly
		195					200					205			
Tyr	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Ile	Cys	Phe	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Leu
	210					215					220				
Asn	His	Leu	His	Lys	Lys	Leu	Lys	Asn	Met	Ser	Lys	Lys	Ser	Glu	Ala
225					230					235					240
Ser	Lys	Lys	Lys	Thr	Ala	Gln	Thr	Val	Leu	Val	Val	Val	Val	Val	Phe
				245					250					255	
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Pro	His	His	Ile	Ile	His	Leu	Trp	Ala	Glu	Phe
			260					265					270		
Gly	Val	Phe	Pro	Leu	Thr	Pro	Ala	Ser	Phe	Leu	Phe	Arg	Ile	Thr	Ala
		275					280					285			
His	Cys	Leu	Ala	Tyr	Ser	Asn	Ser	Ser	Val	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Ala
	290					295				300					
Phe	Leu	Ser	Glu	Asn	Phe	Arg	Lys	Ala	Tyr	Lys	Gln	Val	Phe	Lys	Cys
305				310						315					320
His	Ile	Arg	Lys	Asp	Ser	His	Leu	Ser	Asp	Thr	Lys	Glu	Ser	Lys	Ser
				325					330						335
Arg	Ile	Asp	Thr	Pro	Pro	Ser	Thr	Asn	Cys	Thr	His	Val			
			340					345							

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

	<400>	138													
Met	Glu	Leu	Ala	Val	Gly	Asn	Leu	Ser	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Cys	Pro
1				5					10					15	
Glu	Pro	Pro	Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Pro	Leu	Phe	Gly	Ile	Gly	Val	Glu
			20					25					30		
Asn	Phe	Val	Thr	Leu	Val	Val	Phe	Gly	Leu	Ile	Phe	Ala	Leu	Gly	Val
		35					40					45			
Leu	Gly	Asn	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Val	Leu	Ala	Arg	Ser	Lys	Pro	Gly
	50					55					60				
Lys	Pro	Arg	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu	Phe	Ile	Leu	Asn	Leu	Ser	Ile	Ala
65				70						75					80
Asp	Leu	Ala	Tyr	Leu	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	

RU 2 543 650 C2

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

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

<400> 139
 Met Asn Val Ser Gly Cys Pro Gly Ala Gly Asn Ala Ser Gln Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gly Trp His Pro Glu Ala Val Ile Val Pro Leu Leu Phe
 20 25 30
 Ala Leu Ile Phe Leu Val Gly Thr Val Gly Asn Thr Leu Val Leu Ala
 35 40 45
 Val Leu Leu Arg Gly Gly Gln Ala Val Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile
 50 55 60
 Leu Asn Leu Gly Val Ala Asp Leu Cys Phe Ile Leu Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80
 Phe Gln Ala Thr Ile Tyr Thr Leu Asp Gly Trp Val Phe Gly Ser Leu
 85 90 95
 Leu Cys Lys Ala Val His Phe Leu Ile Phe Leu Thr Met His Ala Ser
 100 105 110
 Ser Phe Thr Leu Ala Ala Val Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Arg
 115 120 125
 Tyr Pro Leu His Ser Arg Glu Leu Arg Thr Pro Arg Asn Ala Leu Ala
 130 135 140
 Ala Ile Gly Leu Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Phe Ser Gly Pro Tyr
 145 150 155 160
 Leu Ser Tyr Tyr Arg Gln Ser Gln Leu Ala Asn Leu Thr Val Cys His
 165 170 175
 Pro Ala Trp Ser Ala Pro Arg Arg Arg Ala Met Asp Ile Cys Thr Phe
 180 185 190
 Val Phe Ser Tyr Leu Leu Pro Val Leu Val Leu Gly Leu Thr Tyr Ala
 195 200 205
 Arg Thr Leu Arg Tyr Leu Trp Arg Ala Val Asp Pro Val Ala Ala Gly

RU 2 543 650 C2

```

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

```

```

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

```

```

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

```


RU 2 543 650 C2

Arg	Phe	Leu	Trp	Ala	Ala	Val	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	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> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 141
 atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gccccccgcc 60
 ccggagcccg ggccgctggt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtgggtgttc 120
 ggctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt gctggcgcgc 180
 agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tctcaacct gagcatcgcc 240
 gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300
 tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360
 gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420
 cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg ctgcatctgg 480
 gcgctgtoca ttgccatggc ctgcccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgcg 540
 gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctgcccacaa gaaggcctac 600
 gtgggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
 gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720
 tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtgggtggtg tgggtgtttg aatctcctgg 780
 ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgct gacgccggct 840
 tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaca gcaattcctc cgtgaatect 900
 atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
 cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaaagtgc aatagacacc 1020
 ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

<210> 142
 <211> 1050
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 142
 atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gccccccgcc 60
 ccggagcccg ggccgctggt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtgggtgttc 120
 ggctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt gctggcgcgc 180

```

agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca cctgttacgc gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcaactg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctgcgccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgcg 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctcgccacaa gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tgggtgtttg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttgag ttttcccgtg gacgcccggc 840
tccttcctct tcagaatcac cgcacctgc ctggcgtaca gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa gtaaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga                                1050

```

<210> 143

<211> 1050

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 143

```

atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctgtccgga gccccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctggt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg cgtgctgggc aacagcctag tgatcacctg gctggcgcgc 180
agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca cctgttacgc gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcaactg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctgcgccgtg gcctaccacc agggcctctt ccaccgcgcg 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctcgccacaa gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tgggtgtttg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttgag ttttcccgtg gacgcccggc 840
tccttcctct tcagaatcac cgcacctgc ctggcgtaca 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> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 144

```

atgaacgtct cgggctgccc aggggcccgg aacgcgagcc aggcgggcg cgggggaggc 60
tggcaccocg aggcggtcat cgtgcccctg ctcttcgcgc tcattctcct cgtgggcacc 120
gtgggcaaca cgctggtgct ggcggtgctg ctgcgcccgc gccaggcggc cagcactacc 180
aacctgttca tccttaacct gggcgtggcc gacctgtgtt tcattctgtg ctgcgtgccc 240
ttccaggcca ccatctacac cctggacggc tgggtgttcg gctcgtgctg gtgcaaggcg 300
gtgcacttcc tcattctcct caccatgcac gccagcagct tcacgctggc cgcctctcc 360
ctggacaggt atctggccat ccgctaccgc ctgcactccc gcgagctgcg cagcctcga 420
aacgcgctgg cagccatcgg gctcatctgg gggctgtcgc tgctcttctc cgggccctac 480

```

```

ctgagctact accgccagtc gcagctggcc aacctgaccg tgtgccatcc cgcgtggagc 540
gccctcggcc gccgcgccat ggacatctgc accttcgtct tcagctacct gcttcctgtg 600
ctggttctcg gcctgacctc cgcgcgcacc ttgcgctacc tctggcgcgc cgtcgaccgc 660
gtggccgcgg gctcgggtgc cgggcgcgcc aagcgcgaag tgacacgcac gatcctcatc 720
gtggccgcgc tcttctgcct ctgctggatg cccaccacg cgctcatcct ctgctgtgtg 780
ttcggccagt tcccgcctac gcgcgccact tatgcgcttc gcacctcttc gcacctggtc 840
tcctacgcca actcctgcgt caacccccatc gtttacgcgc tggctctcaa gcaacttcgc 900
aaaggcttcc gcacgatctg cgcgggcctg ctgggcctg ccccaggccg agcctcgggc 960
cgtgtgtgcg ctgcgcgcgc gggcaccac agtggcagcg tgttgagcg caggtccagc 1020
gacctgttgc acatgagcga ggcggcggg gcccttcgtc cctgccccgc cgcttcccag 1080
ccatgcatcc tcgagccctg tcttgccccg tctggcagc gcccaaaggc aggcgacagc 1140
atcctgacgg ttgatgtggc ctga 1164

```

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

```

<400> 145
atggctgatg cccagaacat ttcactggac agcccagga gtgtgggggc cgtggcagtg 60
cctgtgggtct ttgccctaat cttcctgctg ggacagtggt gcaatgggct ggtgctggca 120
gtgctcctgc agcctggccc gactgcctgg caggagcctg gcagcaccac ggacctgttc 180
atcctcaacc tggcgggtggc tgacctctgc ttcactcctg gctgcgtgcc cttccaggcc 240
accatctaca cgctggatgc ctggctcttt ggggccctcg tctgcaaggc cgtgcacctg 300
ctcatctacc tcaccatgta cgcagcagc tttacgctgg ctgctgtctc cgtggacagg 360
tacctggccg tgcggcacc gctgcgctcg cgcgcctgc gcagcgcgc taacgccgcg 420
gccgcagtg ggctgggtgtg gctgctggcg gcgctcttct cggcgcctta cctcagctac 480
tacggcaccg tgcgctacgg cgcgctggag ctctgcgtgc ccgctggga ggacgcgcgc 540
cgcgcgcgcc tggacgtggc caccttcgct gccggctacc tgctgcccgt ggctgtggtg 600
agcctggcct acgggcgcac gctgcgcttc ctgtgggccc ccgtgggtcc cgcgggcgcg 660
gcggcggccg aggcgcggcg gagggcgacg ggccgcgcgg ggcgcccat gctggcggtg 720
gccgcgctct acgcgctctg ctggggctcc caccacgcgc tcatcctgtg cttctggtac 780
ggcgccttcg ccttcagccc ggccacctac gcctgcgcgc tggcctcaca ctgctggcc 840
tacgccaact cctgcctcaa cccgctcgtc tacgcgctcg cctcgcgcca cttccgcgcg 900
cgcttccgcc gcctgtggcc gtgcggccgc gcagcgcgcc accgtgcccg ccgcgccttg 960
cgtcgcgtcc gcccgcgctc ctgcggccca cccgctgcgc ccggagacgc ccggcctagc 1020
gggaggctgc tggctggtgg cggccagggc ccggagccca gggaggacc cgtccacggc 1080
ggagaggctg cccgaggacc ggaataa 1107

```

<210> 146
 <211> 889
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Фрагмент LFn/A

<221> VARIANT
 <222> (453)...(455)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

```

<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

```

RU 2 543 650 C2

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

RU 2 543 650 C2

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

<210> 147

<211> 2661

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Фрагмент Lhн/А

<400> 147

```

atgccgttcg taaacaaca gttcaactat aaagaccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
tatatcaaaa tcccgaatgc gggtcfaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
aaaatttggg tgatcccggg ggcgcatagc ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
ccaccgctcg aggctaaaca ggtcccggtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
gacaatgaaa aggacaacta cctgaaaggt gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
acagatctcg gtcgcatggt gctgacttct attgtgcgcg gcattccggt ttgggggtgt 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
gatgggagct accgggtccg agagcttaac ctcgtaatca ttggcccagag cgcggatatt 480
atccaattcg aatgtaaate ttttgggcat gaagtcctga atctgacgcg gaatggctat 540
ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
gaagttgata cgaaccctct ttttaggcgcg ggaaaattcg cgacggaccc agcggtgacc 660
ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgtatg gaatcgccat taaccogaac 720
cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgatg tacgagatgt cgggcttaga agtgtccttt 780
gaagaactgc gcacgtttgg cggtcgatg gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaac 840
gaatttcggc tgtactatta caataaattc caataatga aaaacgtttt caaagaaaaa 960
aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaaa 960
tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggtc 1080
ttgaatcgga aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
ttaacggcc agaaccacca aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggtg ttatcaccag caaaaccaa 1320
tccttgggog gtgggtggcg aaacctgtac ttccagggcg gtggcggtgg tgataagggc 1380
tataacaagg ctttcaatga tttatgcatc aaggtgaaca actgggactt gtttttctct 1440
ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag aggaaattac ttccgatacc 1500
aacatcgaag cagcgggaaga gaatattagt ctagatctta ttcaacaata ttacctgacc 1560
ttaatttttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcatc 1620
ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgctttccta atggaaagaa atatgaattg 1680
gacaaataca ccatgttcca ctatctccgc gcgcaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
attgctctga ccaattcggg aaacgaagcc cttttaaate cttcgcgtgt gtacaccttt 1800
ttctcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gtttttggga 1860
tgggtggaac aactggtata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920
aaaattgccc atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgcaactgaa cattgggtaac 1980
atgctgtata aagatgattt tgtgggocgc ctgatctttt caggcgctgt tatcctgctg 2040
gaatttatcc cggaaatcgc cattccagta ctccggtacct ttgcgctggt gtcctatatac 2100
gcaaacaaag ttttgactgt ccagacgatc gacaacgcgc tcagtaaacy taacgaaaaa 2160
tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaaa caccagatt 2220
gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280
attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caacttcaac 2340
atcgacgact tatcttcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat taatattaac 2400
aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacgggtgtg 2460
aaacgtctgg aagacttcga tgcaagcctt aaagatgcc ttctgaagta tatttacgat 2520
aatcgcgga ctcttattgg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580
agtacagaca tcccttttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgcct gctgtccacg 2640
caccatcacc atcaccacta a

```

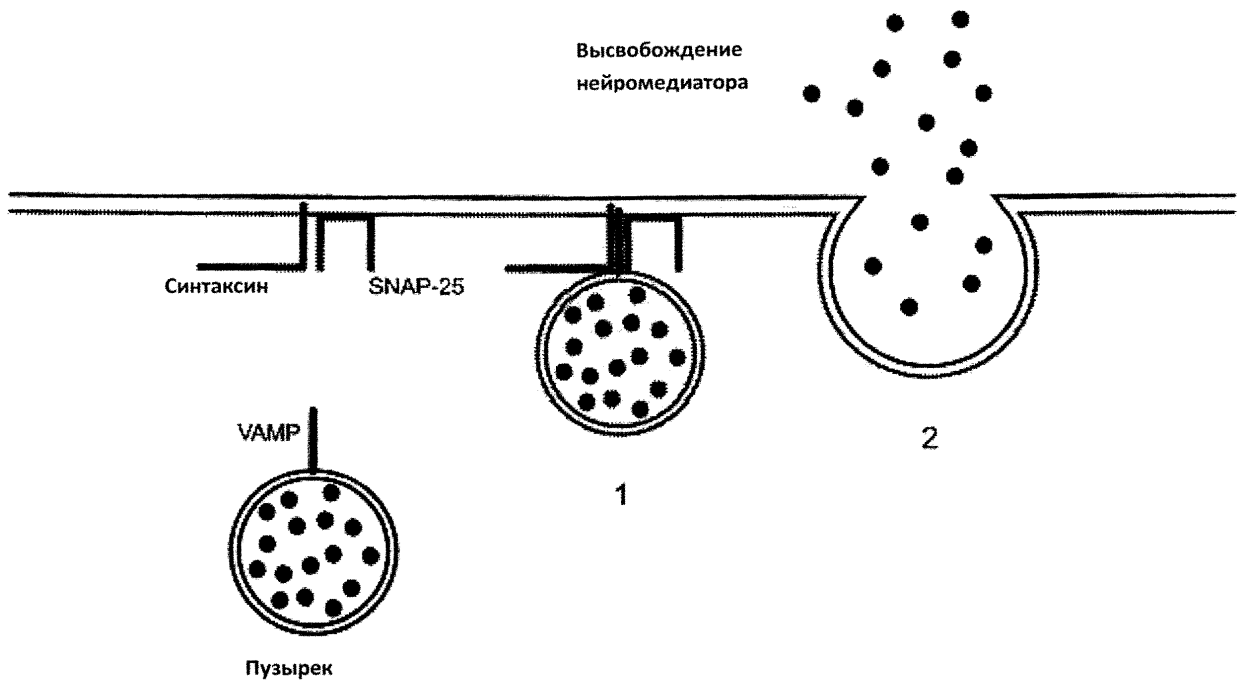
<210> 148

<211> 20

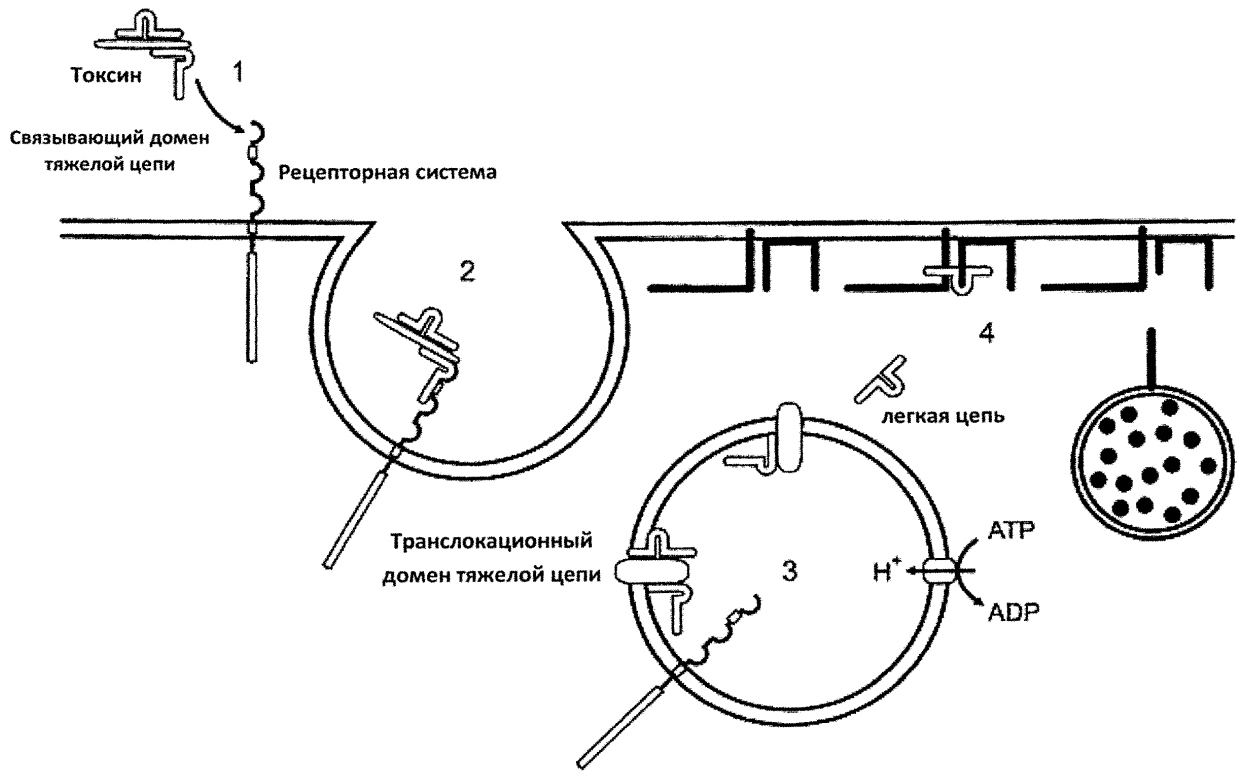
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>		
<223>	Прямой олигонуклеотидный праймер ORL-1	
<400>	148	
	cactcggctg gtgctggtgg	20
<210>	149	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Обратный олигонуклеотидный праймер ORL-1	
<400>	149	
	aatggссасg gcagtctcgc	20
<210>	150	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Прямой олигонуклеотидный праймер рецептора Галанина 1	
<400>	150	
	ссссатсатg tсатссасст	20
<210>	151	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Обратный олигонуклеотидный праймер рецептора Галанина	
<400>	151	
	atggggттса ссgaggagтт	20
<210>	152	
<211>	18	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Прямой олигонуклеотидный праймер рецептора Галанина 2	
<400>	152	
	сатсгtggcg gtgctttt	18
<210>	153	
<211>	18	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Обратный олигонуклеотидный праймер рецептора Галанина 2	
<400>	153	
	agсgggaagс гассааас	18

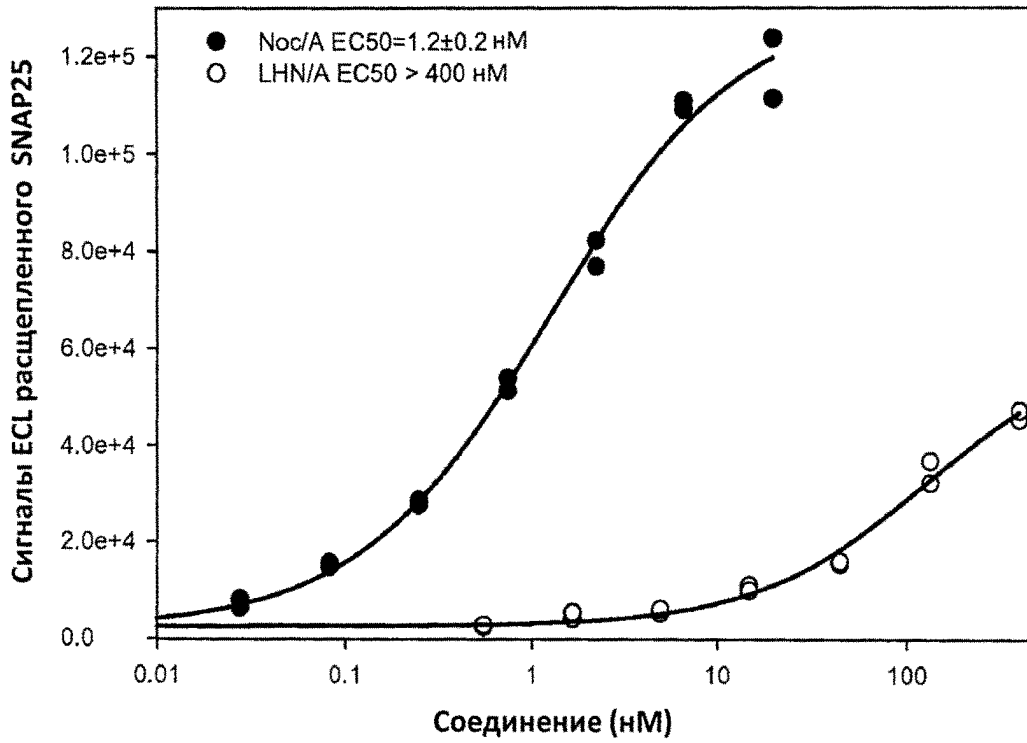


ФИГ. 1А



ФИГ. 1Б

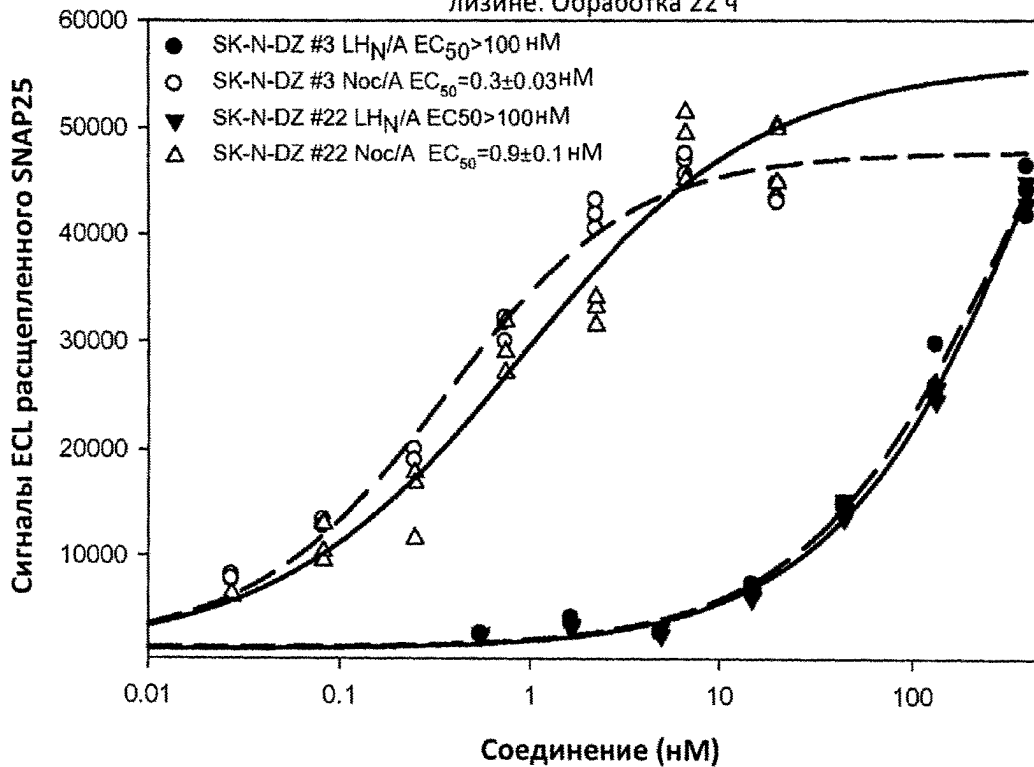
Клон № 6 AGN P33 hORL-1



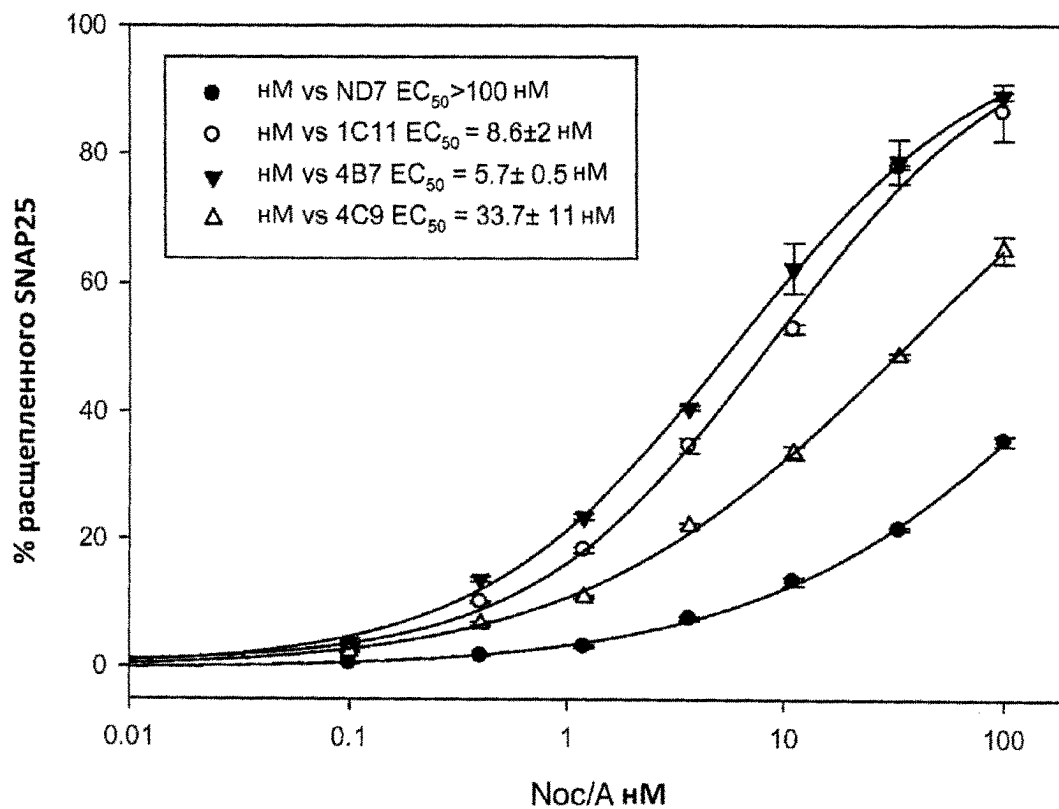
ФИГ. 2

Noc/A vs. LHN/A

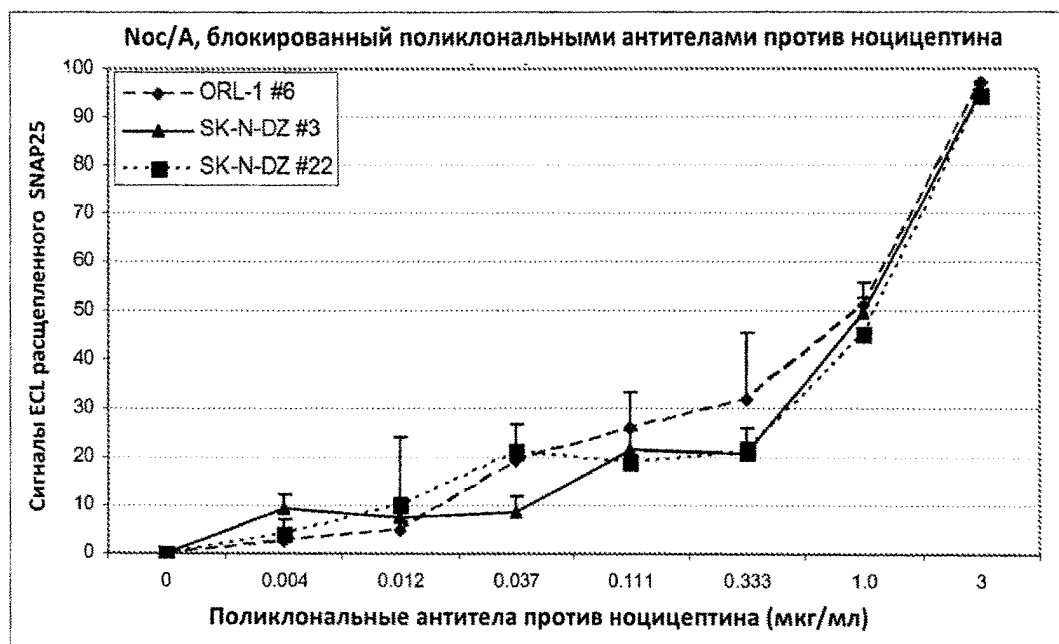
SK-N-DZ № 3 и № 22 @ 150 тыс. клеток/лунку в СБС на поли-D-лизине. Обработка 22 ч



ФИГ. 3

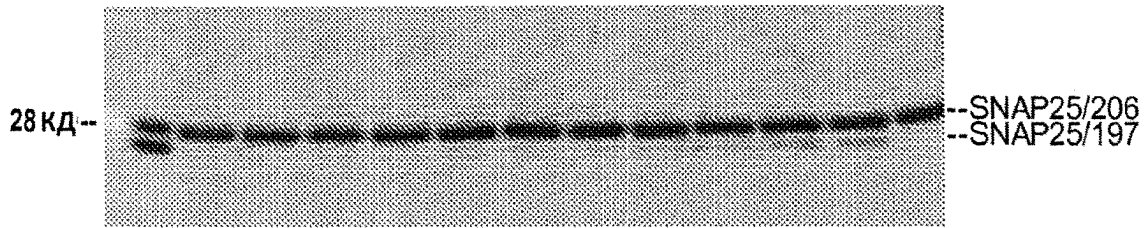
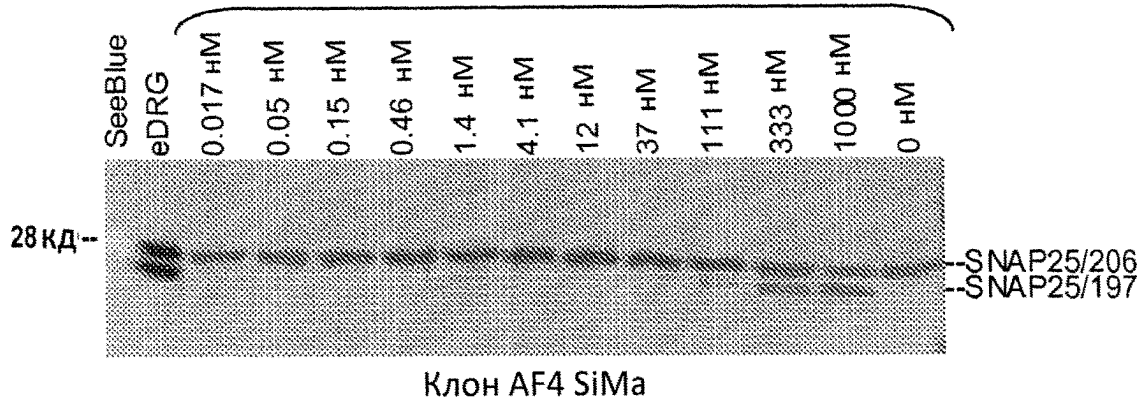


ФИГ. 4

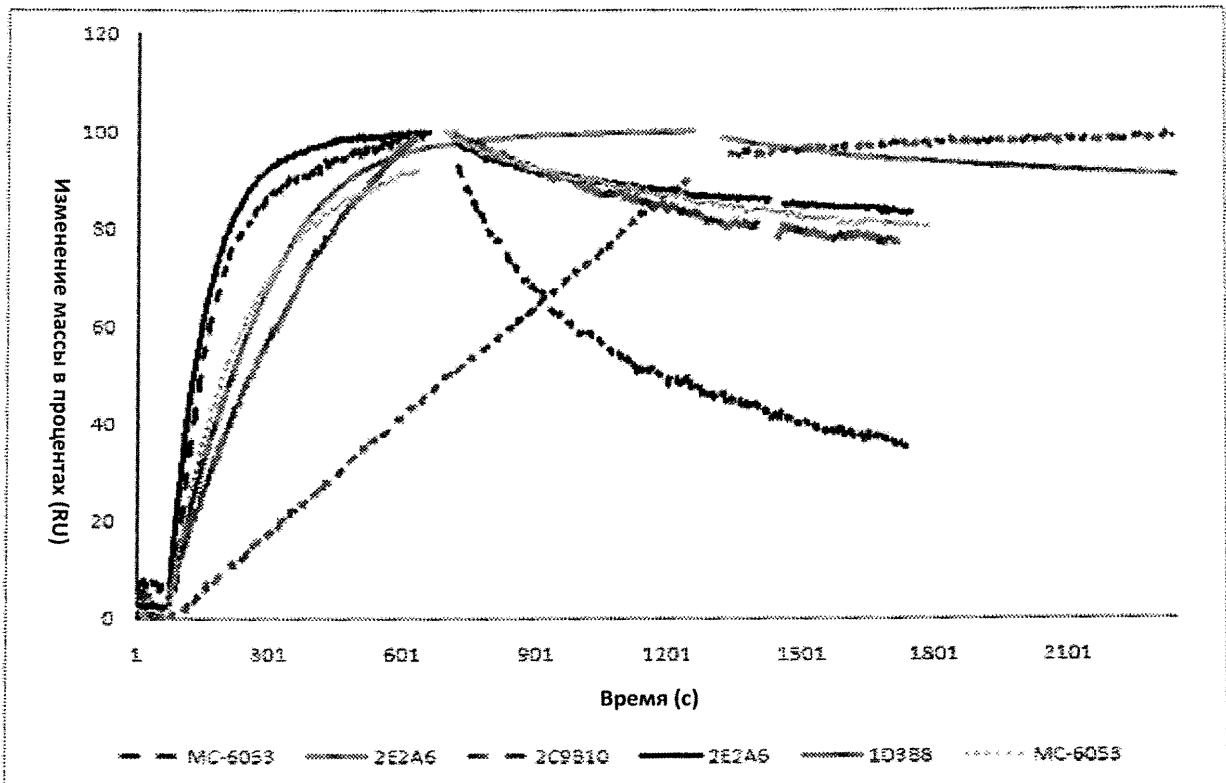


ФИГ. 5

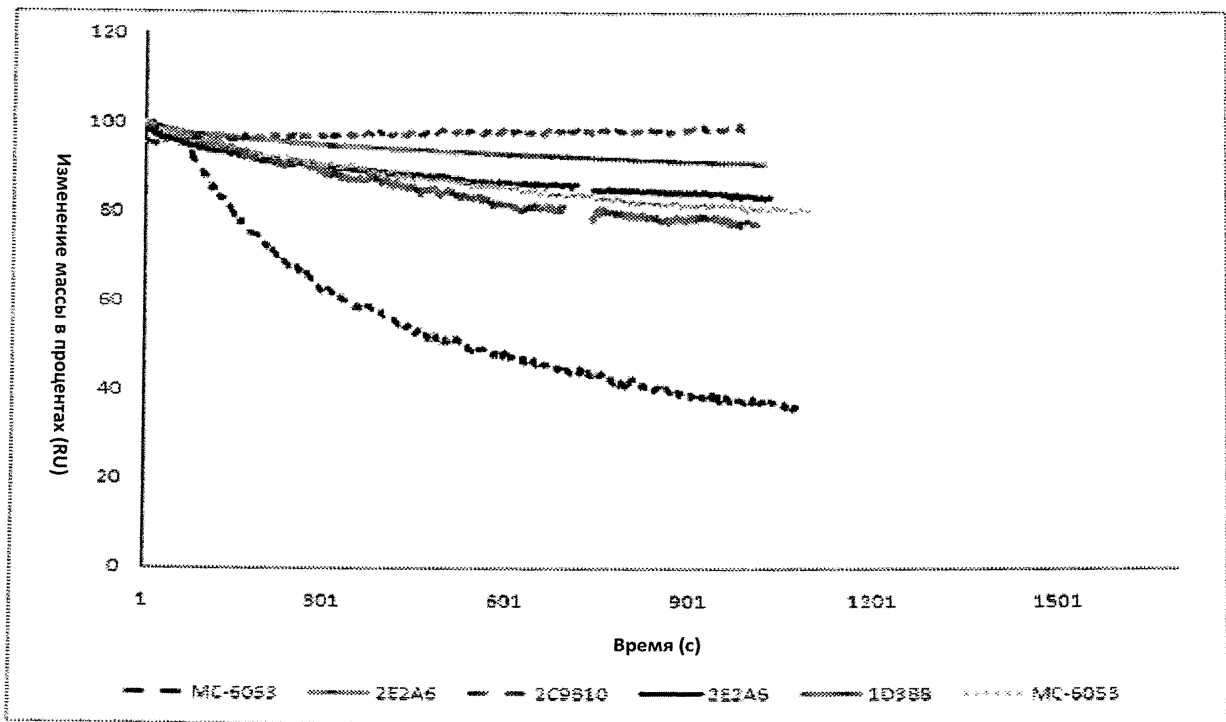
Обработка Дун/А



PC-12
ФИГ. 6



ФИГ. 7А



ФИГ. 7Б