(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0020444**

(51)[7] **G01N 33/50**, C12Q 1/37

(13) **B**

(21) 1-2011-02741
(22) 12.03.2010
(86) PCT/US2010/027244 12.03.2010
(87) WO2010/105236 16.09.2010
(30) 61/160,217 13.03.2009 US
(45) 25.02.2019 371
(43) 26.12.2011 285
(73) Allergan, Inc. (US)
2525 Dupont Drive, Irvine, CA 92612, United States of America
(72) WANG, Joanne (US), ZHU, Hong (US), HODGES, D., Diane (US), FERNANDEZ-SALAS, Ester (US)
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN HOẠT TÍNH ENDOPEPTIDAZA TÁI HƯỚNG ĐÍCH VÀ KHÁNG THỂ ALPHA-SNAP-25 DÙNG TRONG PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25, phương pháp tạo ra kháng thể α-SNAP-25 mà liên kết một cách chọn lọc với epitop chứa SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop chứa SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, phương pháp phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích và phương pháp phát hiện kháng thể trung hòa α-endopeptitdaza tái hướng đích.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25, phương pháp tạo ra kháng thể α-SNAP-25 mà liên kết một cách chọn lọc với epitop chứa SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop chứa SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, phương pháp phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích và phương pháp phát hiện kháng thể trung hòa α-endopeptitdaza tái hướng đích.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khả năng ức chế việc truyền tín hiệu thần kinh của các độc tố Clostridium, chẳng hạn, ví dụ, các độc tố gây độc thần kinh Botulinum (Botulinum neurotoxin: BoNT), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F và BoNT/G và độc tố gây độc thần kinh Tetanus (Tetanus neurotoxin: TeNT), đã được khai thác ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực mỹ phẩm và điều trị bệnh, ví dụ, xem: William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin (Slack, Inc., 2004). Các độc tố Clostridium đã được thương mại hóa như các dược phẩm gồm có: các chế phẩm BoNT/A, chẳng hạn, ví dụ, BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, England), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Đức), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, Hàn Quốc), BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, Trung Quốc); và các chế phẩm BoNT/B, chẳng hạn, ví dụ, MYOBLOC®/NEUROBLOC® (Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA). Lấy ví dụ, ở một số quốc gia BOTOX® hiện đã được phê chuẩn để chỉ định cho các bệnh sau: nghẹt van thực quản, co cứng cơ ở người trưởng thành, bệnh nứt hậu môn, đau lưng, chứng co giật mí mắt, chứng nghiến răng, bệnh loạn trương lực cơ cổ, bệnh run vô căn, nếp nhăn giữa hai cung mày hoặc tăng động cơ mặt, đau đầu, co giật nửa mặt, chứng tăng động bàng quang, tăng tiết mồ hôi, chứng bại não vị thành

niên, đa xơ cứng, rối loạn giật cơ, co giật cơ môi mũi, co cứng cơ thanh quản cục bộ, mắt lác và rối loạn dây thần kinh VII.

Việc điều trị bằng độc tố Clostridium ức chế các chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh và giải phóng peptit thần kinh bằng cách phá vỡ quá trình xuất bào vẫn được sử dụng để tiết các chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh và các peptit thần kinh này vào khe khớp thần kinh. Có nhu cầu lớn trong công nghiệp dược phẩm nhằm mở rộng việc sử dụng các liệu pháp điều trị bằng độc tố Clostridium không chỉ ở các ứng dụng làm giãn cơ của chúng hiện đang được dùng để điều trị bệnh gây ra bởi thần kinh cảm giác, chẳng hạn, ví dụ, nhiều loại bệnh đau mãn tính, viêm thần kinh và các rối loạn niệu sinh dục, mà còn ở các bệnh rối loạn khác, chẳng hạn, ví dụ, viêm tụy. Một hướng tiếp cận hiện đang khai thác là mở rộng các liệu pháp điều trị bệnh dựa trên độc tố Clostridium bằng cách cải biến độc tố Clostridium sao cho độc tố được cải biến này có khả năng thay đổi tế bào đích, hướng đến tế bào thần kinh hoặc tế bào không phải là tế bào thần kinh đang quan tâm. Các phân tử được gọi là endopeptidaza tái hướng đích hoặc là các protein điều hòa quá trình xuất bào dạng nang hướng đích (Targeted Vesicular Exocytosis Modulator Protein: TVEMP) này có hoạt tính ức chế xuất bào của chúng bằng cách sử dụng thụ thể đích có trên tế bào thần kinh hoặc tế bào không là tế bào thần kinh đích đang quan tâm. Khả năng tái hướng đích này thu được bằng cách thay thế miền liên kết của độc tố Clostridium có trong tự nhiên bằng miền đích thể hiện hoạt tính liên kết chọn lọc đối với các thụ thể không phải của độc tố Clostridium có mặt trên tế bào đích thần kinh hoặc không phải tế bào thần kinh đang quan tâm. Những cải biến trong miền liên kết như vậy sẽ làm cho phân tử có thể liên kết một cách chọn lọc với thụ thể không phải của độc tố Clostridium xuất hiện trên tế bào đích. Endopeptidaza tái hướng đích này có khả năng liên kết với thụ thể đích, đi vào tế bào chất và gây ra tác động thủy phân protein trên phức SNARE của tế bào đích thần kinh hoặc không phải tế bào thần kinh đang quan tâm.

Một nhóm endopeptidaza tái hướng đích bao gồm các phân tử có vùng đích opioit. Các endopeptidaza tái hướng đích opioit này chứa miền đích opioit, miền chuyển dịch độc tố Clostridium và miền có hoạt tính enzym của độc tố Clostridium. Các ví dụ không giới hạn về endopeptidaza tái hướng đích opioit hoặc các opioit-TVEMP được mô tả trong, ví dụ: Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, patent Mỹ số 5,989,545; J.

Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, patent Mỹ số 7,132,259; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, patent Mỹ số 7,244,437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, patent Mỹ số 7,413,742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, patent Mỹ số 7,415,338; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, patent Mỹ số 7,514,088; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2008/0064092; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2009/0035822; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2009/0048431; Keith A. Foster, *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2009/0162341; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, công bố đơn quốc tế số WO 2005/023309; và Lance E. Steward, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells*, công bố đơn quốc tế số WO 2008/008805; mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Sự khác biệt chủ yếu giữa endopeptidaza tái hướng đích và các độc tố Clostridium là do endopeptidaza tái hướng đích thường không hướng đến các tế bào thần kinh vận động, tính gây chết khi sử dụng endopeptidaza tái hướng đích quá liều cho động vật có vú về cơ bản được giảm thiểu, nếu không muốn nói là được loại bỏ hoàn toàn. Ví dụ, endopeptidaza tái hướng đích opioit có thể được sử dụng với liều lượng điều trị hiệu quả gấp 10.000 lần mới cho thấy bằng chứng gây chết người và tính gây chết này là do tính khuyếch tán thụ động của phân tử này chứ không phải do quá trình nhiễm độc. Do đó, với tất cả các mục đích sử dụng, endopeptidaza tái hướng đích là các phân tử không gây chết người. Mặc dù tính chất không gây chết người này rất có lợi đối với việc điều trị, nhưng có một vấn đề phát sinh trong quá trình sản xuất bởi vì thử nghiệm hoạt tính chuẩn được sử dụng để sản xuất các chất sinh học dựa trên độc tố Clostridium là thử nghiệm sinh học LD_{50} trên chuột, một phương pháp kiểm tra liều lượng gây chết, S. S. Arnon và cộng sự, JAMA 285: 1059-1070 (2001). Hiện tại, việc thử nghiệm sinh học LD_{50} đang được các hãng sản xuất dược phẩm sử dụng để biểu hiện hiệu lực của các chế phẩm độc tố Clostridium của họ. Trên thực tế, các đơn vị hoạt tính của độc tố Clostridium chính là các đơn vị LD_{50} trên chuột. Tuy nhiên, do

endopeptidaza tái hướng đích về cơ bản không gây chết người, nên không thể sử dụng thử nghiệm sinh học LD_{50} trên chuột để đánh giá hiệu lực của các phân tử này. Vì vậy, thử nghiệm hoạt tính đơn giản, tin cậy, hợp lệ và được cơ quan kiểm duyệt của chính phủ chấp nhận có thể đánh giá được toàn bộ các bước cần thiết trong việc hấp thu endopeptidaza tái hướng đích sẽ rất có giá trị.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm, tế bào và phương pháp để thử nghiệm hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích hữu dụng trong các ngành công nghiệp khác nhau, chẳng hạn, ví dụ, công nghiệp dược và công nghiệp thực phẩm và sáng chế cũng đề cập đến các ưu điểm có liên quan. Các chế phẩm, tế bào và phương pháp này không sử dụng động vật hoặc mô sống lấy từ động vật sống, nhưng vẫn có thể đánh giá được tất cả các bước cần thiết đối với hoạt động của endopeptidaza tái hướng đích.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện sơ đồ mô hình hiện tại của quá trình giải phóng chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh và nhiễm độc độc tố Clostridium trong tế bào thần kinh trung ương và ngoại biên. FIG. 1A thể hiện sơ đồ của cơ chế giải phóng chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh của tế bào thần kinh trung ương và ngoại biên. Quá trình giải phóng này có thể được mô tả là bao gồm hai bước: 1) kết hợp thể nang, tại đó protein SNARE liên kết thể nang của thể nang chứa các phân tử chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh kết hợp với các protein SNARE liên kết màng nằm trên màng tế bào chất; và 2) giải phóng chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh, trong đó thể nang dung hợp với màng tế bào chất và các phân tử chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh được xuất bào. FIG. 1B thể hiện sơ đồ cơ chế nhiễm độc đối với hoạt tính độc tố uốn ván (Tetanus) và độc tố botulinum trong tế bào thần kinh trung ương và ngoại biên. Quá trình gây độc này có thể được mô tả là bao gồm bốn bước: 1) liên kết với thụ thể, trong đó độc tố Clostridium liên kết với phức thụ thể Clostridium và bắt đầu quá trình nhiễm độc; 2) nội hóa phức hợp, sau khi liên kết với độc tố, thể nang chứa phức hệ độc tố/thụ thể xâm nhập vào tế bào; 3) chuyển dịch chuỗi nhẹ, tại đó được cho là xảy ra một loạt các hiện tượng, bao gồm thay đổi độ pH bên trong thể nang đó, hình thành một khe hổng chứa vùng H_N trong chuỗi nặng của độc tố Clostridium, phân tách chuỗi nhẹ của độc tố Clostridium ra khỏi chuỗi nặng, và giải phóng chuỗi nhẹ và 4) cải biến đích bằng enzym, tại đó chuỗi nhẹ

của độc tố Clostridium phân cắt phân giải protein các cơ chất đích SNARE của nó, chẳng hạn, ví dụ, SNAP-25, VAMP hoặc Syntaxin, nhờ đó ngăn chặn quá trình kết hợp thể nang và giải phóng chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh.

FIG. 2 thể hiện sự đáp ứng liều dùng đầy đủ đối với endopeptidaza tái hướng đích Noc/A trong dòng tế bào ORL-1dòng #6 biểu hiện quá mức ORL-1. Việc hấp thu đặc hiệu Noc/A có thể được quan sát trong dòng tế bào ORL-1dòng #6 biểu hiện quá mức ORL-1. Việc xử lý bằng Noc/A (LHN/A cộng với biến thể nociceptin liên kết phối tử) và LH_N/A (LC/A và H_N không có vùng liên kết bất kỳ) được tiến hành trên dòng #6 của dòng tế bào ổn định ORL-1 trong ELISA ECL đối với SNAP-25_{197} bị phân cắt, đã chứng minh rằng việc hấp thu Noc/A là đặc hiệu trong dòng tế bào này. Dòng tế bào này cũng thể hiện tính mẫn cảm cao đối với Noc/A có EC_{50} bằng 1,2nM.

FIG. 3 thể hiện sự đáp ứng liều dùng đầy đủ đối với Noc/A trong các dòng #3 và #22 thu được từ tế bào đơn lẻ SK-N-DZ. Sự hấp thu Noc/A trên dòng #3 và #22 của SK-N-DZ là đặc hiệu khi so sánh với LH_N/A (số lần thí nghiệm độc lập n=4). Tế bào này được dàn trên các đĩa poly-D-lysin 96 lỗ trong RPMI SFM +N2+B27+NGF. Việc xử lý bằng các hợp chất trong thời gian 22 giờ. ELISA ECL đối với SNAP-25_{197} bị phân cắt đã chứng minh rằng việc hấp thu Noc/A là đặc hiệu trong các dòng tế bào này. Các dòng tế bào này cũng thể hiện tính nhạy cao đối với Noc/A có EC_{50} là 0,3nM với dòng #3 và EC_{50} là 0,9nM với dòng #22.

FIG. 4 thể hiện các kết quả phân tích ELISA kiểu kẹp ECL từ các dòng 1C11, 4B7 và 4C9 của ORL1 ND7 được xử lý bằng endopeptidaza Noc/A tái hướng đích. Các dòng ND7 và ORL1 ND7 gốc được xử lý trong thời gian 24 giờ bằng Noc/A sau đó ủ tiếp 2 ngày. EC_{50} của ND7 gốc không được tính toán do chỉ số này chỉ đạt khoảng 50% độ phân cắt SNAP-25_{197}. Các dòng 4B7 và 1C11 đạt đến khoảng nhiều hơn 80% độ phân cắt SNAP-25_{197}. Các giá trị EC_{50} được tính toán là 5,7±0,5; 6,7±1 và 8,6±2nM, một cách tương ứng.

FIG. 5 thể hiện các kháng thể đa dòng kháng nociceptin có thể phong bế sự hấp thu endopeptidaza Noc/A tái hướng đích trong các dòng tế bào dòng #3, dòng #22 của SK-N-DZ và dòng #6 của AGN P33 ORL-1. Các tế bào này được dàn trên các đĩa poly-D-lysin 96 lỗ trong RPMI SFM+N2+B27+NGF và được xử lý trong thời gian 22 giờ trong môi trường không có huyết thanh chứa các kháng thể đa dòng kháng nociceptin với các nồng độ pha loãng khác nhau (từ 0 đến 3µg/mL) trong Noc/A 1nM.

FIG. 6 thể hiện các tế bào từ dòng AF4 của SiMa và dòng tế bào đã thiết lập PC-12 được xử lý bằng endopeptidaza Dyn/A tái hướng đích với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,017nM đến 1μM như được mô tả trong ảnh thẩm tách Western. Sự hấp thu phụ thuộc liều lượng có thể được quan sát đối với cả hai dòng tế bào này.

FIG. 7 thể hiện đường cong BIAcore SPR được chuẩn hóa của 7,8nM các kháng thể 2E2A6, 1D3B8, 3C1A5 và 2C9B10 và MC-6050 và MC-6053 thương mại. FIG. 7A thể hiện dữ liệu được chuẩn hóa theo hằng số kết hợp của từng kháng thể. FIG. 7B thể hiện dữ liệu được chuẩn hóa theo hằng số phân ly của từng kháng thể.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các thử nghiệm mới để xác định có hoặc không có endopeptidaza có hoạt tính tái hướng đích trong mẫu và để xác định hoạt tính/hiệu lực của endopeptidaza tái hướng đích. Các thử nghiệm mới dựa trên tế bào được bộc lộ trong sáng chế dựa trên tế bào, các chất phản ứng và phương pháp phát hiện cho phép thử nghiệm mà cho phép thử nghiệm này phát hiện được lượng endopeptidaza tái hướng đích ở mức nanomol trong mẫu. Các thử nghiệm này dựa trên tế bào được bộc lộ trong sáng chế thích hợp để phân tích nhiều chức năng của endopeptidaza tái hướng đích, cụ thể là, endopeptidaza tái hướng đích liên kết với thụ thể bề mặt tế bào, nội hóa phức endopeptidaza-thụ thể, chuyển dịch vào trong tế bào chất, vùng có hoạt tính enzyme phân cắt của cơ chất. Như được đề cập cụ thể hơn dưới đây, các chế phẩm và phương pháp mới này có thể được sử dụng để phân tích các mẫu thô và mẫu khối lượng lớn cũng như các sản phẩm endopeptidaza tái hướng đích hai chuỗi có độ tinh sạch cao và sản phẩm endopeptidaza tái hướng đích được điều chế và hơn nữa có thể điều chỉnh theo các định dạng thử nghiệm tự động có hiệu suất cao.

Vì vậy, theo một khía cạnh được mô tả, sáng chế đề cập đến các chế phẩm gây ra đáp ứng miễn dịch để tạo ra các kháng thể α-SNAP-25 mà các kháng thể này có thể liên kết một cách chọn lọc với epitop chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Các chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch có thể chứa chất phù trợ và chế phẩm kích thích miễn dịch bao gồm kháng nguyên SNAP-25, chất mang liên kết với kháng nguyên SNAP-25 hoặc chất mang liên kết với vùng đệm linh động được liên kết với kháng nguyên SNAP-25, trong đó tác nhân liên kết linh động này xen vào giữa kháng nguyên SNAP-25 và chất mang. Được hình dung là kháng nguyên SNAP-25 bất kỳ và

tất cả kháng nguyên SNAP-25 kích hoạt đáp ứng miễn dịch mà tạo ra kháng thể α-SNAP-25 mà có thể liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể là hữu ích làm kháng nguyên SNAP-25, gồm, mà không chỉ giới hạn ở, kháng nguyên SNAP-25 có nguồn gốc từ SNAP-25 có trong tự nhiên, kháng nguyên SNAP-25 có nguồn gốc từ SNAP-25 không có trong tự nhiên và kháng nguyên SNAP-25 chứa mảnh phản ứng miễn dịch của SNAP-25, SNAP-25 từ SNAP-25 có trong tự nhiên hoặc SNAP-25 không có trong tự nhiên. Các kháng nguyên SNAP-25 hữu ích để sản xuất các kháng thể α-SNAP-25 mà có thể liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A gồm, mà không chỉ giới hạn ở, các kháng nguyên SNAP-25 chứa peptit SNAP-25 có glutamin ở đầu C được carboxyl hóa liên kết với peptit mang, gồm, mà không chỉ giới hạn ở, peptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 38. Các chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch khác hữu ích để tạo ra các kháng thể SNAP-25 mà có thể liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A này gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch chứa chất mang được liên kết với tác nhân liên kết linh động được liên kết với glutamin ở đầu C được carboxyl hóa của kháng nguyên SNAP-25, trong đó tác nhân liên kết linh động này xen vào giữa kháng nguyên SNAP-25 và chất mang. Được hình dung là chất phù trợ bất kỳ và tất cả các chất phù trợ có thể là hữu ích trong chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch như vậy, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), monometoxypolyetylen glycol (mPEG), rượu polyvinyl (PVA), chất phù trợ Freund hoàn chỉnh và không hoàn chỉnh.

Theo một khía cạnh khác được mô tả, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Các khía cạnh của phương pháp này bao gồm các bước: (a) sử dụng chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 được bộc lộ theo sáng chế cho động vật; (b) thu từ động vật này mẫu chứa kháng thể α-SNAP-25 hoặc tế bào sản sinh ra kháng thể α-SNAP-25; và (c) phân lập kháng thể α-SNAP-25 từ mẫu này. Các phương pháp được bộc lộ là hữu dụng để sản xuất các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với epitop chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl

tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A hoặc các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với epitop chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế xuất các kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop chứa SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Các kháng thể α-SNAP-25 này bao gồm cả kháng thể có trong tự nhiên và kháng thể không có trong tự nhiên cũng như các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng hoặc kháng thể α-SNAP-25 đa dòng. Các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng hữu ích làm các kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng được tạo ra từ các dòng tế bào lai 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 và 3C3E2.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất các phương pháp phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích trên cơ sở miễn dịch. Các khía cạnh của phương pháp này bao gồm các bước: (a) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập với mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích, trong đó tế bào từ dòng tế bào được thiết lập này là mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bởi endopeptidaza tái hướng đích; (b) phân lập từ tế bào đã xử lý này thành phần SNAP-25 bao gồm sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; (c) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25 được bộc lộ theo sáng chế; và (d) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; trong đó việc phát hiện phức kháng nguyên-kháng thể biểu lộ hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích. Kháng thể α-SNAP-25 theo bước (c) có thể tùy ý được liên kết với giá thể pha rắn.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất các phương pháp phát hiện hoạt tính opioit-TVEMP trên cơ sở miễn dịch. Các khía cạnh của phương pháp này bao gồm các bước: (a) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập này có thể

hấp thu endopeptidaza tái hướng đích; (b) phân lập từ tế bào đã xử lý này thành phần SNAP-25 chứa SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; (c) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25 được bộc lộ theo sáng chế; và (d) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; trong đó việc phát hiện phức kháng nguyên-kháng thể biểu lộ hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích. Kháng thể α-SNAP-25 trong bước (c) có thể tùy ý được liên kết với giá thể pha rắn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp phát hiện tính kháng miễn dịch của endopeptidaza tái hướng đích ở động vật có vú. Các khía cạnh của phương pháp này bao gồm các bước: (a) bổ sung endopeptidaza tái hướng đích vào mẫu thử nghiệm thu được từ động vật có vú được thử nghiệm sự có mặt hoặc không có mặt của các kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; (b) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu thử nghiệm, trong đó tế bào từ dòng tế bào được thiết lập này là mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích; (c) phân lập từ các tế bào đã xử lý này thành phần SNAP-25 chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; (d) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25 được bộc lộ theo sáng chế; (e) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; (f) lặp lại các bước từ (a) đến (e) bằng mẫu đối chứng âm tính thay cho mẫu thử nghiệm; và (g) so sánh lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước (e) với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước (f), trong đó lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước (e) thấp hơn so với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước (f) biểu lộ sự có mặt của các kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích. Kháng thể α-SNAP-25 trong bước (d) có thể tùy ý được liên kết với giá thể pha rắn. Mẫu đối chứng trong bước (f) cũng có thể bao gồm một mẫu đối chứng dương ngoài mẫu đối chứng âm.

Các độc tố Clostridium được sản sinh bởi *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium baratii* và *Clostridium butyricum* được sử dụng rộng rãi trong mỹ phẩm và phương pháp điều trị bệnh cho người và động vật có vú khác. Các chủng *C.*

botulinum sản sinh ra bảy loại typ huyết thanh có tính kháng nguyên khác nhau của độc tố botulinum (botulinum toxin: BoNT), các loại typ huyết thanh này đã được nhận biết khi nghiên cứu các chứng ngộ độc *Clostridium botulinum* xảy ra trên người (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E và BoNT/F), động vật (BoNT/C1 và BoNT/D) hoặc phân lập từ đất (BoNT/G). Trong khi cả bảy loại typ huyết thanh của độc tố botulinum này đều có cấu trúc và các đặc tính sinh học giống nhau, nhưng mỗi loại lại biểu lộ các đặc tính không đồng nhất, chẳng hạn, ví dụ, các đặc tính dược lý khác nhau. Ngược lại, độc tố uốn ván (TeNT: tetanus toxin) được sản sinh một từ một nhóm *C. tetani* đồng nhất. Hai loài *Clostridia* khác nhau là *C. baratii* và *C. butyricum*, cũng sản sinh ra các độc tố giống với BoNT/F và BoNT/E, một cách tương ứng.

Mỗi loại độc tố Clostridium được dịch mã thành một chuỗi polypeptit đơn có kích thước khoảng 150kDa, tiếp đó chuỗi polypeptit này được phân cắt bằng cách sự cắt phân giải protein trong vòng disulfua bằng enzym proteaza có trong tự nhiên, chẳng hạn, ví dụ, peoteaza nội sinh của độc tố Clostridium hoặc proteaza có trong tự nhiên được sản sinh trong môi trường. Quá trình xử lý sau dịch mã này tạo ra một phân tử hai chuỗi bao gồm chuỗi nhẹ (light chain: LC) có kích thước khoảng 50kDa và chuỗi nặng (heavy chain: HC) có kích thước khoảng 100kDa được gắn với nhau bởi một liên kết disulfua và các tương tác không phải cộng hóa trị. Mỗi một phân tử của hai chuỗi hoàn thiện này bao gồm ba miền khác biệt về mặt chức năng: 1) miền có hoạt tính enzym được định vị trên LC bao gồm vùng metalloproteaza có hoạt tính endopeptidaza phụ thuộc vào kẽm mà hướng đích đặc hiệu đến thành phần lõi của bộ máy giải phóng chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh; 2) miền chuyển dịch nằm trên nửa đầu amin của HC (H_N) mà dễ dàng giải phóng LC ra khỏi thể nang nội bào vào tế bào chất của tế bào đích; và 3) miền liên kết được tìm thấy trên nửa đầu carboxyl của HC (H_C) mà xác định hoạt tính liên kết và tính đặc hiệu liên kết của độc tố với phức thụ thể được định vị trên bề mặt của tế bào đích.

Hoạt tính enzym, liên kết và chuyển dịch của ba vùng chức năng này đều cần thiết đối với độc tính. Trong khi tất cả các chi tiết về quy trình này vẫn chưa được biết một cách chính xác, nhưng về tổng thể, cơ chế gây độc tế bào là giống nhau, theo đó các độc tố Clostridium đi vào tế bào thần kinh và ức chế sự giải phóng chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh, không quan tâm đến typ huyết thanh hoặc kiểu phụ. Mặc dù người nộp đơn không muốn bị giới hạn ở phần mô tả sau đây, nhưng cơ chế gây độc này có

thể được mô tả là bao gồm ít nhất bốn bước: 1) liên kết với thụ thể, 2) nội hoá phức hợp, 3) chuyển dịch chuỗi nhẹ và 4) cải biến đích bằng enzym (FIG. 1). Quy trình này được khởi đầu khi miền HC của độc tố Clostridium liên kết với hệ thống thụ thể-đặc hiệu độc tố được định vị trên bề mặt màng huyết tương của tế bào đích. Tính đặc hiệu liên kết của phức hợp thụ thể này được cho là đạt được, một phần, bởi các cách kết hợp đặc hiệu của các gangliosit và thụ thể protein mà xuất hiện để bao gồm riêng biệt mỗi phức thụ thể độc tố Clostridium. Ngay khi được liên kết, các phức hợp độc tố/thụ thể được nội hóa bằng cách nhập bào và các thể nang được nội hóa này được phân loại theo các lộ trình nội bào cụ thể. Bước chuyển dịch được kích hoạt do việc axit hóa ngăn của thể nang. Quy trình này được xem như để khởi đầu sự sắp xếp lại cấu trúc phụ thuộc vào độ pH quan trọng, mà làm tăng tính kỵ nước, thúc đẩy việc hình thành lỗ hổng và để hỗ trợ quy trình tách các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ra khỏi độc tố. Ngay khi được tách ra, endopeptidaza chuỗi nhẹ của độc tố này được giải phóng ra khỏi nang nội bào vào trong bào tương, tại đó nó xuất hiện để hướng đích đặc hiệu các thành phần lõi của thiết bị giải phóng chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh. Các protein lõi này, protein màng liên kết thể nang (vesicle-associated membrane protein: VAMP)/synaptobrevin, protein liên kết synaptosom có kích thước 25 kDa (SNAP-25) và Syntaxin, là cần thiết để kết hợp nang synap và dung hợp tại đầu dây thần kinh và cấu thành các thành viên của họ protein-thụ thể gắn với yếu tố nhạy N-etylmaleimit hòa tan (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein-receptor: SNARE). BoNT/A và BoNT/E cắt SNAP-25 trong vùng đầu carboxyl, giải phóng một đoạn gồm 9 hoặc 26 axit amin, một cách tương ứng và BoNT/C1 cũng cắt SNAP-25 gần đầu carboxyl để giải phóng đoạn gồm 8 axit amin. Các typ huyết thanh botulinum BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F và BoNT/G và độc tố uốn ván, hoạt động trên phần trung tâm vùng ổn định của VAMP và giải phóng phần đầu amin của VAMP vào trong bào tương. BoNT/C1 cắt syntaxin tại một vị trí gần bề mặt màng của bào tương. Việc thủy phân chọn lọc các SNARE trong khớp thần kinh tạo ra sự phong bế việc giải phóng chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh gây ra bởi độc tố Clostridium *in vivo*. Các đích protein SNARE của các độc tố Clostridium này thường bị xuất bào đối với các tế bào không phải là tế bào thần kinh; trong các tế bào này, cũng như trong các tế bào thần kinh, hoạt tính peptidaza chuỗi nhẹ ức chế sự xuất bào, ví dụ, xem: Yann Humeau et al., How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release, 82(5)

Biochimie. 427-446 (2000); Kathryn Turton et al., Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility, 27(11) Trends Biochem. Sci. 552-558. (2002); Giovanna Lalli et al., The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons, 11(9) Trends Microbiol. 431-437, (2003).

Endopeptidaza tái hướng đích thường thay thế vị trí phân cắt proteaza trong vòng chuỗi kép có trong tự nhiên bằng vị trí phân cắt proteaza ngoại sinh. Ví dụ, xem: Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, patent Mỹ số 7,419,676, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Mặc dù các endopeptidaza tái hướng đích này thay đổi toàn bộ trọng lượng phân tử toàn bộ của chúng do kích thước của gốc hướng đích, quy trình hoạt hóa và sự phân cắt phụ thuộc của nó tại vị trí phân cắt ngoại sinh để tạo ra phân tử chuỗi kép về cơ bản là giống với các độc tố Clostridium. Ví dụ, xem: Steward, L.E. et al., Activatable Clostridial Toxins, patent Mỹ số 2009/0005313; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/776,075; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity for Clostridial Toxin Target Cells, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2008/0241881, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các khía cạnh theo sáng chế, một phần, bao gồm chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch để sản xuất kháng thể α-SNAP-25 mà có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A này. Theo sáng chế, thuật ngữ "chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch" dùng để chỉ chế phẩm chứa kháng nguyên SNAP-25, khi được sử dụng cho động vật sẽ kích thích đáp ứng miễn dịch kháng lại kháng nguyên SNAP-25, nhờ đó sản sinh ra kháng thể α-SNAP-25 có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Thuật ngữ "đáp ứng miễn dịch" dùng để chỉ đáp ứng bất kỳ bởi hệ miễn dịch của động vật đối với chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch. Các đáp ứng miễn dịch được nêu làm ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, tính miễn dịch dịch thể cục bộ và toàn thân cũng như tế bào, chẳng hạn, ví dụ, các đáp ứng CTL, bao gồm sự kích thích đặc hiệu kháng nguyên của các CD8+ CTL, các đáp ứng tế bào T hỗ trợ bao gồm các đáp ứng tăng sinh tế bào T và giải phóng xytokin và các đáp ứng tế bào B bao gồm, ví dụ, đáp ứng sự sản sinh

kháng thể. Thuật ngữ "kích thích đáp ứng miễn dịch" dùng để chỉ việc sử dụng chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch hoặc polynucleotit mã hóa chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch này, tại vị trí đáp ứng miễn dịch bị tác động, nghĩa là, bị kích thích, khởi đầu hoặc cảm ứng.

Chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 chứa kháng nguyên SNAP-25. Theo sáng chế, thuật ngữ "kháng nguyên" dùng để chỉ phân tử gây ra đáp ứng miễn dịch và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các peptit, các polysacarit và thể tiếp hợp của lipit, chẳng hạn, ví dụ, các lipoprotein và glycolipit. Theo sáng chế, thuật ngữ "kháng nguyên SNAP-25" dùng để chỉ kháng nguyên bất kỳ có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A mà có thể gây ra đáp ứng miễn dịch. Kháng nguyên SNAP-25 được sử dụng trong chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch phải đủ lớn để về cơ bản có trình tự duy nhất, qua đó làm giảm thiểu khả năng tạo ra các kháng thể phản ứng chéo kháng lại kháng nguyên khác ngoài SNAP-25. Ngoài ra, kháng nguyên SNAP-25 được sử dụng trong chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch phải đủ nhỏ để chỉ gây ra đáp ứng miễn dịch mà về cơ bản kháng lại SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, qua đó làm tăng khả năng sản sinh ra các kháng thể α-SNAP-25 có thể phân biệt SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A với SNAP-25 không có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Hơn nữa, cũng rất mong muốn tạo ra các kháng thể α-SNAP-25 có hiệu suất cao chứa một trình tự axit amin mà có thể được chọn lọc lặp lại và liên kết với một ái lực chấp nhận được để cho phép thiết kế một thử nghiệm có độ nhạy cao.

Trình tự xung quanh vị trí phân cắt BoNT/A có trong SNAP-25 được ký hiệu là P_5–P_4–P_3–P_2–P_1–P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5', với P_1–P_1' đại diện cho liên kết có thể cắt dễ dàng. Phụ thuộc vào sự phân cắt bởi endopeptidaza tái hướng đích, sản phẩm phân cắt tạo thành được tạo ra bao gồm một đoạn có trình tự P_5–P_4–P_3–P_2–P_1 và một mảnh P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5'. Do đó, theo sáng chế, thuật ngữ "SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A" dùng để chỉ SNAP-25 bất kỳ có gốc P_1 là axit amin tại đầu carboxyl của nó. Ví dụ, Q_{197}–R_{198} trong SNAP-25 của người (SEQ ID NO: 5) đại diện cho liên kết có thể cắt dễ dàng P_1–P_1' tại vị trí phân cắt BoNT/A. Như vậy, "SNAP-25 có glutamin đầu carboxyl của liên kết có thể

cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A" sẽ là sản phẩm SNAP-25 phân cắt bất kỳ có glutamin là axit amin tại đầu carboxyl của nó, tại đó glutamin này đại diện cho Q_{197} của liên kết có thể cắt dễ dàng. Theo một ví dụ khác, K_{204}–H_{205} trong SNAP-25 của *Torpedo marmorata* (SEQ ID NO: 16) đại diện cho liên kết có thể cắt dễ dàng P_1–P_1' tại vị trí phân cắt BoNT/A. Như vậy, "SNAP-25 có lysin ở đầu carboxyl của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A" sẽ là sản phẩm SNAP-25 phân cắt bất kỳ có lysin là axit amin tại đầu carboxyl của nó, mà tại đó lysin này đại diện cho K_{204} của liên kết có thể cắt dễ dàng đó.

Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ vị trí phân cắt BoNT/A có thể được cải biến để tăng cường tính gây miễn dịch của kháng nguyên SNAP-25, hapten hoặc hợp chất có tính kháng nguyên bất kỳ khác mà là chất gây miễn dịch, không gây miễn dịch hoặc gây miễn dịch yếu khi không được kết hợp với sự cải biến. Theo một khía cạnh của phương án này, gốc P_1 đầu carboxyl từ liên kết có thể cắt dễ dàng trong kháng nguyên SNAP-25 này có thể được carboxyl hóa. Việc carboxyl hóa có thể làm tăng các tính chất gây miễn dịch mong muốn của kháng nguyên SNAP-25 theo hai khía cạnh. Thứ nhất, bởi vì các axit amin tích điện tăng cường tính gây miễn dịch, bổ sung nhóm COO^- vào gốc tại đầu carboxyl sẽ làm tăng toàn bộ tính gây miễn dịch của kháng nguyên SNAP-25. Thứ hai, do gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A ở trạng thái tích điện dựa trên sự phân cắt, việc bổ sung nhóm COO^- vào đầu carboxyl sẽ bắt chước tốt hơn kháng nguyên thực tế, mà kháng thể α-SNAP-25 được bộc lộ theo sáng chế này được thiết kế để liên kết một cách có chọn lọc.

Theo một khía cạnh của phương án này, gốc đầu amin của kháng nguyên SNAP-25 có thể được cải biến bằng cách bổ sung một axit amin thích hợp để gắn kháng nguyên SNAP-25 này vào protein mang, chẳng hạn, ví dụ, hemaxyanin lấy từ con hà (keyhole limpet hemacyanin: KLH), ovalbumin (OVA), thyroglobulin (THY), albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin: BSA), chất ức chế trypsin đậu tương (soybean trypsin inhibitor: STI) hoặc các peptit đa gắn kết khác (multiple attachment peptide: MAP). Ví dụ, gốc xystein có thể gắn ở đầu amin để tiếp hợp với protein mang KLH.

Do đó, theo một phương án, kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A này có thể có chiều dài, ví dụ, ít nhất là 5, ít nhất 6, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 9, ít nhất 10, ít nhất 11, ít nhất

12, ít nhất 13, ít nhất 14, ít nhất 15, ít nhất 16, ít nhất 17, ít nhất 18, ít nhất 19, ít nhất 20, ít nhất 25 hoặc ít nhất 30 axit amin. Theo một phương án khác, kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có chiều dài, ví dụ, nhiều nhất 5, nhiều nhất 6, nhiều nhất 7, nhiều nhất 8, nhiều nhất 9, nhiều nhất 10, nhiều nhất 11, nhiều nhất 12, nhiều nhất 13, nhiều nhất 14, nhiều nhất 15, nhiều nhất 16, nhiều nhất 17, nhiều nhất 18, nhiều nhất 19, nhiều nhất 20, nhiều nhất 25 hoặc nhiều nhất 30 axit amin. Theo một phương án khác nữa, kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có chiều dài, ví dụ, trong khoảng từ 7 đến 12 axit amin, trong khoảng từ 10 đến 15 axit amin hoặc trong khoảng từ 13 đến 18 axit amin.

Theo một phương án khác, kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33. Theo các khía cạnh của phương án này, kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 hoặc SEQ ID NO: 39. Theo một phương án khác nữa, kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 40.

Cũng theo một phương án khác nữa, kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41. Theo các khía cạnh của phương án này, kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46. Theo một phương án khác, kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47.

Được dự định là kháng nguyên SNAP-25 bất kỳ hoặc tất cả kháng nguyên SNAP-25 mà gây ra đáp ứng miễn dịch sản sinh ra các kháng thể α-SNAP-25 có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể là hữu dụng là một kháng nguyên SNAP-25. Do đó, các biến thể trình tự axit amin bao gồm các trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 46 có thể hữu ích làm kháng nguyên SNAP-25 để kích hoạt đáp ứng miễn dịch sản sinh ra các kháng thể α-SNAP-25, mà kháng thể này có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Vì vậy, theo một phương án, kháng nguyên SNAP-25 có thể thay thế ít nhất 1, ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4 hoặc ít nhất 5 đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung axit amin vào kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 46. Theo một phương án khác nữa, kháng nguyên SNAP-25 có thể có mức độ tương đồng axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 46.

Được dự định là một hoặc nhiều chất mang có thể được liên kết với kháng nguyên SNAP-25 để tăng cường tính gây miễn dịch của kháng nguyên SNAP-25, mà kháng nguyên này là chất gây miễn dịch, không phải là chất gây miễn dịch hoặc là chất gây miễn dịch yếu khi không được liên kết với chất mang. Các ví dụ không giới hạn, bao gồm, ví dụ, hemaxyanin lấy từ con hà (keyhole limpet hemacyanin: KLH), ovalbumin (OVA), thyroglobulin (THY), albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin: BSA), chất ức chế trypsin đậu tương (soybean trypsin inhibitor: STI) hoặc peptit đa gắn kết (multiple attachment peptide: MAP). Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, kháng nguyên không có tính kháng nguyên hoặc có tính kháng nguyên yếu có thể tạo ra tính kháng nguyên bằng cách kết hợp kháng nguyên đó với chất mang. Các loại chất mang và phương pháp khác để kết hợp kháng nguyên với chất mang đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem: Harlow and Lane, nêu trên, 1998a; Harlow and Lane, nêu trên, 1998b; và David W. Waggoner, Jr. et al., Immunogenicity-enhancing carriers and compositions thereof and methods of using the same, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 20040057958 (25/03/2004). Epitop cũng có thể được tạo ra

bằng cách biểu hiện epitop này dưới dạng một protein dung hợp. Các phương pháp biểu hiện các polypeptit dung hợp đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này như được mô tả, ví dụ trong tài liệu của Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999). Do đầu carboxyl của kháng nguyên SNAP-25 phải là gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, nên chất mang phải được gắn vào đầu amin của kháng nguyên SNAP-25 này.

Được dự định là một hoặc nhiều vùng đệm linh động có thể liên kết với kháng nguyên SNAP-25 để tăng cường tính miễn dịch của kháng nguyên SNAP-25 là chất gây miễn dịch, không phải là chất gây miễn dịch hoặc là chất gây miễn dịch yếu khi không kết hợp với các tác nhân liên kết linh động. Vùng đệm linh động làm tăng toàn bộ chiều dài peptit của kháng nguyên SNAP-25 và tạo ra độ linh động, do đó tạo điều kiện để trình diện thích hợp kháng nguyên SNAP-25 này với tế bào miễn dịch. Là một ví dụ không giới hạn, chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 có thể bao gồm một kháng nguyên SNAP-25 liên kết với một hoặc nhiều vùng đệm linh động nối tiếp nhau để trình diện kháng nguyên SNAP-25 tốt hơn với tế bào miễn dịch, qua đó tạo thuận lợi cho việc đáp ứng miễn dịch.

Một vùng đệm linh động bao gồm một peptit có chiều dài ít nhất là một axit amin và chứa các axit amin không tích điện với các nhóm chuỗi bên R nhỏ, chẳng hạn, ví dụ, glyxin, alanin, valin, leuxin hoặc serin. Do đó, theo một phương án, vùng đệm linh động có thể, ví dụ, có chiều dài ít nhất là 1, ít nhất là 2, ít nhất là 3, ít nhất là 4, ít nhất là 5, ít nhất là 6, ít nhất là 7, ít nhất 8, ít nhất là 9 hoặc ít nhất là 10 axit amin. Theo một phương án khác, vùng đệm linh động có thể, ví dụ, có chiều dài ít nhất là 1, nhiều nhất là 2, nhiều nhất là 3, nhiều nhất là 4, nhiều nhất là 5, nhiều nhất là 6, nhiều nhất là 7, nhiều nhất là 8, nhiều nhất là 9 hoặc nhiều nhất là 10 axit amin. Theo một phương án khác nữa, một vùng đệm linh động có thể, ví dụ, có chiều dài trong khoảng từ 1 đến 3 axit amin, trong khoảng từ 2 đến 4 axit amin, trong khoảng từ 3 đến 5 axit amin, trong khoảng từ 4 đến 6 axit amin hoặc trong khoảng từ 5 đến 7 axit amin. Các ví dụ không giới hạn về vùng đệm linh động bao gồm, ví dụ, vùng đệm G như GGG, GGGG (SEQ ID NO: 57) và GGGGS (SEQ ID NO: 58) hoặc vùng đệm A như AAA, AAAA (SEQ ID NO: 59) và AAAAV (SEQ ID NO: 60). Một vùng đệm linh động được liên kết trong khung của kháng nguyên SNAP-25 như một protein dung hợp.

Như đã được đề cập ở trên, một vùng đệm linh động được sử dụng, một phần, để làm tăng chiều dài tổng thể của peptit kháng nguyên SNAP-25 này. Lấy ví dụ, kháng nguyên SNAP-25 có từ 5 đến 10 axit amin có thể tăng chiều dài tổng thể bằng cách liên kết với một vùng đệm linh động có từ 3 đến 5 axit amin vào đầu amin của kháng nguyên SNAP-25 này. Theo một ví dụ khác, một kháng nguyên SNAP 25 có từ 5 đến 10 axit amin có thể tăng chiều dài tổng thể bằng cách liên kết với một vùng đệm linh động có từ 4 đến 6 axit amin vào đầu amin của kháng nguyên SNAP-25 này. Theo một ví dụ khác, một kháng nguyên SNAP-25 có từ 5 đến 10 axit amin có thể tăng chiều dài tổng thể bằng cách liên kết với một vùng đệm linh động có từ 7 đến 10 axit amin vào đầu amin của kháng nguyên SNAP-25 đó. Theo một ví dụ khác, một kháng nguyên SNAP-25 có từ 7 đến 12 axit amin có thể tăng chiều dài tổng thể bằng cách liên kết với một vùng đệm linh động có từ 1 đến 3 axit amin vào đầu amin của kháng nguyên SNAP-25 này. Theo một ví dụ khác, một kháng nguyên SNAP-25 có từ 7 đến 12 axit amin có thể tăng chiều dài tổng thể bằng cách liên kết với một vùng đệm linh động có từ 4 đến 6 axit amin vào đầu amin của kháng nguyên SNAP-25 đó. Việc tăng chiều dài bởi vùng đệm linh động này cho phép chọn lọc kháng nguyên SNAP-25 có kích thước nhỏ, do đó làm tăng khả năng là kháng nguyên SNAP-25 này sẽ chỉ kích hoạt đáp ứng miễn dịch về cơ bản kháng lại SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, do đó làm tăng khả năng sản sinh các kháng thể α-SNAP-25 có thể phân biệt SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A trong số các SNAP-25 không có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A.

Được dự định là chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 được bộc lộ theo sáng chế có thể, tùy ý, chứa kháng nguyên SNAP-25 được bộc lộ theo sáng chế và một hoặc nhiều chất phù trợ. Theo sáng chế, thuật ngữ "chất phù trợ" khi được sử dụng liên quan đến chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 dùng để chỉ chất bất kỳ hoặc hỗn hợp của các chất làm tăng hoặc đa dạng hóa đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên SNAP-25. Chất phù trợ kích thích đáp ứng miễn dịch có thể, ví dụ, giúp làm giảm số lần chủng ngừa hoặc lượng kháng nguyên cần thiết để chủng ngừa phòng bệnh. Việc sử dụng chất phù trợ kích thích đáp ứng miễn dịch trong chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch là đã biết. Mục đích chính của các chất phù trợ này cho phép

làm tăng đáp ứng miễn dịch. Các chất phù trợ không giới hạn bao gồm, ví dụ, liposom, pha dầu, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các loại chất phù trợ Freund, chẳng hạn, ví dụ, chất phù trợ Freund đầy đủ (Freund's complete adjuvant: FCA); các chất phù trợ Freund hoàn chỉnh (Freund's incomplete adjuvant: FIA); sapogenin glycosit, chẳng hạn, ví dụ, các saponin; carbopol; N-axetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (thường được biết đến dưới dạng muramyl đipeptit hoặc "MDP"); và lipopolysacarit (LPS). Các chất phù trợ này thường được sử dụng ở dạng huyền phù trong pha lỏng hoặc thường là các muối vô cơ không tan trong nước. Các muối vô cơ này có thể bao gồm, ví dụ, nhôm hydroxit, kẽm sulfat, sắt hydroxit dạng keo, canxi phosphat hoặc canxi clorua. Nhôm hydroxit ($Al(OH)_3$) cũng là một chất phù trợ thường được sử dụng. Gần đây, mới chỉ có một chất phù trợ được FDA phê chuẩn được sử dụng cho người là muối nhôm (alum) được sử dụng để "trữ" các kháng nguyên bằng cách kết tủa các kháng nguyên này. Các chất phù trợ được đề cập ở trên chỉ để làm ví dụ. Trên thực tế, chất phù trợ kích thích đáp ứng miễn dịch bất kỳ đều có thể được sử dụng trong chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế, miễn là chất phù trợ này thỏa mãn các tính chất cần thiết để gây ra đáp ứng miễn dịch.

Chất mang được bộc lộ theo sáng chế cũng có thể đóng vai trò làm chất phù trợ. Các chất phù trợ cụ thể và phương pháp tạo ra và sử dụng đã được mô tả trong, ví dụ, Gupta et al. Vaccine, 11: 993-306, 1993; Arnon, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987; và David W. Waggoner, Jr. et al., Immunogenicity-Enhancing Carriers and Compositions Thereof and Methods of Using the Same, công bố đơn Mỹ số 20040057958 (25 tháng 3 năm 2004). Các chất phù trợ bổ sung bao gồm hợp chất bất kỳ được mô tả trong: Chapter 7 (pp 141-227) of "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell, M. F. and Newman, M. J.) Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Plenum Press (New York). Các ví dụ từ bản tóm tắt này bao gồm Muramyl Dipeptide (MDP) và Montanide 720. Các phân tử như Poly Inosin:Cytoxin (Poly I:C) hoặc ADN plasmit chứa các motif CpG cũng có thể được sử dụng làm chất phù trợ kết hợp với các kháng nguyên được bao nang trong các vi hạt. Theo một ví dụ khác, chất phù trợ này là một tác nhân hỗ trợ hợp chất có tính kháng nguyên đi vào tế bào chất của tế bào như listeriolysin, streptolysin hoặc hỗn hợp của chúng.

Vì vậy, theo một phương án, chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 chứa kháng nguyên SNAP-25 có glutamin ở đầu carboxyl được carboxyl hóa liên kết với peptit mang. Theo các khía cạnh của phương án này, kháng nguyên SNAP-25 có glutamin ở đầu carboxyl được carboxyl hóa bao gồm các kháng nguyên có trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 39. Theo một khía cạnh khác của phương án này, kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 40. Theo các khía cạnh của phương án này, peptit mang là hemaxyanin lấy từ con hà (KLH), ovalbumin (OVA), thyroglobulin (THY), albumin huyết thanh bò (BSA), chất ức chế trypsin đậu tương (STI) hoặc peptit đa gắn kết (MAP).

Theo một phương án khác, chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 chứa kháng nguyên SNAP-25 có lysin ở đầu carboxyl được carboxyl hóa liên kết với peptit mang. Theo các khía cạnh của phương án này, kháng nguyên SNAP-25 có lysin ở đầu carboxyl được carboxyl hóa bao gồm kháng nguyên có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 hoặc SEQ ID NO: 46. Theo một khía cạnh khác của phương án này, kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47. Theo các khía cạnh của phương án này, peptit mang là hemaxyanin lấy từ con hà (KLH), ovalbumin (OVA), thyroglobulin (THY), albumin huyết thanh bò (BSA), chất ức chế trypsin đậu tương (STI) hoặc peptit đa gắn kết (MAP).

Cũng theo một phương án khác nữa, chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 chứa kháng nguyên SNAP-25 có glutamin ở đầu C được carboxyl hóa liên kết với một hoặc nhiều tác nhân liên kết linh động và peptit mang, trong đó các tác nhân liên kết linh động này xen vào giữa kháng nguyên SNAP-25 và peptit mang. Theo các khía cạnh của phương án này, kháng nguyên SNAP-25 có glutamin ở đầu carboxyl được carboxyl hóa bao gồm kháng nguyên có trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 39. Theo một phương án khác, kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46. Theo các khía cạnh của phương án này, peptit mang này là hemaxyanin lấy từ con hà (KLH), ovalbumin (OVA), thyroglobulin (THY), albumin huyết thanh bò (BSA), chất ức chế trypsin đậu tương

(STI) hoặc peptit đa gắn kết (MAP). Theo các khía cạnh của phương án này, liên kết linh động này là vùng đệm G hoặc vùng đệm A.

Theo một phương án khác nữa, chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 chứa kháng nguyên SNAP-25 có lysin ở đầu C được carboxyl hóa liên kết với một tác nhân liên kết linh động và peptit mang, trong đó tác nhân liên kết linh động này xen vào giữa kháng nguyên SNAP-25 và peptit mang. Theo các khía cạnh của phương án này, kháng nguyên SNAP-25 có lysin ở đầu carboxyl được carboxyl hóa bao gồm kháng nguyên có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 hoặc SEQ ID NO: 46. Theo một khía cạnh khác của phương án này, kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47. Theo các khía cạnh của phương án này, peptit mang là hemaxyanin lấy từ con hà (KLH), ovalbumin (OVA), thyroglobulin (THY), albumin huyết thanh bò (BSA), chất ức chế trypsin đậu tương (STI) hoặc peptit đa gắn kết (MAP). Theo các khía cạnh của phương án này, tác nhân liên kết linh động này là vùng đệm G hoặc vùng đệm A.

Các khía cạnh theo sáng chế bao gồm, một phần, đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể α-SNAP-25 mà kháng thể này có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Kháng thể α-SNAP-25 này liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các quy trình chuẩn cụ thể để tạo ra và sử dụng các kháng thể này cũng như việc xác định và đo tính đặc hiệu liên kết, ái lực liên kết và ái tính liên kết của kháng thể là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem: ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998a); và 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; và Current Protocols in Molecular Biology, 2004; David Anderson et al., Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use, patent Mỹ số 7,034,132 (25/04/2005); và Beatriz M. Carreno et al., Antibodies Against CTLA4, patent Mỹ số 7,034,121 (25/04/2006).

Như một ví dụ không giới hạn, các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể được tạo ra bằng cách tiêm một hoặc nhiều lần chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế vào động vật, chẳng hạn, ví dụ, thỏ, dê, chuột hoặc hoặc động vật có vú khác. Một ví dụ không giới hạn khác, các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng mà liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể được sản sinh bằng cách tiêm vào trứng, chẳng hạn, ví dụ, trứng gà, bằng cách tiêm một hoặc nhiều lần chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế. Hiệu giá kháng thể ở động vật đã được gây miễn dịch này có thể được theo dõi theo thời gian bằng các quy trình chuẩn, như thử nghiệm chất hấp thụ miễn dịch gắn enzym (enzyme linked immunosorbent assay: ELISA) bằng cách sử dụng kháng nguyên cố định hoặc thử nghiệm hoạt tính trên cơ sở tế bào. Nếu muốn, các kháng thể đa dòng đối với kháng thể α-SNAP-25 mà liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể được phân tách từ động vật có vú (ví dụ, từ máu) và còn được tinh sạch bằng các kỹ thuật đã biết, như sắc ký ái lực protein A để thu các phân đoạn IgG hoặc bằng cách tinh sạch ái lực dựa vào peptit được sử dụng để sản xuất kháng thể đó.

Như một ví dụ không giới hạn khác, kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng liên kết một cách có chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp tế bào lai. Ví dụ, xem: Chapter 6, Monoclonal Antibodies, pp. 196-244, Harlow & Lane, nêu trên, 1998a; và Chapter 7 Growing Hybridomas, pp. 245-282, Harlow & Lane, nêu trên, 1998a; và Goding, pp. 59-103, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986). Theo phương pháp này, động vật chủ, chẳng hạn, ví dụ, chuột, chuột đồng hoặc động vật chủ thích hợp khác, thường được cho phơi nhiễm bằng cách tiêm một hoặc nhiều lần kháng nguyên SNAP-25 được bộc lộ theo sáng chế để kích thích các tế bào lympho sản xuất hoặc có khả năng sản sinh ra các kháng thể α-SNAP-25 mà liên kết đặc hiệu với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Hiệu giá kháng thể ở động vật đã được gây miễn dịch này có thể phát hiện được theo thời

gian bằng các kỹ thuật chuẩn như thử nghiệm chất hấp thụ miễn dịch gắn enzym (ELISA) bằng cách sử dụng kháng nguyên cố định hoặc thử nghiệm hoạt tính trên cơ sở tế bào. Theo cách khác, các tế bào lympho này có thể được gây miễn dịch *in vitro* bằng cách sử dụng dòng tế bào nuôi thích hợp. Tại một thời điểm thích hợp sau khi gây miễn dịch, ví dụ, khi hiệu giá kháng thể là lớn nhất, tế bào sản sinh kháng thể đó được phân lập từ động vật. Nói chung, có thể sử dụng các tế bào lympho từ máu ngoại vi, nếu các tế bào có nguồn gốc từ người được mong đợi, hoặc sử dụng các tế bào lá lách hoặc các tế bào hạch bạch huyết, nếu các nguồn từ động vật có vú không phải người được mong đợi. Các tế bào sản sinh kháng thể đã được phân lập này được dung hợp với dòng tế bào bất tử bằng cách sử dụng tác nhân dung hợp thích hợp, như là polyetylen glycol, để tạo ra tế bào lai. Các dòng tế bào bất tử này thường là tế bào động vật có vú được biến nạp, cụ thể là các tế bào u tủy có nguồn gốc từ loài gặm nhấm, bò và người. Thông thường, dòng tế bào u tủy của chuột được dung hợp với các tế bào lá lách thu được từ chuột được gây miễn dịch thích hợp để tạo ra tế bào lai. Các dòng tế bào bất tử ưu tiên là các dòng tế bào u tủy của chuột nhạy cảm với môi trường nuôi cấy chứa hypoxanthin, aminopterin và thymidin (HAT). Có thể sử dụng dòng bất kỳ trong số nhiều dòng tế bào u tủy làm một phần dung hợp theo các kỹ thuật tiêu chuẩn, ví dụ, dòng tế bào u tủy P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 hoặc Sp2/O-Ag14. Các tế bào lai thu được từ việc dung hợp này tiếp đó được chọn lọc bằng cách sử dụng môi trường HAT, môi trường này sẽ tiêu diệt những tế bào u tủy không được dung hợp và tế bào u tủy được dung hợp không hiệu quả (các tế bào lá lách không được dung hợp chết sau bảy ngày trong môi trường nuôi cấy do chúng không được biến nạp). Sau đó, môi trường nuôi cấy chứa tế bào lai sinh trưởng có thể được tiến hành thử nghiệm để kiểm tra sự có mặt của các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng liên kết chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Ví dụ, phần dịch nổi tế bào lai có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng môi trường dương tính với α-SNAP-25 trong thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm liên kết *in vitro*, chẳng hạn, ví dụ, thử nghiệm chất miễn dịch phóng xạ (RIA: radioimmunoassay) hoặc thử nghiệm chất hấp thụ miễn dịch gắn enzym (ELISA) hoặc trong thử nghiệm hoạt tính trên cơ sở tế bào. Các kỹ thuật và thử nghiệm này đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem: Chapter 11 Immunoprecipitation, pp. 421-470, Harlow & Lane, nêu trên, 1998a; Chapter 12 Immunoblotting, pp. 471-510,

Harlow & Lane, nêu trên, 1998a; Chapter 14 Immunoassays, pp. 553-612, Harlow & Lane, nêu trên, 1998a. Sau đó các nghiên cứu bổ sung có thể được tiến hành để xác định xem liệu kháng thể đó có phản ứng với SNAP-25 không chứa đầu carboxyl tại gốc P1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A hay không. Ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng này cũng có thể được xác định, ví dụ, bằng phân tích Scatchard. Ví dụ, xem: Peter J. Munson and David Rodbard, Ligand: A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand-Binding Systems, 107(1) Anal. Biochem. 220-239 (1980). Sau khi các tế bào lai mong muốn này được nhận biết, các quy trình pha loãng giới hạn được sử dụng để phân lập các dòng có nguồn gốc từ tế bào đơn cho đến khi thu được dòng tế bào vô tính biểu hiện kháng thể đơn dòng mong muốn. Các kháng thể đơn dòng này chọn lọc phù hợp với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A và có ái lực liên kết đủ lớn, được lựa chọn để xác định đặc điểm và nghiên cứu tiếp theo.

Một phương án khác để điều chế kháng thể đơn dòng α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A là bằng cách sàng lọc thư viện globulin miễn dịch kết hợp tái tổ hợp, chẳng hạn, ví dụ, thư viện thực khuẩn thể biểu hiện kháng thể, với peptit SNAP-25 và phân lập các thành phần của thư viện globulin miễn dịch liên kết với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Các kit để tạo ra và sàng lọc các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể có bán trên thị trường, chẳng hạn, ví dụ, hệ thực khuẩn thể kháng thể tái tổ hợp (Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ); và kit biểu lộ thực khuẩn thể SurfZAP™ (Stratagene, La Jolla, CA). Ngoài ra, các ví dụ về các phương pháp và chất thử hữu ích để tạo ra và sàng lọc thư viện biểu lộ kháng thể có thể được tìm thấy trong, lấy ví dụ: Ladner et al. patent Mỹ số 5,223,409; Borrebaeck et al. patent Mỹ số 5,712,089; Griffiths et al. patent Mỹ số 5,885,793; Griffiths et al. patent Mỹ số 5,962,255; McCafferty et al. patent Mỹ số 5,969,108; Griffiths et al. patent Mỹ số 6,010,884; Jespers et al. patent Mỹ số 6,017,732; Borrebaeck et al. patent Mỹ số 6,027,930; Johnson et al. patent Mỹ số 6,140,471; và McCafferty et al. patent Mỹ số 6,172,197, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến bước lựa chọn mẫu chứa kháng thể α-SNAP-25 hoặc các tế bào sản sinh ra kháng thể α-SNAP-25. Theo sáng chế, thuật ngữ "mẫu chứa kháng thể α-SNAP-25 hoặc tế bào sản sinh ra kháng thể α-SNAP-25" dùng để chỉ vật liệu sinh học bất kỳ chứa hoặc có khả năng chứa ít nhất một kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Được dự định là mẫu bất kỳ và tất cả các mẫu có thể chứa kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể được sử dụng trong phương pháp này gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, máu, huyết tương, huyết thanh và dịch bạch huyết. Cũng dự định là tế bào bất kỳ mà có khả năng sản sinh ra kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể được sử dụng trong phương pháp này, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào CD8, tế bào CTL, tế bào T hỗ trợ và tế bào B. Có nhiều phương pháp đã biết khác nhau có thể được sử dụng để thu từ mẫu riêng lẻ chứa kháng thể α-SNAP-25 hoặc tế bào sản sinh ra kháng thể α-SNAP-25, ví dụ, xem: Harlow & Lane, nêu trên, 1998a; và Harlow & Lane, nêu trên, 1998b. Tương tự, các phương pháp đã biết khác nhau có thể được sử dụng để xử lý mẫu để phân lập kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Quy trình thu mẫu có thể được lựa chọn dựa trên loại kháng thể được phân lập. Theo một ví dụ không giới hạn, khi phân lập các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, mẫu thích hợp có thể là mẫu máu chứa các kháng thể α-SNAP-25, trong khi phân lập các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A thì mẫu thích hợp có thể là tế bào sản sinh ra kháng thể α-SNAP-25 như tế bào lá lách hoặc tế bào lai.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ mẫu. Các phương pháp phân tách kháng thể α-SNAP-25 như vậy, chẳng hạn, ví dụ, các kháng

thể α-SNAP-25 đa dòng liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A hoặc các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A đã biết đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem: Harlow and Lane, 1998a; và Harlow and Lane, nêu trên, 1998b. Ví dụ, các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng như vậy có thể được phân tách từ mẫu bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, ví dụ, sắc ký ái lực bằng cách sử dụng protein A hoặc protein G, kỹ thuật này cung cấp sơ bộ phân đoạn IgG huyết thanh miễn dịch. Tiếp theo hoặc theo cách khác, kháng nguyên SNAP-25 đặc hiệu có thể được cố định trên cột hoặc các hạt từ tính để tinh sạch các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng liên kết một cách có chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A bằng sắc ký ái lực miễn dịch. Kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng liên kết một cách có chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể được phân tách từ môi trường nuôi cấy hoặc dịch cổ trướng bằng các kỹ thuật tinh sạch globulin miễn dịch thông dụng chẳng hạn, ví dụ, protein A-Sepharoza, sắc ký hydroxylapatit, điện di trên gel, thẩm tách hoặc sắc ký ái lực.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể α-SNAP-25 có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, phương pháp này bao gồm các bước: (a) sử dụng cho động vật một lượng chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 chứa kháng nguyên SNAP-25 có glutamin ở đầu C được carboxyl hóa liên kết với peptit mang; (b) thu từ động vật này mẫu chứa kháng thể α-SNAP-25 hoặc tế bào sản sinh ra kháng thể α-SNAP-25; và (c) phân lập thành phần kháng thể α-SNAP-25 ra khỏi mẫu. Theo một khía cạnh của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A là kháng thể đa dòng. Theo một khía cạnh khác của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A là kháng thể đơn dòng. Theo một khía cạnh khác của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có

đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A được sản xuất này là một IgG kiểu phụ. Theo các khía cạnh khác của phương án này, chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 còn chứa thêm chất phù trợ, chẳng hạn, ví dụ, polyetylen glycol (PEG), monometoxypolyetylen glycol (mPEG) hoặc rượu polyvinyl (PVA).

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể α-SNAP-25 có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) sử dụng cho động vật một lượng chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 chứa peptit SNAP-25 có glutamin ở đầu C được carboxyl hóa được liên kết với một liên kết linh động và peptit mang, trong đó liên kết linh động này xen vào giữa peptit SNAP-25 và peptit mang; (b) thu từ động vật này mẫu chứa kháng thể α-SNAP-25 hoặc tế bào sản sinh ra kháng thể α-SNAP-25; và (c) phân lập kháng thể α-SNAP-25 từ mẫu đó. Theo một khía cạnh của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A là kháng thể đa dòng. Theo một khía cạnh khác của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A là kháng thể đơn dòng. Theo một khía cạnh khác của phương án này, kháng thể đơn dòng α-SNAP-25 có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A được tạo ra trong IgG kiểu phụ. Theo một khía cạnh khác của phương án này, chế phẩm kích thích đáp ứng miễn dịch SNAP-25 còn chứa chất phù trợ, chẳng hạn, ví dụ, polyetylen glycol (PEG), monometoxypolyetylen glycol (mPEG) hoặc rượu polyvinyl (PVA).

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến kháng thể α-SNAP-25 đã được phân lập liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể" dùng để chỉ phân tử được tạo ra bởi hệ miễn dịch được tạo ra để đáp ứng với kháng nguyên cụ thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đó và bao gồm cả các kháng thể có trong tự nhiên và kháng thể không có trong tự nhiên. Theo sáng chế, thuật ngữ "được phân lập" dùng để chỉ việc tách một phân tử ra khỏi môi trường tự

nhiên của nó bởi sự can thiệp của con người. Lấy ví dụ, kháng thể có thể là kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, dạng đime, dạng đa phân tử, kháng thể đa đặc hiệu, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, kháng thể hai chức năng, kháng thể liên quan đến tế bào giống thụ thể Ig, kháng thể mạch thẳng, kháng thể tổ hợp kép hoặc mảnh kháng thể có hoạt tính sinh học (minibody), với điều kiện là mảnh này thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn, và các dẫn xuất chuỗi đơn của chúng. Kháng thể có thể là phân tử globulin miễn dịch có chiều dài đầy đủ chứa các miền V_H và V_L, cũng như vùng ổn định chuỗi nhẹ (C_L) và vùng ổn định chuỗi nặng, C_{H1}, C_{H2} và C_{H3} hoặc mảnh có hoạt tính miễn dịch của phân tử globulin miễn dịch có chiều dài đầy đủ, chẳng hạn, ví dụ, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, mảnh Fc, mảnh Fd, mảnh Fv. Kháng thể có thể có nguồn gốc từ loài động vật có xương sống bất kỳ (ví dụ, người, dê, ngựa, lừa, chuột, chuột cống, thỏ hoặc gà) và có thể là typ bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD và IgA), lớp (ví dụ, IgA, IgD, IgE, IgG và IgM) hoặc phân lớp (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) bất kỳ. Đối với phần mô tả chung về cấu trúc của các kháng thể có trong tự nhiên, các kháng thể không có trong tự nhiên và mảnh liên kết với hợp chất kháng nguyên của nó, ví dụ, xem: Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrabeck, Antibody Engineering, 2d ed. (Oxford University Press 1995), mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Các kháng thể có trong tự nhiên thường là các glycoprotein gồm 4 phân tử khác loại có kích thước khoảng 150.000 dalton, gồm hai chuỗi nhẹ (L) giống nhau và hai chuỗi nặng (H) giống nhau. Mỗi chuỗi nhẹ này được liên kết với một chuỗi nặng bởi một liên kết cộng hóa trị disulfua, trong khi số lượng của các liên kết disulfua này là khác nhau trong số các chuỗi nặng của các isotyp globulin miễn dịch khác nhau. Mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cũng có các cầu liên kết disulfua trong chuỗi được đặt cách đều nhau. Mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi tại một đầu (V_H) tiếp đó là nhiều vùng ổn định. Mỗi chuỗi nhẹ có một vùng biến đổi tại một đầu (V_L) và một vùng ổn định tại một đầu còn lại. Vùng ổn định của chuỗi nhẹ này được sắp hàng với vùng ổn định thứ nhất của chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được sắp hàng với vùng biến đổi của chuỗi nặng. Các gốc axit amin cụ thể được cho là để tạo ra một mặt phân giới giữa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng.

Vị trí nhận diện kháng nguyên và vị trí liên kết kháng nguyên hoàn toàn đều nằm trong miền biến đổi của kháng thể, nghĩa là mảnh Fv. Mảnh này bao gồm một dạng đime của một miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) và một miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) kết hợp chặt chẽ với nhau bằng liên kết phi cộng hóa trị. Mỗi miền này chứa bốn vùng khung hoạt động (framework region: FR), vùng khung này chấp nhận một cách rộng rãi cấu hình gấp nếp β, được gắn với ba vùng siêu biến đổi, mà các vùng này hình thành nên vòng kết nối và trong một số trường hợp tạo thành một phần của cấu trúc gấp nếp β. Mỗi một vùng siêu biến đổi này chứa một trình tự axit amin tương ứng với vùng xác định tính bổ trợ (complementarity determining region: CDR). Nói chung, hình dạng cấu hình ba chiều của sáu vùng CDR mà xác định vị trí liên kết kháng nguyên trên bề mặt của đime V_H-V_L làm cho đime này có tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên. Ví dụ, xem: 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), mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Các vùng ổn định của kháng thể không liên quan trực tiếp đến việc liên kết của kháng thể này với kháng nguyên, nhưng lại biểu hiện các chức năng tác động khác nhau, chẳng hạn như sự tham gia của kháng thể trong quá trình gây độc tế bào qua tế bào phụ thuộc vào kháng thể.

Một kháng nguyên đích thường có một hoặc nhiều vị trí liên kết, còn được gọi là các epitop, các epitop này được nhận diện bởi các vị trí liên kết kháng nguyên tạo thành từ CDR. Theo sáng chế, "epitop" đồng nghĩa với “yếu tố quyết định kháng nguyên” và dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên đích, chẳng hạn, ví dụ, peptit, polysacarit hoặc phân tử chứa lipit, có khả năng liên kết đặc hiệu với một globulin miễn dịch hoặc thụ thể tế bào T hoặc dạng khác tương tác với phân tử đó. Mỗi kháng thể liên kết một cách đặc hiệu với epitop khác nhau có cấu trúc khác nhau. Do đó, một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một kháng thể tương ứng.

Các kháng thể đa dòng dùng để chỉ một quần thể các phân tử kháng thể không đồng nhất chứa ít nhất hai loại kháng thể có khả năng liên kết với kháng nguyên cụ thể. Theo định nghĩa, kháng thể đa dòng bao gồm hai kháng thể khác nhau liên kết với ít nhất hai epitop khác nhau. Theo sáng chế, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” hoặc “các kháng thể đơn dòng” dùng để chỉ quần thể các phân tử kháng thể về cơ bản là đồng

nhất mà chỉ chứa một loại kháng thể có khả năng liên kết với một kháng nguyên cụ thể, nghĩa là các kháng thể riêng biệt trong quần thể này là giống hệt nhau trừ trường hợp xảy ra các đột biến tự nhiên mà các đột biến này xuất hiện một lượng không đáng kể. Theo định nghĩa, kháng thể đơn dòng liên kết với một epitop đơn lẻ. Các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, trực tiếp kháng một vị trí kháng nguyên đơn lẻ. Hơn nữa, ngược lại với kháng thể đa dòng, mỗi kháng thể đơn dòng trực tiếp kháng một yếu tố xác định kháng nguyên trên kháng nguyên đó. Ngoài tính đặc hiệu của chúng, các kháng thể đơn dòng này có ưu điểm bởi vì chúng có thể được tổng hợp mà không bị nhiễm tạp bởi các kháng thể khác. Cụm từ bổ nghĩa "đơn dòng" dùng để chỉ đặc tính của kháng thể đó như được thu từ quần thể kháng thể về cơ bản là đồng nhất, mà không được hiểu như cần sản xuất kháng thể đó bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Lấy ví dụ, kháng thể đơn dòng này được sử dụng theo sáng chế có thể được thực hiện bởi phương pháp tế bào lai, lần đầu tiên được mô tả bởi: Kohler et al., (1975) Nature 256:495 hoặc có thể được tạo ra bằng các phương pháp ADN tái tổ hợp (lấy ví dụ, xem: patent Mỹ số 4,816,567; patent Mỹ số 5,807,715). Các kháng thể đơn dòng này cũng có thể được phân lập từ thư viện kháng thể thực khuẩn thể bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả, lấy ví dụ, bởi: Clackson et al., (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597.

Do đó, theo một phương án, kháng thể α-SNAP-25 bao gồm một miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) và một miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Theo một khía cạnh của phương án này, miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) này có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82 hoặc SEQ ID NO: 133. Theo một khía cạnh khác của phương án này, miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) này có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 hoặc SEQ ID NO: 92.

Theo một phương án khác, trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể α-SNAP-25 bao gồm một miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) và miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Theo một khía cạnh của phương án này, miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) này được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID

NO: 81 hoặc SEQ ID NO: 132. Theo một khía cạnh khác của phương án này, miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có mức độ tương đồng ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81 hoặc SEQ ID NO: 132. Theo một khía cạnh khác nữa của phương án này, vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) này được mã hóa bởi SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 hoặc SEQ ID NO: 91. Theo một khía cạnh khác nữa của phương án này, vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) này được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có mức độ tương đồng ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 hoặc SEQ ID NO: 91.

Trong một phương án khác, kháng thể α-SNAP-25 bao gồm vùng CDR1, vùng CDR2, vùng CDR3 của miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng mà liên kết một cách có chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Theo một khía cạnh của phương án này, miền CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng này (V_H) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 hoặc SEQ ID NO: 120. Theo một khía cạnh khác của phương án này, miền CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) này có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 hoặc SEQ ID NO: 123. Theo một khía cạnh khác nữa của phương án này, miền CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) này có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 134 hoặc SEQ ID NO: 135.

Theo một phương án khác, kháng thể α-SNAP-25 bao gồm vùng CDR1, vùng CDR2, vùng CDR3 của miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Theo một khía cạnh của phương án này, vùng CDR1 của miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) này có trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 129. Theo một khía cạnh khác của phương án này, vùng CDR2 của miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) này có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 hoặc SEQ ID NO: 112. Theo một khía cạnh khác nữa của phương án này, vùng CDR3 của miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) này có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 hoặc SEQ ID NO: 117.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách đặc hiệu với epitop chứa SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Theo một khía cạnh của phương án này, epitop này bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 hoặc SEQ ID NO: 37. Theo một khía cạnh khác của phương án này, epitop này bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 hoặc SEQ ID NO: 44.

Như đã được đề cập ở trên, trình tự bao quanh vị trí phân cắt BoNT/A thể hiện trong SNAP-25 được biểu thị ở dạng P_5–P_4–P_3–P_2–P_1–P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5', với P_1–P_1' đại diện cho liên kết có thể cắt dễ dàng. Theo sự phân cắt bởi BoNT/A, sản phẩm phân cắt tạo thành được tạo ra bao gồm một mảnh có trình tự P_5–P_4–P_3–P_2–P_1 và một mảnh có trình tự P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5'. Theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A" dùng để chỉ kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với mảnh sản phẩm SNAP-25 phân cắt bất kỳ chứa trình tự P_5–P_4–P_3–P_2–P_1, nhưng không liên kết với mảnh sản phẩm SNAP-25 phân cắt bất kỳ chứa trình tự P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5' hoặc liên kết với SNAP-25 bất kỳ chứa liên kết có thể cắt dễ dàng P_1–P_1' nguyên vẹn tại vị trí phân cắt BoNT/A. Theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể α-SNAP-25_{197}" dùng để chỉ kháng thể liên kết một cách có chọn lọc với SNAP-25 có gốc P_1 ở đầu carboxyl tương ứng với glutamin 197 trong SEQ ID NO: 5. Theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể α-SNAP-25_{204}" dùng để chỉ kháng thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có gốc P_1 ở đầu carboxyl tương ứng với lysin 204 được nêu trong SEQ ID NO: 16.

Theo sáng chế, thuật ngữ "một cách chọn lọc" dùng để chỉ việc có tác động hoặc ảnh hưởng hoặc phản ứng duy nhất chỉ theo một cách hoặc chỉ với một đối tượng.

Theo sáng chế, thuật ngữ "liên kết một cách chọn lọc" hoặc "liên kết chọn lọc" khi đề cập đến một kháng thể, dùng để chỉ liên kết phân biệt của kháng thể đó với epitop đích đã chỉ ra sao cho kháng thể này về cơ bản không phản ứng chéo với các epitop không phải là đích. Kích thước tối thiểu của epitop peptit này, như được xác định theo sáng chế, là khoảng năm axit amin và epitop peptit này thường chứa ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 9, ít nhất 10, ít nhất 15 hoặc ít nhất 20 axit amin. Một epitop peptit có thể không liên tục, nghĩa là nó bao gồm các gốc axit amin không liền kề trong cấu trúc bậc một của peptit đó, nhưng lại cùng nhau tạo thành epitop theo cấu trúc bậc hai, bậc ba hoặc bậc bốn của peptit đó. Hơn nữa, cũng lưu ý rằng, một epitop có thể có một phần là phân tử khác nằm ngoài trình tự axit amin, chẳng hạn, ví dụ, gốc hydrat cacbon, gốc lipit giống các lipoprotein hoặc glycolipit hoặc gốc axit amin được cải biến hóa học giống axit amin được phosphoryl hóa. Theo các khía cạnh của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 được liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A mà chứa ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 9, ít nhất 10, ít nhất 15 hoặc ít nhất 20 axit amin. Theo các khía cạnh khác của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A này có thể liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A mà chứa nhiều nhất 5, nhiều nhất 6, nhiều nhất 7, nhiều nhất 8, nhiều nhất 9, nhiều nhất 10, nhiều nhất 15 hoặc nhiều nhất 20 axit amin.

Liên kết chọn lọc có các đặc tính liên kết, chẳng hạn, ví dụ, ái lực liên kết, tính đặc hiệu liên kết và ái tính liên kết. Xem: David J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, pp. 240 (1998). Ái lực liên kết dùng để chỉ khoảng thời gian kháng thể lưu lại tại vị trí liên kết epitop của nó và có thể được xem là cường độ mà kháng thể liên kết với epitop của nó. Ái lực liên kết có thể được mô tả bởi hằng số phân ly (KD) ở trạng thái cân bằng của kháng thể, hằng số này được xác định như tỷ lệ Kd/Ka ở trạng thái cân bằng. Trong đó, Ka là hằng số tốc độ kết hợp của kháng thể và Kd là hằng số tốc độ phân ly của kháng thể. Ái lực liên kết được xác định bằng cả tốc độ kết hợp và tốc độ phân ly nên nếu chỉ riêng tốc độ kết hợp cao hoặc tốc độ phân ly

thấp thì không thể đảm bảo có ái lực cao. Hằng số tốc độ kết hợp (Ka) hoặc hằng số kết hợp (Kon), xác định số hoạt động liên kết trong một đơn vị thời gian hoặc xu hướng của kháng thể và kháng nguyên này liên kết thuận nghịch thành phức kháng nguyên-kháng thể. Hằng số tốc độ kết hợp được biểu thị là M^{-1} s^{-1} và được biểu thị như sau: [Ab] x [Ag] x Kon. Hằng số tốc độ kết hợp càng lớn thì liên kết kháng thể với kháng nguyên của nó càng nhanh hoặc ái lực liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể đó càng cao. Hằng số tốc độ phân ly (Kd) hoặc hằng số phân ly (Koff), xác định số các hiện tượng phân ly trên một đơn vị thời gian, xu hướng của phức kháng nguyên-kháng thể để phân ly thuận nghịch thành các phân tử thành phần của nó, đó là kháng thể và kháng nguyên. Hằng số tốc độ phân ly được biểu diễn là s^{-1} và được biểu thị như sau: [Ab + Ag] x Koff. Hằng số tốc độ phân ly càng nhỏ thì kháng thể liên kết với kháng nguyên của nó càng chặt hoặc ái lực liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể càng cao. Hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng (KD) xác định tốc độ mà tại đó các phức kháng nguyên-kháng thể mới được hình thành bằng tốc độ mà tại đó các phức kháng nguyên-kháng thể phân ly tại trạng thái cân bằng. Hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng được biểu thị là M và được xác định theo công thức Koff/Kon=[Ab] x [Ag]/[Ab + Ag], trong đó [Ab] là nồng độ mol của kháng thể, [Ag] là nồng độ mol của kháng nguyên và [Ab + Ag] là nồng độ mol của phức kháng nguyên-kháng thể, trong đó tất cả các nồng độ các thành phần này là giá trị nồng độ khi hệ ở tại thời điểm cân bằng. Hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng này càng nhỏ, liên kết của kháng thể này với kháng nguyên của nó càng chặt hoặc ái lực liên kết giữa kháng thể và kháng nguyên đó càng cao.

Vì vậy, theo một phương án, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A này có thể có hằng số tốc độ kết hợp, ví dụ, nhỏ hơn 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1}, nhỏ hơn 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1}, nhỏ hơn 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1} hoặc nhỏ hơn 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1}. Theo một phương án khác, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có hằng số tốc độ kết hợp, ví dụ, lớn hơn 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1}, lớn hơn 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1}, lớn hơn 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1} hoặc lớn hơn 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1}. Theo một khía cạnh khác, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết

có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có hằng số tốc độ kết hợp trong khoảng từ 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1} đến 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1}, từ 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1} đến 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1}, từ 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1} đến 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1} hoặc từ 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1} đến 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1}.

Theo một phương án khác, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có hằng số tốc độ phân ly nhỏ hơn 1 x 10^{-3} s^{-1}, nhỏ hơn 1 x 10^{-4} s^{-1} hoặc nhỏ hơn 1 x 10^{-5} s^{-1}. Theo các khía cạnh khác của phương án này, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có hằng số tốc độ phân ly, ví dụ, nhỏ hơn 1,0 x 10^{-4} s^{-1}, nhỏ hơn 2,0 x 10^{-4} s^{-1}, nhỏ hơn 3,0 x 10^{-4} s^{-1}, nhỏ hơn 4,0 x 10^{-4} s^{-1}, nhỏ hơn 5,0 x 10^{-4} s^{-1}, nhỏ hơn 6,0 x 10^{-4} s^{-1}, nhỏ hơn 7,0 x 10^{-4} s^{-1}, nhỏ hơn 8,0 x 10^{-4} s^{-1} hoặc nhỏ hơn 9,0 x 10^{-4} s^{-1}. Theo một phương án khác, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có hằng số tốc độ phân ly, ví dụ, lớn hơn 1 x 10^{-3} s^{-1}, lớn hơn 1 x 10^{-4} s^{-1} hoặc lớn hơn 1 x 10^{-5} s^{-1}. Theo các khía cạnh khác của phương án này, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có hằng số tốc độ phân ly, ví dụ, lớn hơn 1,0 x 10^{-4} s^{-1}, lớn hơn 2,0 x 10^{-4} s^{-1}, lớn hơn 3,0 x 10^{-4} s^{-1}, lớn hơn 4,0 x 10^{-4} s^{-1}, lớn hơn 5,0 x 10^{-4} s^{-1}, lớn hơn 6,0 x 10^{-4} s^{-1}, lớn hơn 7,0 x 10^{-4} s^{-1}, lớn hơn 8,0 x 10^{-4} s^{-1} hoặc lớn hơn 9,0 x 10^{-4} s^{-1}.

Theo một phương án khác, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, có thể có hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng nhỏ hơn 0,500nM. Theo các khía cạnh của phương án này, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có hằng số phân ly cân bằng, ví dụ, nhỏ hơn 0,500nM, nhỏ hơn 0,450nM, nhỏ hơn 0,400nM, nhỏ hơn 0,350nM, nhỏ hơn 0,300nM, nhỏ hơn 0,250nM, nhỏ hơn 0,200nM, nhỏ hơn 0,150nM, nhỏ hơn 0,100nM hoặc nhỏ hơn 0,050nM. Theo một phương án khác, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có

đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có hằng số phân ly cân bằng lớn hơn 0,500nM. Theo các khía cạnh của phương án này, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng, ví dụ, lớn hơn 0,500nM, lớn hơn 0,450nM, lớn hơn 0,400nM, lớn hơn 0,350nM, lớn hơn 0,300nM, lớn hơn 0,250nM, lớn hơn 0,200nM, lớn hơn 0,150nM, lớn hơn 0,100nM hoặc lớn hơn 0,050nM.

Theo một phương án khác nữa, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A này có thể có hằng số tốc độ kết hợp đối với SNAP-25 nguyên vẹn, ví dụ, nhỏ hơn 1×10^0 M^{-1} s^{-1}, nhỏ hơn 1×10^1 M^{-1} s^{-1}, nhỏ hơn 1×10^2 M^{-1} s^{-1}, nhỏ hơn 1×10^3 M^{-1} s^{-1} hoặc nhỏ hơn 1×10^4 M^{-1} s^{-1}. Theo một phương án khác, ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể có hằng số tốc độ kết hợp đối với SNAP-25 nguyên vẹn, ví dụ, lớn nhất là 1×10^0 M^{-1} s^{-1}, lớn nhất là 1×10^1 M^{-1} s^{-1}, lớn nhất là 1×10^2 M^{-1} s^{-1}, lớn nhất là 1×10^3 M^{-1} s^{-1} hoặc lớn nhất là 1×10^4 M^{-1} s^{-1}.

Tính đặc hiệu liên kết là khả năng kháng thể có thể phân biệt giữa phân tử chứa epitop của nó và phân tử không chứa epitop đó. Một cách để xác định tính đặc hiệu liên kết là so sánh tốc độ kết hợp Kon của kháng thể đối với phân tử chứa epitop của nó so với tốc độ kết hợp Kon của kháng thể này với phân tử không chứa epitop đó. Lấy ví dụ, so sánh hằng số tốc độ kết hợp (Ka) của kháng thể α-SNAP-25 đối với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A so với SNAP-25 không chứa epitop đó, chẳng hạn, ví dụ, epitop SNAP-25 thiếu đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A hoặc epitop SNAP-25 có liên kết có thể cắt dễ dàng P_1–P_1' nguyên vẹn tại vị trí phân cắt BoNT/A. Theo các khía cạnh của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có hằng số tốc độ kết hợp (Ka) đối với SNAP-25 không chứa (các) epitop của nó, ví dụ, nhỏ hơn 1×10^0 M^{-1} s^{-1}, nhỏ hơn 1×10^1 M^{-1} s^{-1}, nhỏ hơn 1×10^2 M^{-1} s^{-1}, nhỏ hơn 1×10^3 M^{-1} s^{-1} hoặc nhỏ

hơn 1 x 10^4 M^{-1} s^{-1}. Theo các khía cạnh khác của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có một hằng số tốc độ kết hợp (Ka) đối với SNAP-25 không chứa (các) epitop của nó, ví dụ, cao nhất là 1 x 10^0 M^{-1} s^{-1}, cao nhất là 1 x 10^1 M^{-1} s^{-1}, cao nhất là 1 x 10^2 M^{-1} s^{-1}, cao nhất là 1 x 10^3 M^{-1} s^{-1} hoặc cao nhất là 1 x 10^4 M^{-1} s^{-1}.

Theo các khía cạnh khác của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có hằng số tốc độ kết hợp (Ka) đối với epitop của nó so với SNAP-25 không chứa epitop đó, ví dụ, ít nhất là nhiều gấp 2 lần trở lên, ít nhất là nhiều gấp 3 lần trở lên, ít nhất là nhiều gấp 4 lần trở lên, ít nhất là nhiều gấp 5 lần trở lên, ít nhất là nhiều gấp 6 lần trở lên, ít nhất là nhiều gấp 7 lần trở lên, ít nhất là nhiều gấp 8 lần trở lên hoặc ít nhất là nhiều gấp 9 lần trở lên. Theo các khía cạnh khác của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A này có hằng số tốc độ kết hợp (Ka) đối với epitop của nó so với SNAP-25 không chứa epitop, ví dụ, ít nhất là nhiều gấp 10 lần trở lên, ít nhất là nhiều gấp 100 lần trở lên, ít nhất là nhiều gấp 1.000 lần trở lên hoặc ít nhất là nhiều gấp 10.000 lần trở lên. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có hằng số tốc độ kết hợp (Ka) đối với epitop của nó so với SNAP-25 không chứa epitop đó, ví dụ, cao nhất là gấp 1 lần trở lên, cao nhất là gấp 2 lần trở lên, cao nhất là gấp 3 lần trở lên, cao nhất là gấp 4 lần trở lên, cao nhất là gấp 5 lần trở lên, cao nhất là gấp 6 lần trở lên, cao nhất là gấp 7 lần trở lên, cao nhất là gấp 8 lần trở lên hoặc cao nhất là gấp 9 lần trở lên. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A này có một hằng số tốc độ kết hợp (Ka) đối với epitop của nó so với SNAP-25 không chứa epitop đó là, ví dụ, cao nhất là gấp 10 lần trở lên, cao nhất là gấp 100 lần trở lên, cao nhất là gấp 1.000 lần trở lên hoặc cao nhất là gấp 10.000 lần trở lên.

Tính đặc hiệu liên kết của kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A này cũng có thể được đặc trưng theo tỷ lệ mà, một kháng thể α-SNAP-25 như vậy có thể phân biệt epitop SNAP-25 của nó với SNAP-25 không chứa epitop đó, chẳng hạn, ví dụ, epitop SNAP-25 thiếu đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng vị trí phân cắt của BoNT/A hoặc epitop SNAP-25 có liên kết có thể cắt dễ dàng P_1–P_1' nguyên vẹn tại vị trí phân cắt BoNT/A. Theo các khía cạnh của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có tỷ lệ liên kết đặc hiệu với epitop SNAP-25 của nó so với SNAP-25 không chứa epitop đó, ví dụ, ít nhất là 2:1, ít nhất là 3:1, ít nhất là 4:1, ít nhất là 5:1, ít nhất là 64:1, ít nhất là 7:1, ít nhất là 8:1, ít nhất là 9:1, ít nhất là 10:1, ít nhất là 15:1, ít nhất là 20:1, ít nhất là 25:1, ít nhất là 30:1, ít nhất là 35:1 hoặc ít nhất là 40:1. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có tỷ lệ liên kết đặc hiệu với epitop SNAP-25 của nó so với SNAP-25 thiếu đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, ví dụ, ít nhất là 2:1, ít nhất là 3:1, ít nhất là 4:1, ít nhất là 5:1, ít nhất là 6:1, ít nhất là 7:1, ít nhất là 8:1, ít nhất là 9:1, ít nhất là 10:1, ít nhất là 15:1, ít nhất là 20:1, ít nhất là 25:1, ít nhất là 30:1, ít nhất là 35:1 hoặc ít nhất là 40:1. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A này có tỷ lệ liên kết đặc hiệu đối với epitop SNAP-25 của nó so với SNAP-25 có liên kết P_1–P_1' nguyên vẹn có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt BoNT/A, ví dụ, ít nhất là 2:1, ít nhất là 3:1, ít nhất là 4:1, ít nhất là 5:1, ít nhất là 6:1, ít nhất là 7:1, ít nhất là 8:1, ít nhất là 9:1, ít nhất là 10:1, ít nhất là 15:1, ít nhất là 20:1, ít nhất là 25:1, ít nhất là 30:1, ít nhất là 35:1 hoặc ít nhất là 40:1.

Ái tính liên kết, cũng được biết đến như ái lực chức năng, dùng để chỉ tổng cường độ liên kết chức năng giữa kháng thể đa hóa trị và kháng nguyên của nó. Các phân tử kháng thể có thể có nhiều hơn một vị trí liên kết (ví dụ, 2 đối với IgG, 10 đối với IgM) và nhiều kháng nguyên chứa nhiều hơn một vị trí có tính kháng nguyên. Khi ái tính liên kết của một kháng thể phụ thuộc vào các ái lực liên kết của các vị trí liên

kết riêng biệt của kháng thể đó thì ái tính liên kết lớn hơn ái lực liên kết do tất cả các tương tác kháng nguyên-kháng thể cần phải được phá vỡ đồng thời để kháng thể này phân ly hoàn toàn. Được dự định là kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A này có thể liên kết một cách chọn lọc với epitop bất kỳ và tất cả các epitop đối với kháng thể đó.

Vì vậy, theo một phương án, kháng thể α-SNAP-25 này là kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Theo các khía cạnh của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 này là kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có glutamin ở đầu carboxyl hoặc kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có lysin ở đầu carboxyl. Theo các khía cạnh khác của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 là một kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 tương ứng với glutamin 197 được nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 tương ứng với lysin 204 nêu trong SEQ ID NO: 16. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, kháng thể α-SNAP-25 là một kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có trình tự axit amin ở đầu carboxyl nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 46.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích trên cơ sở miễn dịch. Các phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có thể được đánh giá bởi một số thông số bao gồm, ví dụ, độ chính xác, tính chính xác, giới hạn phát hiện (limit of detection: LOD), giới hạn định lượng (limit of quantitation: LOQ), khoảng, tính đặc hiệu, tính chọn lọc, tính tuyến tính, độ ổn định và tính tương thích hệ thống. Độ chính xác của phương pháp là thước đo độ chính xác của phương pháp phân tích hoặc sự tương đồng giữa giá trị đo được và giá trị được chấp nhận là giá trị thực thông thường hoặc giá trị tham chiếu được chấp nhận. Tính chính xác của phương pháp là mức độ tương đồng giữa các kết quả thử nghiêm riêng rẽ với nhau khi quy trình được thực hiện nhiều lần lấy

mẫu đồng nhất lặp lại. Như vậy, tính chính xác đánh giá 1) tính thay đổi trong thử nghiệm; 2) thay đổi trong ngày (lặp lại); và 3) thay đổi giữa các ngày (tính chính xác trung bình); và 4) thay đổi giữa các phòng thí nghiệm (tính lặp lại). Hệ số biến động (CV%) là giá trị định lượng của tính chính xác được thể hiện so với giá trị trung bình theo lý thuyết hoặc quan sát được.

Phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế phải có khả năng phát hiện được, dựa trên tín hiệu nền sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể α-SNAP-25 chứa SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp dùng để chỉ nồng độ thử nghiệm mà tại đó có phát sinh tín hiệu, mà tín hiệu này là khác nhau giữa mẫu đối chứng âm hoặc mẫu trắng và thể hiện nồng độ thấp nhất của chất phân tích có thể nhận biết được từ cơ sở này.

Do đó, theo một phương án, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có thể phát hiện lượng LOD khác biệt đáng kể của endopeptidaza tái hướng đích so với mẫu đối chứng âm hoặc mẫu trắng. Theo một khía cạnh của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOD của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 10ng hoặc thấp hơn, 9ng hoặc thấp hơn, 8ng hoặc thấp hơn, 7ng hoặc thấp hơn, 6ng hoặc thấp hơn, 5ng hoặc thấp hơn, 4ng hoặc thấp hơn, 3ng hoặc thấp hơn, 2ng hoặc thấp hơn, 1ng hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOD của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 900pg hoặc thấp hơn, 800pg hoặc thấp hơn, 700pg hoặc thấp hơn, 600pg hoặc thấp hơn, 500pg hoặc thấp hơn, 400pg hoặc thấp hơn, 300pg hoặc thấp hơn, 200pg hoặc thấp hơn, 100pg hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh khác của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOD của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 90pg hoặc thấp hơn, 80pg hoặc thấp hơn, 70pg hoặc thấp hơn, 60pg hoặc thấp hơn, 50pg hoặc thấp hơn, 40pg hoặc thấp hơn, 30pg hoặc thấp hơn, 20pg hoặc thấp hơn, 10pg hoặc thấp hơn. Theo một khía cạnh khác của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOD của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 9pg hoặc thấp hơn, 8pg hoặc thấp hơn, 7pg hoặc thấp hơn, 6pg hoặc thấp hơn, 5pg hoặc thấp hơn, 4pg hoặc thấp hơn, 3pg hoặc thấp hơn, 2pg hoặc thấp hơn, 1pg hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này,

phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOD của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 0,9pg hoặc thấp hơn, 0,8pg hoặc thấp hơn, 0,7pg hoặc thấp hơn, 0,6pg hoặc thấp hơn, 0,5pg hoặc thấp hơn, 0,4pg hoặc thấp hơn, 0,3pg hoặc thấp hơn, 0,2pg hoặc thấp hơn, 0,1pg hoặc thấp hơn.

Theo một khía cạnh khác của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOD endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 100nM hoặc thấp hơn nữa, 90nM hoặc thấp hơn nữa, 80nM hoặc thấp hơn nữa, 70nM hoặc thấp hơn nữa, 60nM hoặc thấp hơn nữa, 50nM hoặc thấp hơn nữa, 40nM hoặc thấp hơn nữa, 30nM hoặc thấp hơn nữa, 20nM hoặc thấp hơn nữa, 10nM hoặc thấp hơn nữa, 9nM hoặc thấp hơn, 8nM hoặc thấp hơn, 7nM hoặc thấp hơn, 6nM hoặc thấp hơn, 5nM hoặc thấp hơn, 4nM hoặc thấp hơn, 3nM hoặc thấp hơn, 2nM hoặc thấp hơn hoặc 1nM hoặc thấp hơn. Theo một khía cạnh khác của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOD của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 900pM hoặc thấp hơn, 800pM hoặc thấp hơn, 700pM hoặc thấp hơn, 600pM hoặc thấp hơn, 500pM hoặc thấp hơn, 400pM hoặc thấp hơn, 300pM hoặc thấp hơn, 200pM hoặc thấp hơn hoặc 100pM hoặc thấp hơn. Theo một khía cạnh khác của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOD của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 100pM hoặc thấp hơn, 90pM hoặc thấp hơn, 80pM hoặc thấp hơn, 70pM hoặc thấp hơn, 60pM hoặc thấp hơn, 50pM hoặc thấp hơn, 40pM hoặc thấp hơn, 30pM hoặc thấp hơn, 20pM hoặc thấp hơn hoặc 10pM hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOD của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 10pM hoặc thấp hơn, 9pM hoặc thấp hơn, 8pM hoặc thấp hơn, 7pM hoặc thấp hơn, 6pM hoặc thấp hơn, 5pM hoặc thấp hơn, 4pM hoặc thấp hơn, 3pM hoặc thấp hơn, 2pM hoặc thấp hơn hoặc 1pM hoặc thấp hơn.

Giới hạn định lượng (LOQ) là nồng độ thấp nhất và cao nhất của chất phân tích trong mẫu hoặc vật thử nghiệm có thể xác định được với độ chính xác và tính chính xác có thể chấp nhận được. Giới hạn định lượng cận dưới dùng để chỉ liều lượng thấp nhất mà phương pháp phát hiện có thể xác định được một cách nhất quán từ tín hiệu nền. Giới hạn định lượng cận trên là liều lượng cao nhất mà phương pháp phát hiện có thể xác định được một cách nhất quán trước khi bão hòa tín hiệu. Khoảng tuyến tính của phương pháp này là khoảng nằm giữa giới hạn định lượng cận dưới và cận trên.

Khoảng tuyến tính này có thể tính được bằng cách lấy giới hạn định lượng cận trên trừ đi giới hạn định lượng cận dưới. Theo sáng chế, thuật ngữ "tỷ lệ tín hiệu – tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận dưới" chỉ tín hiệu phát hiện được theo phương pháp này tại giới hạn phát hiện cận dưới chia cho tín hiệu nền. Theo sáng chế, thuật ngữ "tỷ lệ tín hiệu- tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận trên" chỉ tín hiệu phát hiện được theo phương pháp này tại giới hạn phát hiện cận trên chia cho tín hiệu nền.

Do đó, theo một phương án, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có thể phát hiện lượng LOQ khác biệt đáng kể của endopeptidaza tái hướng đích so với mẫu đối chứng hoặc mẫu trắng. Theo một khía cạnh của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOQ của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 10ng hoặc thấp hơn, 9ng hoặc thấp hơn, 8ng hoặc thấp hơn, 7ng hoặc thấp hơn, 6ng hoặc thấp hơn, 5ng hoặc thấp hơn, 4ng hoặc thấp hơn, 3ng hoặc thấp hơn, 2ng hoặc thấp hơn, 1ng hoặc thấp hơn. Vẫn theo các khía cạnh khác của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOQ của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 900pg hoặc thấp hơn, 800pg hoặc thấp hơn, 700pg hoặc thấp hơn, 600pg hoặc thấp hơn, 500pg hoặc thấp hơn, 400pg hoặc thấp hơn, 300pg hoặc thấp hơn, 200pg hoặc thấp hơn, 100pg hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh khác của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOQ của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 90pg hoặc thấp hơn, 80pg hoặc thấp hơn, 70pg hoặc thấp hơn, 60pg hoặc thấp hơn, 50pg hoặc thấp hơn, 40pg hoặc thấp hơn, 30pg hoặc thấp hơn, 20pg hoặc thấp hơn, 10pg hoặc thấp hơn. Theo một khía cạnh khác của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOQ của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 9pg hoặc thấp hơn, 8pg hoặc thấp hơn, 7pg hoặc thấp hơn, 6pg hoặc thấp hơn, 5pg hoặc thấp hơn, 4pg hoặc thấp hơn, 3pg hoặc thấp hơn, 2pg hoặc thấp hơn, 1pg hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOQ của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 0,9pg hoặc thấp hơn, 0,8pg hoặc thấp hơn, 0,7pg hoặc thấp hơn, 0,6pg hoặc thấp hơn, 0,5pg hoặc thấp hơn, 0,4pg hoặc thấp hơn, 0,3pg hoặc thấp hơn, 0,2pg hoặc thấp hơn, 0,1pg hoặc thấp hơn.

Theo một khía cạnh khác của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOQ của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ,

100nM hoặc thấp hơn nữa, 90nM hoặc thấp hơn nữa, 80nM hoặc thấp hơn nữa, 70nM hoặc thấp hơn nữa, 60nM hoặc thấp hơn nữa, 50nM hoặc thấp hơn nữa, 40nM hoặc thấp hơn nữa, 30nM hoặc thấp hơn nữa, 20nM hoặc thấp hơn nữa, 10nM hoặc thấp hơn nữa, 9nM hoặc thấp hơn, 8nM hoặc thấp hơn, 7nM hoặc thấp hơn, 6nM hoặc thấp hơn, 5nM hoặc thấp hơn, 4nM hoặc thấp hơn, 3nM hoặc thấp hơn, 2nM hoặc thấp hơn hoặc 1nM hoặc thấp hơn. Theo một khía cạnh khác của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOQ của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 900pM hoặc thấp hơn, 800pM hoặc thấp hơn, 700pM hoặc thấp hơn, 600pM hoặc thấp hơn, 500pM hoặc thấp hơn, 400pM hoặc thấp hơn, 300pM hoặc thấp hơn, 200pM hoặc thấp hơn hoặc 100pM hoặc thấp hơn. Theo một khía cạnh khác của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOQ của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 100pM hoặc thấp hơn, 90pM hoặc thấp hơn, 80pM hoặc thấp hơn, 70pM hoặc thấp hơn, 60pM hoặc thấp hơn, 50pM hoặc thấp hơn, 40pM hoặc thấp hơn, 30pM hoặc thấp hơn, 20pM hoặc thấp hơn hoặc 10pM hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có LOQ của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 10pM hoặc thấp hơn, 9pM hoặc thấp hơn, 8pM hoặc thấp hơn, 7pM hoặc thấp hơn, 6pM hoặc thấp hơn, 5pM hoặc thấp hơn, 4pM hoặc thấp hơn, 3pM hoặc thấp hơn, 2pM hoặc thấp hơn hoặc 1pM hoặc thấp hơn.

Theo một khía cạnh về các phương pháp đã được mô tả, thử nghiệm trên cơ sở miễn dịch phải có tính chính xác không quá 50%. Theo các khía cạnh của phương án này, thử nghiệm trên cơ sở miễn dịch có tính chính xác là không quá 50%, không quá 40%, không quá 30% hoặc không quá 20%. Theo các khía cạnh khác của phương án này, thử nghiệm trên cơ sở miễn dịch có tính chính xác cũng không quá 15%, không quá 10% hoặc không quá 5%. Theo một khía cạnh khác của phương án này, thử nghiệm trên cơ sở miễn dịch có tính chính xác cũng không quá 4%, không quá 3%, không quá 2% hoặc không quá 1%.

Theo khía cạnh về các phương án đã được mô tả, thử nghiệm trên cơ sở miễn dịch phải có độ chính xác ít nhất là 50%. Theo các khía cạnh của phương án này, thử nghiệm trên cơ sở miễn dịch có độ chính xác ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70% hoặc ít nhất là 80%. Theo các khía cạnh khác của phương án này, thử nghiệm trên cơ sở miễn dịch có độ chính xác ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95%.

Theo các khía cạnh khác của phương án này, thử nghiệm trên cơ sở miễn dịch có độ chính xác ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế phải có tỷ lệ tín hiệu – tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận dưới là có ý nghĩa về mặt thống kê và tỷ lệ tín hiệu – tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận trên là có ý nghĩa về mặt thống kê. Theo các khía cạnh của phương án này, phương pháp trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận dưới là, ví dụ, ít nhất là 3:1, ít nhất là 4:1,ít nhất là 5:1, ít nhất là 6:1, ít nhất là 7:1, ít nhất là 8:1, ít nhất là 9:1, ít nhất là 10:1, ít nhất là 15:1 hoặc ít nhất là 20:1. Theo các khía cạnh khác của phương án này, phương pháp trên cơ sở miễn dịch có tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận trên là, ví dụ, ít nhất là 10:1, ít nhất là 15:1, ít nhất là 20:1, ít nhất là 25:1, ít nhất là 30:1, ít nhất là 35:1, ít nhất là 40:1, ít nhất là 45:1, ít nhất là 50:1, ít nhất là 60:1, ít nhất là 70:1, ít nhất là 80:1, ít nhất là 90:1 hoặc ít nhất là 100:1, ít nhất là 150:1, ít nhất là 200:1, ít nhất là 250:1, ít nhất là 300:1, ít nhất là 350:1, ít nhất là 400:1, ít nhất là 450:1, ít nhất là 500:1, ít nhất là 550:1 hoặc ít nhất là 600:1.

Tính đặc hiệu của phương pháp xác định khả năng đo được chất phân tích quan tâm ngoài các thành phần liên quan khác, chẳng hạn, ví dụ, chất phân tích bị bất hoạt hoặc hoạt hóa một phần. Tính chọn lọc của phương pháp mô tả khả năng phân tích của phương pháp để phân biệt các cơ chất khác nhau trong mẫu. Tính tuyến tính của phương pháp là khả năng suy luận kết quả một cách trực tiếp hoặc bằng các biến đổi toán học đã biết, tương ứng với nồng độ của chất phân tích trong mẫu. Do đó, theo một phương án, phương pháp trên cơ sở miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có thể phân biệt endopeptidaza tái hướng đích hoạt hóa hoàn toàn từ endopeptidaza tái hướng đích hoạt hóa một phần, ví dụ, có 70% hoặc thấp hơn, 60% hoặc thấp hơn, 50% hoặc thấp hơn, 40% hoặc thấp hơn, 30% hoặc thấp hơn, 20% hoặc thấp hơn hoặc 10% hoặc thấp hơn hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích hoạt hóa hoàn toàn.

Độ tin cậy của phương pháp là khả năng lặp lại các kết quả thử nghiệm đối với các mẫu giống nhau trong các điều kiện thử nghiệm thông thường (nhưng biến thiên). Độ ổn định của một quy trình là phép đo khả năng của nó bảo toàn trước những thay đổi nhỏ, nhưng có chủ ý mà không ảnh hưởng đến các thông số của phương pháp và đưa ra hướng dẫn đáng tin cậy theo cách sử dụng thông thường. Vì vậy, trong khi độ tin cậy đánh giá những thay đổi không thể tránh được thì độ ổn định đánh giá những

thay đổi có chủ ý. Các thông số thường được đánh giá bằng độ tin cậy và độ ổn định bao gồm mức độ ảnh hưởng của quá trình đông/tan, thời gian ủ, nhiệt độ ủ, tuổi thọ của chất thử, điều chế mẫu, bảo quản mẫu, số lần cấy chuyển tế bào, các lô endopeptidaza tái hướng đích, độ tinh sạch mẫu khác nhau và tính biến đổi giữa các phản ứng phân cắt. Các thông số về độ ổn định đối với thử nghiệm trên cơ sở tế bào bao gồm ngân hàng tế bào (bắt đầu, giai đoạn giữa và đông lạnh cuối), mức cấy chuyển tế bào, mật độ cấy tế bào ban đầu, mật độ tế bào gốc (bao nhiêu ngày nuôi cấy), tuổi tế bào trong ống nghiệm (thời gian chờ cấy), thời gian ủ, các đĩa khác nhau, lượng huyết thanh dư và nguồn chất thử. Tính tương thích hệ thống của phương pháp này là việc xác định thực hiện thử nghiệm, kể cả thiết bị và chất thử được tiến hành theo thời gian bằng cách phân tích tiêu chuẩn tham chiếu hoặc phân tử tham chiếu. Tính tương thích hệ thống được nhấn mạnh trong hướng dẫn của FDA trên thực tế là thiết bị, điện tử, tiến trình thử nghiệm và các mẫu được phân tích, tạo thành một hệ thống hợp nhất. Tính tương thích hệ thống được đánh giá bởi các thử nghiệm đồng thời, mà khi vẽ đường cong log theo liều dùng tương ứng với đáp ứng, các dãy tham chiếu pha loãng và các dãy mẫu pha loãng phải được thể hiện trên các đường cong song song.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập. Theo sáng chế, thuật ngữ "tế bào" dùng để chỉ tế bào nhân thực bất kỳ mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bởi endopeptidaza tái hướng đích hoặc tế bào nhân thực bất kỳ có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích. Thuật ngữ tế bào bao gồm tế bào của các sinh vật khác nhau, chẳng hạn, ví dụ, tế bào chuột, chuột cống, lợn, bò, ngựa, linh trưởng và người; từ các loại tế bào khác nhau chẳng hạn, ví dụ, tế bào thần kinh và tế bào không là tế bào thần kinh; và có thể được phân lập một phần hoặc hoàn toàn từ quần thể tế bào, mô, cơ quan không đồng nhất. Theo sáng chế, thuật ngữ "dòng tế bào được thiết lập" đồng nghĩa với “dòng tế bào bất tử” hoặc “dòng tế bào biến nạp” và dùng để chỉ môi trường nuôi cấy tế bào của các tế bào được lựa chọn để nhân giống số lượng lớn từ quần thể tế bào thu được từ nguồn sinh vật, mô hoặc cơ quan. Theo định nghĩa, dòng tế bào đã thiết lập không bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào của các tế bào sơ cấp. Theo sáng chế, thuật ngữ “tế bào sơ cấp” là tế bào được thu trực tiếp từ mô hoặc cơ quan mới và không có khả năng nhân giống số lượng lớn. Dòng tế bào đã thiết lập có thể chứa một quần thể tế bào không đồng nhất hoặc quần

thể tế bào đồng nhất. Dòng tế bào đã thiết lập có nguồn gốc từ tế bào đơn được đề cập đến dưới dạng dòng tế bào vô tính. Dòng tế bào đã thiết lập có thể là dòng tế bào mà các tế bào của nó biểu hiện nội bào tất cả các thành phần cần thiết đối với tế bào đó để trải qua toàn bộ các cơ chế tế bào, nhờ đó endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protẹn cơ chất SNAP-25 và bao gồm liên kết của endopeptidaza tái hướng đích với thụ thể của nó, nội bào hoá phức endopeptidaza/thụ thể, chuyển vị chuỗi nhẹ của endopeptidaza tái hướng đích ra khỏi nang nội bào vào tế bào chất và phân cắt bằng phân giải protein SNAP-25. Theo cách khác, dòng tế bào đã thiết lập này có thể là dòng mà các tế bào của nó đã được đưa từ nguồn ngoại sinh ít nhất một thành phần cần thiết để tế bào này trải qua toàn bộ cơ chế tế bào nhờ đó endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25 và bao gồm liên kết của endopeptidaza tái hướng đích với thụ thể của nó, nội bào hoá phức endopeptidaza/thụ thể, chuyển vị chuỗi nhẹ của endopeptidaza tái hướng đích từ nang nội bào vào tế bào chất và phân cắt bằng phân giải protein SNAP-25. Cũng được đề cập đến dưới dạng dòng tế bào được thiết kế di truyền, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập này có thể, ví dụ, biểu hiện endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh, chẳng hạn, ví dụ, ORL1 ngoại sinh, DOR ngoại sinh, KOR ngoại sinh, MOR ngoại sinh, thụ thể Galanin 1 ngoại sinh, thụ thể Galanin 2 ngoại sinh, thụ thể Galanin 3 ngoại sinh hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích. Theo sáng chế, thuật ngữ "(các) tế bào mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích", "(các) tế bào mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bởi endopeptidaza tái hướng đích" hoặc "(các) tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bởi endopeptidaza tái hướng đích" dùng để chỉ (các) tế bào có thể trải qua toàn bộ cơ chế tế bào, nhờ đó endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25, do đó ức chế quá trình xuất bào và bao gồm liên kết của endopeptidaza tái hướng đích với thụ thể của nó, nội bào hoá phức endopeptidaza/thụ thể, chuyển vị chuỗi hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích từ nang nội bào vào tế bào chất và phân cắt phân giải protein SNAP-25. Theo định nghĩa, (các) tế bào mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phải biểu hiện hoặc được thiết kế để biểu hiện, ít nhất một thụ thể endopeptidaza tái hướng đích và ít nhất một cơ chất

SNAP-25. Theo sáng chế, thuật ngữ "(các) tế bào có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích" hoặc "(các) tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích" dùng để chỉ các tế bào đã trải qua toàn bộ cơ chế tế bào, qua đó endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25 nhờ đó ức chế quá trình xuất bào và bao gồm liên kết của endopeptidaza tái hướng đích với thụ thể của nó, nội bào hoá phức endopeptidaza/thụ thể, chuyển dịch chuỗi nhẹ của endopeptidaza tái hướng đích này từ nang nội bào vào tế bào chất và phân cắt phân giải protein SNAP-25. Theo định nghĩa, (các) tế bào có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích phải biểu hiện hoặc được thiết kế để biểu hiện, ít nhất một thụ thể endopeptidaza tái hướng đích và ít nhất một cơ chất SNAP-25.

Vì vậy, theo một phương án, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập là mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập là mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, khoảng 100nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 90nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 80nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 70nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 60nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 50nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 40nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 30nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 20nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 10nM hoặc thấp hơn nữa. Theo các khía cạnh khác, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập là mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, khoảng 9nM hoặc thấp hơn, khoảng 8nM hoặc thấp hơn, khoảng 7nM hoặc thấp hơn, khoảng 6nM hoặc thấp hơn, khoảng 5nM hoặc thấp hơn, khoảng 4nM hoặc thấp hơn, khoảng 3nM hoặc thấp hơn, khoảng 2nM hoặc thấp hơn hoặc khoảng 1nM hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh khác nữa, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập này là mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, ví dụ, khoảng 0,9nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,8nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,7nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,6nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,5nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,4nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,3nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,2nM hoặc khoảng 0,1nM hoặc thấp hơn. Theo sáng chế, thuật ngữ "khoảng" khi định lượng giá trị của vật phẩm, số lượng, tỷ lệ phần trăm hoặc thời hạn được nêu dùng để chỉ khoảng giá trị tăng thêm hoặc giảm đi mười phần trăm của giá trị, của vật phẩm, tỷ lệ phần trăm thông số hoặc thời hạn được nêu đó.

Theo một phương án khác, các tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập này có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập này có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích, ví dụ, khoảng 100nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 90nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 80nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 70nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 60nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 50nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 40nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 30nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 20nM hoặc thấp hơn nữa, khoảng 10nM hoặc thấp hơn nữa. Theo các khía cạnh khác, các tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập này có khả năng hấp thu endopeptidaza tái hướng đích khoảng 9nM hoặc thấp hơn, khoảng 8nM hoặc thấp hơn, khoảng 7nM hoặc thấp hơn, khoảng 6nM hoặc thấp hơn, khoảng 5nM hoặc thấp hơn, khoảng 4nM hoặc thấp hơn, khoảng 3nM hoặc thấp hơn, khoảng 2nM hoặc thấp hơn hoặc khoảng 1nM hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh khác nữa, tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập này có khả năng hấp thu endopeptidaza tái hướng đích khoảng 0,9nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,8nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,7 nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,6nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,5nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,4nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,3nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,2nM hoặc thấp hơn hoặc khoảng 0,1nM hoặc thấp hơn.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện liên kết chọn lọc đối với endopeptidaza tái hướng đích được bộc lộ theo sáng chế. Theo sáng chế, thuật ngữ "liên kết một cách chọn lọc" hoặc "liên kết chọn lọc" khi được sử dụng đề cập đến endopeptidaza tái hướng đích, dùng để chỉ quá trình liên kết phân biệt của endopeptidaza tái hướng đích với thụ thể đích được chỉ định như endopeptidaza tái hướng đích về cơ bản không liên kết với thụ thể không hướng đích. Mức độ mà các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện liên kết một cách chọn lọc đối với endopeptidaza tái hướng đích có thể được xác định theo mức độ các tế bào này biểu hiện sự hấp thu không chọn lọc đối với phân tử thiếu vùng hướng đích của endopeptidaza tái hướng đích này. Một cách đánh giá sự hấp thu không chọn lọc đối với phân tử thiếu vùng hướng đích của endopeptidaza tái hướng đích này là đo sự hấp thu không chọn lọc của mảnh LH_N. Mảnh LH_N là một mảnh chứa vùng chuyển dịch của độc tố Clostridium và vùng hoạt tính enzym của độc tố Clostridium, nhưng lại thiếu vùng hướng đích đầy đủ bất kỳ. Các ví dụ không giới hạn về các mảnh LH_N bao gồm mảnh LH_N/A, mảnh LH_N/B, mảnh LH_N/C, mảnh LH_N/D, mảnh LH_N/E, mảnh

LH_N/F và mảnh LH_N/G. Mảnh LH_N/A đại diện là mảnh có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 146, mảnh này được mã hóa bởi phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 147.

Vì vậy, theo một phương án, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện tính liên kết chọn lọc với endopeptidaza tái hướng đích. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện tính liên kết chọn lọc đối với endopeptidaza tái hướng đích mà thể hiện, ví dụ, ít nhất là 75% tổng hoạt tính được thử nghiệm, ít nhất là 80% tổng hoạt tính được thử nghiệm, ít nhất là 85% tổng hoạt tính được thử nghiệm, ít nhất là 90% tổng hoạt tính được thử nghiệm hoặc ít nhất là 95% tổng hoạt tính được thử nghiệm. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện liên kết chọn lọc đối với endopeptidaza tái hướng đích mà thể hiện, ví dụ, từ khoảng 75% đến khoảng 100% tổng hoạt tính được thử nghiệm, từ khoảng 80% đến khoảng 100% tổng hoạt tính được thử nghiệm, từ khoảng 85% đến khoảng 100% tổng hoạt tính được thử nghiệm, từ khoảng 90% đến khoảng 100% tổng hoạt tính được thử nghiệm.

Theo một phương án khác, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện sự hấp thu tối thiểu không chọn lọc mảnh LH_N. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện sự hấp thu không chọn lọc mảnh LH_N mà là, ví dụ, nhiều nhất là 25% tổng lượng hấp thu đo được, nhiều nhất là 20% tổng lượng hấp thu đo được, nhiều nhất là 15% tổng lượng hấp thu đo được, nhiều nhất là 10% tổng lượng hấp thu đo được hoặc nhiều nhất là 5% tổng lượng hấp thu đo được. Theo các khía cạnh khác của phương án này, tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện hấp thu không chọn lọc mảnh LH_N mà là ví dụ, khoảng từ 0% đến khoảng 25% tổng lượng hấp thu đo được, khoảng từ 0% đến khoảng 20% tổng lượng hấp thu đo được, khoảng từ 0% đến khoảng 15% tổng lượng hấp thu đo được, khoảng từ 0% đến khoảng 10% tổng lượng hấp thu đo được hoặc khoảng từ 0% đến khoảng 5% tổng lượng hấp thu đo được.

Theo một phương án khác nữa, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập có biểu hiện hấp thu không chọn lọc tối thiểu mảnh LH_N/A. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện hấp thu không chọn lọc mảnh LH_N/A mà là, ví dụ, nhiều nhất là 25% tổng lượng hấp thu đo được, nhiều nhất là 20% tổng lượng hấp thu đo được, nhiều nhất là 15% tổng lượng hấp thu đo được, nhiều nhất là

10% tổng lượng hấp thu đo được hoặc nhiều nhất là 5% tổng lượng hấp thu đo được. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện hấp thu không chọn lọc mảnh LH_N/A mà là, ví dụ, khoảng từ 0% đến khoảng 25% tổng lượng hấp thu đo được, khoảng từ 0% đến khoảng 20% tổng lượng hấp thu đo được, khoảng từ 0% đến khoảng 15% tổng lượng hấp thu đo được, khoảng từ 0% đến khoảng 10% tổng lượng hấp thu đo được hoặc khoảng từ 0% đến khoảng 5% tổng lượng hấp thu đo được.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện đủ số lượng vị trí liên kết thụ thể trên màng tế bào để có độ nhạy và liên kết chọn lọc với một endopeptidaza tái hướng đích. Một thử nghiệm liên kết cân bằng bão hòa xác định liên kết tổng số và liên kết không đặc hiệu của phối tử ở các nồng độ khác nhau. Hằng số phân ly ở trạng thái cân bằng (K_d) đối với phối tử và số lượng tối đa của các vị trí liên kết thụ thể, Bmax, có thể được tính toán từ liên kết đặc hiệu bằng cách sử dụng phân tích hồi quy phi tuyến tính. Liên kết đặc hiệu được tính toán bằng cách lấy tổng lượng liên kết quan sát được trừ đi lượng liên kết không đặc hiệu của phối tử đó. K_d là nồng độ phối tử cần thiết đạt tới liên kết nửa tối đa và được xác định theo nồng độ molal. Bmax là số lượng tối đa của các vị trí liên kết có mặt trên màng huyết tương và được đo theo pmol/mg, pmol/tế bào, fmol/tế bào hoặc các vị trí/tế bào.

Vì vậy, theo một phương án, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được biểu hiện đủ số lượng vị trí liên kết thụ thể trên màng huyết tương có độ nhạy và liên kết chọn lọc với endopeptidaza tái hướng đích. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện giá trị Bmax đối với phối tử đích của endopeptidaza tái hướng đích, ví dụ, ít nhất là 0,1 fmol/tế bào, ít nhất là 0,2 fmol/tế bào, ít nhất là 0,3 fmol/tế bào, ít nhất là 0,4 fmol/tế bào, ít nhất là 0,5 fmol/tế bào, ít nhất là 0,6 fmol/tế bào, ít nhất là 0,7 fmol/tế bào, ít nhất là 0,8 fmol/tế bào, ít nhất là 0,9 fmol/tế bào hoặc ít nhất là 1,0 fmol/tế bào. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện giá trị Bmax đối với phối tử đích của endopeptidaza tái hướng đích, ví dụ, ít nhất là 1 fmol/tế bào, ít nhất là 2 fmol/tế bào, ít nhất là 3 fmol/tế bào, ít nhất là 4 fmol/tế bào, ít nhất là 5 fmol/tế bào, ít nhất là 6 fmol/tế bào, ít nhất là 7 fmol/tế bào, ít nhất là 8 fmol/tế bào, ít nhất là 9 fmol/tế bào hoặc ít nhất là 10 fmol/tế bào.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập nhạy với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, các tế bào này ổn định hơn các tế bào từ dòng gốc mà từ đó dòng tế bào vô tính đó được thu. Theo sáng chế, thuật ngữ "ổn định" dùng để chỉ các tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập với số lần cấy chuyển cụ thể biểu hiện EC50 tương đối, độ nhạy, hiệu lực, đường tiệm cận trên đã được xác định và/hoặc đường cong đáp ứng liều dùng đã được xác định rõ đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích mà tương tự với các giá trị EC50 tương đối, độ nhạy, hiệu lực, đường tiệm cận trên đã được xác định và/hoặc đường cong đáp ứng liều dùng đã được xác định được biểu hiện bởi các tế bào từ dòng tế bào gốc mà từ đó dòng tế bào vô tính này được thu, tại cùng số lần cấy chuyển hoặc có số lần cấy chuyển tương tự, trong đó cùng sử dụng endopeptidaza tái hướng đích và cùng điều kiện thử nghiệm đối với cả hai thử nghiệm.

Vì vậy, theo một phương án, tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập ổn định hơn so với dòng tế bào gốc mà từ đó dòng tế bào vô tính này được thu. Theo một khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập là ổn định hơn so với dòng tế bào SK-N-DZ gốc. Theo một khía cạnh khác của phương án này, tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập là ổn định hơn so với dòng tế bào SK-N-DZ gốc ATCC CRL-2149. Theo các khía cạnh khác của phương án này, tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập ổn định hơn với, ví dụ, ít nhất là 5 lần cấy chuyển, ít nhất là 10 lần cấy chuyển, ít nhất là 15 lần cấy chuyển, ít nhất là 20 lần cấy chuyển, ít nhất là 25 lần cấy chuyển hoặc ít nhất là 30 lần cấy chuyển, so với dòng tế bào gốc mà từ đó dòng tế bào vô tính này được thu. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập ổn định hơn với, ví dụ, ít nhất là 5 lần cấy chuyển, ít nhất là 10 lần cấy chuyển, ít nhất là 15 lần cấy chuyển, ít nhất là 20 lần cấy chuyển, ít nhất là 25 lần cấy chuyển hoặc ít nhất là 30 lần cấy chuyển, so với dòng tế bào gốc mà từ đó dòng tế bào vô tính này được thu.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích mà ổn định qua nhiều lần cấy chuyển tế bào. Theo sáng chế, thuật ngữ "ổn định" dùng để chỉ các tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập với số lần cấy chuyển cụ thể mà biểu hiện EC_{50} tương đối, độ nhạy, hiệu lực, đường tiệm cận trên đã được xác định và/hoặc đường cong đáp ứng liều dùng đã được xác định rõ đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích mà

tương tự với các giá trị EC_{50} tương đối, độ nhạy, hiệu lực, đường tiệm cận trên đã được xác định và/hoặc đường cong đáp ứng liều dùng đã được xác định được biểu hiện bởi các tế bào từ cùng dòng tế bào vô tính đã thiết lập, nhưng từ các lần cấy chuyển hoặc các lần cấy chuyển trước đó, trong đó cùng sử dụng endopeptidaza tái hướng đích và cùng điều kiện thử nghiệm đối với cả hai lần thử nghiệm.

Các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được bộc lộ theo sáng chế có thể biểu hiện độ nhạy ổn định đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích qua nhiều lần cấy chuyển tế bào. Theo sáng chế, thuật ngữ "độ nhạy đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích" dùng để chỉ liều lượng ít nhất mà thử nghiệm có thể đo một cách phù hợp với tín hiệu phát hiện được ở trên theo tín hiệu nền hoặc tín hiệu đối chứng không được xử lý.

Vì vậy, theo một phương án, các tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập biểu hiện độ nhạy đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích với số lần cấy chuyển đã cho bất kỳ là, ví dụ, 100nM hoặc thấp hơn, khoảng 80nM hoặc thấp hơn, khoảng 70nM hoặc thấp hơn, khoảng 60nM hoặc thấp hơn, khoảng 50nM hoặc thấp hơn, khoảng 40nM hoặc thấp hơn, khoảng 30nM hoặc thấp hơn, khoảng 20nM hoặc thấp hơn, khoảng 10nM hoặc thấp hơn, khoảng 1nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,9nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,8nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,7nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,6nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,5nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,4nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,3nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,2nM hoặc thấp hơn hoặc khoảng 0,1nM hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập biểu hiện độ nhạy đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích với số lần cấy chuyển bất kỳ là, ví dụ, trong khoảng từ 0,01nM đến khoảng 100nM, trong khoảng từ 0,01nM đến khoảng 75nM, trong khoảng từ 0,01nM đến khoảng 50nM, trong khoảng từ 0,01nM đến khoảng 25nM, trong khoảng từ 0,01nM đến khoảng 20nM, trong khoảng từ 0,01nM đến khoảng 15nM, trong khoảng từ 0,01nM đến khoảng 10nM, trong khoảng từ 0,01nM đến khoảng 5nM, trong khoảng từ 0,001nM đến khoảng 100nM, trong khoảng từ 0,001nM đến khoảng 75nM, trong khoảng từ 0,001nM đến khoảng 50nM, trong khoảng từ 0,001nM đến khoảng 25nM, trong khoảng từ 0,001nM đến khoảng 20nM, trong khoảng từ 0,001nM đến khoảng 15nM, trong khoảng từ 0,001nM đến khoảng 10nM hoặc trong khoảng từ 0,001nM đến khoảng 5nM.

Theo một phương án khác, các tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập biểu hiện độ nhạy đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích là khoảng 100nM hoặc thấp hơn, khoảng 75nM hoặc thấp hơn, khoảng 50nM hoặc thấp hơn, khoảng 25nM hoặc thấp hơn, thấp hơn khoảng 20nM hoặc thấp hơn, khoảng 15nM hoặc thấp hơn, khoảng 10nM hoặc thấp hơn hoặc khoảng 1nM hoặc thấp hơn đối với, ví dụ, 5 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 10 lần cấy chuyển hoặc nhiều hơn, 15 lần cấy chuyển hoặc nhiều hơn, 20 lần cấy chuyển hoặc nhiều hơn, 25 lần cấy chuyển hoặc nhiều hơn, 30 lần cấy chuyển hoặc nhiều hơn, 35 lần cấy chuyển hoặc nhiều hơn, 40 lần cấy chuyển hoặc nhiều hơn, 45 lần cấy chuyển hoặc nhiều hơn hoặc 50 lần cấy chuyển hoặc nhiều hơn. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập biểu hiện độ nhạy đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích là khoảng 100nM hoặc thấp hơn, khoảng 75nM hoặc thấp hơn, khoảng 50nM hoặc thấp hơn, khoảng 25nM hoặc thấp hơn, thấp hơn khoảng 20nM hoặc thấp hơn, khoảng 15nM hoặc thấp hơn, khoảng 10nM hoặc thấp hơn hoặc khoảng 1 nM hoặc thấp hơn đối với, ví dụ, từ khoảng 15 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 20 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 25 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 30 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 35 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 40 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 45 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 50 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 15 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 20 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 25 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 30 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 35 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 40 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 15 đến khoảng 40 lần cấy chuyển, từ khoảng 20 đến khoảng 40 lần cấy chuyển, từ khoảng 25 đến khoảng 40 lần cấy chuyển, từ hoặc khoảng 30 đến khoảng 40 lần cấy chuyển.

Theo sáng chế, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập có thể biểu hiện hiệu lực tương đối ổn định đối với sự hấp thu endopeptidaza tái hướng đích hoặc hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích qua nhiều lần cấy chuyển tế bào. Theo sáng chế, thuật ngữ "hiệu lực tương đối" dùng để chỉ mức độ tốt của đường tiệm cận của hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được trong thử nghiệm hiện tại so với đường tiệm cận trên đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được trong chuẩn tham chiếu, phân tử tham chiếu hoặc số lần cấy chuyển tham chiếu được sử dụng trong thử nghiệm đó. Theo sáng chế, thuật ngữ "tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu đối

với đường tiệm cận trên" dùng để chỉ tín hiệu phát hiện được trong một thử nghiệm tại giới hạn phát hiện cận trên chia cho tín hiệu phát hiện được bằng tín hiệu nền hoặc tín hiệu đối chứng không xử lý. Giới hạn phát hiện cận trên là liều dùng cao nhất mà một thử nghiệm có thể có được một cách ổn định trước khi xuất hiện sự bão hòa tín hiệu.

Vì vậy, theo một phương án, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được bộc lộ theo sáng chế có thể biểu hiện đường tiệm cận trên được xác định rõ ràng qua nhiều lần cấy chuyển tế bào và duy trì tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu thích hợp và ổn định đối với thử nghiệm này. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được bộc lộ theo sáng chế phải có tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu được xác định rõ ràng với đường tiệm cận trên đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, ví dụ, ít nhất là 3:1, ít nhất là 4:1, ít nhất là 5:1, ít nhất là 6:1, ít nhất là 7:1, ít nhất là 8:1, ít nhất là 9:1, ít nhất là 10:1, ít nhất là 15:1, ít nhất là 20:1, ít nhất là 25:1, ít nhất là 30:1, ít nhất là 35:1, ít nhất là 40:1, ít nhất là 45:1, ít nhất là 50:1, ít nhất là 60:1, ít nhất là 70:1, ít nhất là 80:1, ít nhất là 90:1 hoặc ít nhất là 100:1, ít nhất là 150:1, ít nhất là 200:1, ít nhất là 250:1, ít nhất là 300:1, ít nhất là 350:1, ít nhất là 400:1, ít nhất là 450:1, ít nhất là 500:1, ít nhất là 550:1 hoặc ít nhất là 600:1, qua, ví dụ, 5 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 10 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 15 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 20 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 25 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 30 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 35 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 40 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 45 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn hoặc 50 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được bộc lộ theo sáng chế phải có tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu được xác định rõ đối với đường tiệm cận trên đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, ví dụ, ít nhất là 3:1, ít nhất là 4:1, ít nhất là 5:1, ít nhất là 6:1, ít nhất là 7:1, ít nhất là 8:1, ít nhất là 9:1, ít nhất là 10:1, ít nhất là 15:1, ít nhất là 20:1, ít nhất là 25:1, ít nhất là 30:1, ít nhất là 35:1, ít nhất là 40:1, ít nhất là 45:1, ít nhất là 50:1, ít nhất là 60:1, ít nhất là 70:1, ít nhất là 80:1, ít nhất là 90:1 hoặc ít nhất là 100:1, ít nhất là 150:1, ít nhất là 200:1, ít nhất là 250:1, ít nhất là 300:1, ít nhất là 350:1, ít nhất là 400:1, ít nhất là 450:1, ít nhất là 500:1, ít nhất là 550:1 hoặc ít nhất là 600:1, qua, ví dụ, từ khoảng 15 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 20 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 25 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 30 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 35 đến

khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 40 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 45 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 50 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 15 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 20 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 25 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 30 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 35 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 40 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 15 đến khoảng 40 lần cấy chuyển, từ khoảng 20 đến khoảng 40 lần cấy chuyển, từ khoảng 25 đến khoảng 40 lần cấy chuyển hoặc từ khoảng 30 đến khoảng 40 lần cấy chuyển.

Các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được bộc lộ theo sáng chế có thể thể hiện đường cong đáp ứng liều dùng được xác định rõ ràng đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích qua nhiều lần cấy chuyển tế bào. Theo sáng chế, thuật ngữ "đường cong đáp ứng liều dùng" dùng để chỉ mức độ phù hợp của dữ liệu thô với mô hình thống kê lựa chọn đối với thử nghiệm Theo một ví dụ không giới hạn, đường cong sigma với logistic bốn thông số thích hợp là đường cong đáp ứng liều dùng cho thử nghiệm hoạt tính enzym, chẳng hạn như, ví dụ, thử nghiệm hiệu lực. Là một ví dụ không giới hạn khác, liên kết phối tử với một vị trí bão hòa phù hợp là một đường cong đáp ứng liều dùng cho thử nghiệm liên kết phối tử/kháng thể.

Vì vậy, theo một phương án, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được bộc lộ theo sáng chế thể hiện đường cong đáp ứng liều dùng được xác định rõ ràng đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích qua nhiều lần cấy chuyển tế bào. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được bộc lộ theo sáng chế thể hiện đường cong đáp ứng liều dùng được xác định rõ ràng đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, qua, ví dụ, 5 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 10 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 15 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 20 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 25 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 30 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 35 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 40 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 45 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn hoặc 50 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được bộc lộ theo sáng chế thể hiện đường cong đáp ứng liều dùng được xác định rõ ràng đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích qua, ví dụ, từ khoảng 15 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 20 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 25 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 30 đến

khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 35 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 40 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 45 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 50 đến khoảng 60 lần cấy chuyển, từ khoảng 15 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 20 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 25 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 30 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 35 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 40 đến khoảng 50 lần cấy chuyển, từ khoảng 15 đến khoảng 40 lần cấy chuyển, từ khoảng 20 đến khoảng 40 lần cấy chuyển, từ khoảng 25 đến khoảng 40 lần cấy chuyển hoặc từ khoảng 30 đến khoảng 40 lần cấy chuyển.

Các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được bộc lộ theo sáng chế có thể biểu hiện giá trị EC_{50} tương đối ổn định đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích qua nhiều lần cấy chuyển tế bào. Theo sáng chế, thuật ngữ "EC_{50} tương đối" hoặc "giá trị EC_{50} tương đối" dùng để chỉ giá trị EC_{50} đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích được chuẩn hóa dựa trên EC_{50} được tính toán theo tiêu chuẩn tham chiếu, phân tử tham chiếu hoặc số lần cấy chuyển tham chiếu được sử dụng trong thử nghiệm đó.

Vì vậy, theo một phương án, các tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập biểu hiện EC_{50} tương đối phù hợp đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích qua nhiều lần cấy chuyển tế bào. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập biểu hiện EC_{50} tương đối phù hợp đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, ví dụ, là khoảng ± 10%, khoảng ± 20%, khoảng ± 30%, khoảng ± 40%, khoảng ± 50%, khoảng ± 60%, khoảng ± 70% hoặc khoảng ± 75% EC50 tương đối đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích qua, ví dụ, 5 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 10 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 15 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 20 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 25 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 30 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 35 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 40 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 45 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn hoặc 50 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào vô tính đã thiết lập biểu hiện EC50 tương đối đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, ví dụ, là từ khoảng ± 10% đến khoảng 75%, từ khoảng ± 10% đến khoảng 70%, từ khoảng ± 10% đến khoảng 60%, từ khoảng ± 10% đến khoảng 50%, từ khoảng ± 10% đến khoảng 40%, từ khoảng ± 10% đến khoảng 30% hoặc từ khoảng ± 10% đến khoảng 20% EC_{50} tương đối đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích qua, ví dụ, 5 lần cấy chuyển

tế bào hoặc nhiều hơn, 10 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 15 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 20 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 25 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 30 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 35 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 40 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn, 45 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn hoặc 50 lần cấy chuyển tế bào hoặc nhiều hơn.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến endopeptidaza tái hướng đích. Theo sáng chế, thuật ngữ "endopeptidaza tái hướng đích" đồng nghĩa với "protein điều biến quá trình xuất bào dạng nang hướng đích" hoặc "TVEMP." Các ví dụ không giới hạn về endopeptidaza tái hướng đích đã được bộc lộ trong, ví dụ, Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, patent Mỹ số 5,989,545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, patent Mỹ số 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, patent Mỹ số 6,632,440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, patent Mỹ số 6,843,998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, công bố đơn quốc tế số WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/376,696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/776,075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/829,475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, công bố đơn quốc tế số WO 2006/059093; và Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, công bố đơn quốc tế số WO 2006/059105, mỗi tài liệu trong số các tài liệu được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Các ví dụ không giới hạn về endopeptidaza tái hướng đích bao gồm các endopeptidaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 và SEQ ID NO: 131.

Vì vậy, theo một phương án, hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được là từ endopeptidaza tái hướng đích. Theo các khía cạnh của phương án này, hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được là từ endopeptidaza tái hướng đích được bộc lộ trong: Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, patent Mỹ số 5,989,545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, patent Mỹ số 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, patent Mỹ số 6,632,440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, patent Mỹ số 6,843,998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, công bố quốc tế số WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/376,696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/776,075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/829,475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, công bố đơn quốc tế số WO 2006/059093; và Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, công bố đơn quốc tế số WO 2006/059105, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Theo các khía cạnh của phương án này, endopeptidaza tái hướng đích có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 hoặc SEQ ID NO: 131.

Theo phương án khác, hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được từ endopeptidaza tái hướng đích có, ví dụ, có mức độ tương đồng về trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với endopeptidaza tái hướng đích được bộc lộ trong: Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, patent Mỹ số 5,989,545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, patent Mỹ số 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the

Treatment of Mucus Hypersecretion, patent Mỹ số 6,632,440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, patent Mỹ số 6,843,998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, công bố đơn quốc tế số WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, công bố đơn quốc tế số WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/376,696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/776,075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/829,475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, công bố đơn quốc tế số WO 2006/059093; và Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, công bố đơn quốc tế số WO 2006/059105, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Theo phương án khác, hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được là từ endopeptidaza tái hướng đích có, ví dụ, có mức độ tương đồng về trình tự axit amin ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% so với endopeptidaza tái hướng đích có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 hoặc SEQ ID NO: 131.

Theo các khía cạnh khác của phương án này, hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được từ endopeptidaza tái hướng đích có ví dụ, 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết, hoặc đoạn bổ sung axit amin không liền kề so với endopeptidaza tái hướng đích được bộc lộ trong Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, patent Mỹ số 5,989,545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, patent Mỹ số 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, patent Mỹ số 6,632,440;

Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, patent Mỹ số 6,843,998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, công bố đơn quốc tế số WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, công bố đơn quốc tế số WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 11/376,696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/776,075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/829,475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, công bố đơn quốc tế số WO 2006/059093; và Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, công bố đơn quốc tế số WO 2006/059105, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. Theo các khía cạnh khác của phương án này, hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được từ endopeptidaza tái hướng đích có ví dụ, 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết, hoặc đoạn bổ sung axit amin không liền kề so với endopeptidaza tái hướng đích có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 hoặc SEQ ID NO: 131.

Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được từ biến thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên có ví dụ, 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết, hoặc đoạn bổ sung axit amin liền kề so với endopeptidaza tái hướng đích được bộc lộ trong: Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify

Peripheral Sensory Afferent Functions, patent Mỹ số 5,989,545; Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments, patent Mỹ số 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion, patent Mỹ số 6,632,440; Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis, patent Mỹ số 6,843,998; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2002/0037833; Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, công bố đơn quốc tế số WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, công bố đơn quốc tế số WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 11/376,696; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/776,075; Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/829,475; Foster, K.A. et al., Fusion Proteins, công bố đơn quốc tế số WO 2006/059093; và Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates, công bố đơn quốc tế số WO 2006/059105, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được từ biến thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên có ví dụ, 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn, 5 hoặc nhiều hơn, 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn, 10 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết, hoặc đoạn bổ sung axit amin liền kề so với endopeptidaza tái hướng đích có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 hoặc SEQ ID NO: 131.

Theo một phương án khác nữa, hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được từ endopeptidaza tái hướng đích opioit. Các ví dụ không giới hạn về endopeptidaza tái hướng đích opioit hoặc opioit-TVEMP, được mô tả trong, ví dụ:

Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions, patent Mỹ số 5,989,545; J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins, patent Mỹ số 7,132,259; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, patent Mỹ số 7,244,437; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, patent Mỹ số 7,413,742; Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain, patent Mỹ số 7,415,338; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, patent Mỹ số 7,514,088; Keith A. Foster, Fusion Proteins, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2008/0064092; Keith A. Foster, Fusion Proteins, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2009/0035822; Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2009/0048431; Keith A. Foster, Non-Cytotoxic Protein Conjugates, công bố đơn quốc tế số 2009/0162341; Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates, công bố đơn quốc tế WO 2005/023309; và Lance E. Steward, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells, công bố đơn quốc tế số WO 2008/008805; mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Theo một phương án khác nữa, hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích phát hiện được từ endopeptidaza tái hướng đích galanin. Các ví dụ không giới hạn về endopeptidaza tái hướng đích galanin hoặc galanin-TVEMP, đã được mô tả trong, ví dụ, Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capability and Enhanced Targeting Activity, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/776,043 (Jul. 11, 2007); Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells, U.S 11/776,052 (Jul. 11, 2007); và Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, đơn xin cấp patent Mỹ số 11/776,075 (11 tháng 7 năm 2007), mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến SNAP-25. Theo sáng chế, thuật ngữ "SNAP-25" dùng để chỉ SNAP-25 có trong tự nhiên hoặc SNAP-25 không

có trong tự nhiên mà được phân cắt ưu tiên bởi endopeptidaza tái hướng đích. Theo sáng chế, thuật ngữ "được phân cắt ưu tiên" dùng để chỉ tốc độ phân cắt của SNAP-25 bởi endopeptidaza tái hướng đích có cường độ lớn hơn ít nhất là một bậc so với tốc độ phân cắt cơ chất bất kỳ khác bởi endopeptidaza tái hướng đích. Theo các khía cạnh của phương án này, tốc độ phân cắt của SNAP-25 bởi endopeptidaza tái hướng đích có cường độ lớn hơn ít nhất là hai bậc, có cường độ lớn hơn ít nhất là ba bậc, có cường độ lớn hơn ít nhất là bốn bậc hoặc có cường độ lớn hơn ít nhất là năm bậc so với tốc độ phân cắt của cơ chất bất kỳ khác bởi endopeptidaza tái hướng đích.

Theo sáng chế, thuật ngữ "SNAP-25 có trong tự nhiên" dùng để chỉ SNAP-25 bất kỳ được tạo ra bởi quá trình có trong tự nhiên, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đồng phân SNAP-25 được tạo ra từ cải biến sau dịch mã, sản phẩm phiên mã ghép nối khác nhau hoặc đột biến tự nhiên và kiểu phụ SNAP-25. SNAP-25 có trong tự nhiên gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24 hoặc trình tự mà thay thế, làm khuyết hoặc bổ sung ví dụ, 1 axit amin hoặc nhiều hơn, 2 axit amin hoặc nhiều hơn, 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 4 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 6 axit amin hoặc nhiều hơn, 7 axit amin hoặc nhiều hơn, 8 axit amin hoặc nhiều hơn, 9 axit amin hoặc nhiều hơn, 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 30 axit amin hoặc nhiều hơn, 40 axit amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 100 axit amin hoặc nhiều hơn so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24.

Theo sáng chế, thuật ngữ "SNAP-25 không có trong tự nhiên" dùng để chỉ SNAP-25 bất kỳ có cấu trúc được cải biến nhờ sự trợ giúp bởi thao tác của con người, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, SNAP-25 được tạo ra bằng công nghệ di truyền bằng cách sử dụng kỹ thuật đột biến ngẫu nhiên hoặc được thiết kế hợp lý và SNAP-25 được tạo ra bởi kỹ thuật tổng hợp hóa học *in vitro*. Các ví dụ không giới hạn về SNAP-

25 không có trong tự nhiên đã được mô tả trong, ví dụ, Steward, L.E. et al., FRET Protease Assays for Clostridial Toxins, patent Mỹ số 7,332,567; Fernandez-Salas et al., Lipohilic Dye-based FRET Assays for Clostridial Toxin Activity, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2008/0160561, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. SNAP-25 không có trong tự nhiên có thể thay thế, làm khuyết hoặc bổ sung, ví dụ, 1 axit amin hoặc nhiều hơn, 2 axit amin hoặc nhiều hơn, 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 4 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 6 axit amin hoặc nhiều hơn, 7 axit amin hoặc nhiều hơn, 8 axit amin hoặc nhiều hơn, 9 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 30 axit amin hoặc nhiều hơn, 40 axit amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 100 axit amin hoặc nhiều hơn so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24.

Vì vậy, theo một phương án, SNAP-25 là SNAP-25 có trong tự nhiên. Theo các khía cạnh của phương án này, SNAP-25 này là đồng phân SNAP-25 hoặc kiểu phụ SNAP-25. Theo các khía cạnh của phương án này, SNAP-25 có trong tự nhiên là SNAP-25 có trong tự nhiên có trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24. Theo các khía cạnh khác của phương án này, SNAP-25 này là SNAP-25 có trong tự nhiên, ví dụ, có mức độ tương đồng về mặt trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24.

Theo một phương án khác, SNAP-25 là SNAP-25 không có trong tự nhiên. Theo các khía cạnh khác của phương án này, SNAP-25 này là SNAP-25 không có trong tự

nhiên ví dụ, có mức độ tương đồng về mặt trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4. Theo các khía cạnh khác của phương án này, SNAP-25 này là SNAP-25 không có trong tự nhiên có, ví dụ, 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung axit amin không liền kề so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, SNAP-25 này là SNAP-25 không có trong tự nhiên có ví dụ, 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc bổ sung axit amin liền kề so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24.

SNAP-25 có thể là SNAP-25 nội sinh hoặc SNAP-25 ngoại sinh. Theo sáng chế, thuật ngữ "SNAP-25 nội sinh" dùng để chỉ SNAP-25 xuất hiện một cách tự nhiên trong tế bào do nó được mã hóa một cách tự nhiên trong hệ gen của tế bào đó sao cho tế bào này vốn đã biểu hiện SNAP-25 này mà không cần nguồn SNAP-25 bên ngoài hoặc nguồn vật liệu di truyền bên ngoài mã hóa SNAP-25. Việc biểu hiện SNAP-25 nội sinh này có thể cần hoặc không cần sự kích thích từ môi trường, chẳng hạn, ví dụ, biệt hóa tế bào. Theo định nghĩa, SNAP-25 nội sinh chỉ có thể là SNAP-25 có trong tự nhiên hoặc biến thể của nó. Lấy ví dụ, các dòng tế bào đã thiết lập sau đây biểu hiện

SNAP-25 nội sinh: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa, SK-N-DZ và SK-N-BE(2)-C.

Theo sáng chế, thuật ngữ "SNAP-25 ngoại sinh" dùng để chỉ SNAP-25 được biểu hiện trong tế bào thông qua việc đưa nguồn SNAP-25 bên ngoài hoặc nguồn vật liệu di truyền bên ngoài mã hóa SNAP-25 bởi thao tác của con người. Việc biểu hiện SNAP-25 ngoại sinh có thể cần hoặc không cần sự kích thích từ môi trường, chẳng hạn, ví dụ, biệt hóa tế bào. Là một ví dụ không giới hạn, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập có thể biểu hiện SNAP-25 ngoại sinh bằng cách biến nạp ổn định hoặc tạm thời SNAP-25. Một ví dụ không giới hạn khác, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập có thể biểu hiện SNAP-25 ngoại sinh bằng cách chuyển nhiễm protein SNAP-25. Một SNAP-25 ngoại sinh có thể là SNAP-25 có trong tự nhiên hoặc biến thể của chúng hoặc SNAP-25 không có trong tự nhiên hoặc biến thể của chúng.

Vì vậy, theo một phương án, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện SNAP-25 nội sinh. Theo các khía cạnh của phương án này, SNAP-25 nội sinh này đươc biểu hiện bởi tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập là SNAP-25 có trong tự nhiên. Theo các khía cạnh khác của phương án này, SNAP-25 nội sinh này được biểu hiện bởi các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập có trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24. Theo các khía cạnh khác của phương án này, SNAP-25 nội sinh này được biểu hiện bởi các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập là SNAP-25 có trong tự nhiên, chẳng hạn, ví dụ, đồng phân SNAP-25 hoặc kiểu phụ SNAP-25. Theo các khía cạnh khác của phương án này, SNAP-25 nội sinh này được biểu hiện bởi các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập là SNAP-25 có trong tự nhiên, ví dụ, có mức độ tương đồng về trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24.

Theo một phương án khác, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện SNAP-25 ngoại sinh. Theo một khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện SNAP-25 có trong tự nhiên. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện SNAP-25 có trong tự nhiên có trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện SNAP-25 có trong tự nhiên, chẳng hạn, ví dụ, đồng phân SNAP-25 hoặc kiểu phụ SNAP-25. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện SNAP-25 có trong tự nhiên, ví dụ, có mức độ tương đồng về trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24.

Theo một khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện SNAP-25 không có trong tự nhiên. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện SNAP-25 không có trong tự nhiên, ví dụ, có mức độ tương đồng về mặt trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã

thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện SNAP-25 không có trong tự nhiên có ví dụ, 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung axit amin không liền kề so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện SNAP-25 không có trong tự nhiên có ví dụ, 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung axit amin liền kề so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 24.

Các thử nghiệm phát hiện sự phân cắt của SNAP-25 sau khi tiếp xúc với endopeptidaza tái hướng đích có thể được sử dụng để đánh giá xem liệu rằng tế bào có biểu hiện SNAP-25 ngoại sinh hay nội sinh không. Trong các thử nghiệm này, việc tạo ra sản phẩm SNAP-25 phân cắt có thể phát hiện được trong các tế bào biểu hiện SNAP-25 sau khi xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích. Các ví dụ không giới hạn về phương pháp phân tích thẩm tách Western riêng, cũng như các quy trình chuẩn, điều kiện và các chất phản ứng đã được xác định rõ là được các nhà cung cấp bán trên thị trường gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI và Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Nên được hiểu

rằng các thử nghiệm này và các thử nghiệm tương tự để phân cắt SNAP-25 có thể hữu dụng để nhận biết các tế bào biểu hiện SNAP-25 nội sinh hoặc ngoại sinh.

Là các ví dụ không giới hạn, phân tích thẩm tách Western sử dụng kháng thể nhận diện sản phẩm phân cắt SNAP-25 hoặc cả hai dạng SNAP-25 được phân cắt và không được phân cắt có thể được sử dụng để thử nghiệm về sự hấp thu endopeptidaza tái hướng đích. Các ví dụ về các kháng thể α-SNAP-25 hữu dụng trong các thử nghiệm này gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng SMI-81 của chuột (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng CI 71.1 của chuột (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng CI 71.2 của chuột (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng SP12 của chuột (Abcam, Cambridge, MA), kháng thể α-SNAP-25 kháng huyết thanh đa dòng của thỏ (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), kháng thể α-SNAP-25 kháng huyết thanh đa dòng của thỏ (Abcam, Cambridge, MA) và kháng thể α-SNAP-25 kháng huyết thanh đa dòng S9684 của thỏ (Sigma, St Louis, MO).

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến thụ thể endopeptidaza tái hướng đích. Theo sáng chế, thuật ngữ "thụ thể endopeptidaza tái hướng đích" dùng để chỉ thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên hoặc thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên mà ưu tiên tương tác với endopeptidaza tái hướng đích theo cách gây ra đáp ứng đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích. Theo sáng chế, thuật ngữ "tương tác ưu tiên" dùng để chỉ hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng (KD) của endopeptidaza tái hướng đích đối với thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có cường độ nhỏ hơn ít nhất là một bậc độ lớn so với cường độ đó của endopeptidaza tái hướng đích đối với thụ thể bất kỳ khác trên bề mặt tế bào đó. Hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng, một loại hằng số cân bằng cụ thể, xác định xu hướng phân ly thuận nghịch của phức thụ thể endopeptidaza tái hướng đích-endopeptidaza tái hướng đích thành các phân tử thành phần của nó, cụ thể là endopeptidaza tái hướng đích và thụ thể endopeptidaza tái hướng đích, được định nghĩa là KD=Ka/Kd ở trạng thái cân bằng. Hằng số kết hợp (Ka) được định nghĩa là Ka=[C]/[L][R] và hằng số phân ly (Kd) được định nghĩa là Kd=[L][R]/[C], trong đó [L] là nồng độ mol của endopeptidaza tái hướng đích, [R] là nồng độ mol của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích và [C] là nồng độ mol của phức endopeptidaza-thụ thể, trong đó tất cả các nồng

độ là các nồng độ của các thành phần như vậy khi hệ thống ở trạng thái cân bằng. Hằng số phân ly càng nhỏ, thì liên kết của endopeptidaza tái hướng đích với thụ thể của nó càng chặt hoặc ái lực liên kết giữa endopeptidaza tái hướng đích và thụ thể endopeptidaza tái hướng đích càng lớn. Theo các khía cạnh của phương án này, hằng số phân ly của endopeptidaza tái hướng đích đối với thụ thể của nó có cường độ yếu hơn ít nhất là hai bậc, yếu hơn ít nhất là ba bậc, yếu hơn ít nhất là bốn bậc, hoặc yếu hơn ít nhất là năm bậc độ lớn so với endopeptidaza tái hướng đích đối với thụ thể bất kỳ khác. Theo các khía cạnh khác của phương án này, ái lực liên kết của endopeptidaza tái hướng đích mà tương tác ưu tiên với thụ thể của nó có hằng số phân ly ở trạng thái cân bằng (KD) là, ví dụ, 500nM hoặc thấp hơn, 400nM hoặc thấp hơn, 300nM hoặc thấp hơn, 200nM hoặc thấp hơn 100nM hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh khác của phương án này, ái lực liên kết của endopeptidaza tái hướng đích mà ưu tiên tương tác với thụ thể của nó có thể có hằng số phân ly ở trạng thái cân bằng (KD) là, ví dụ, 90nM hoặc thấp hơn, 80nM hoặc thấp hơn, 70nM hoặc thấp hơn, 60nM, 50nM hoặc thấp hơn, 40nM hoặc thấp hơn, 30nM hoặc thấp hơn, 20nM hoặc thấp hơn 10 nM hoặc thấp hơn. Theo sáng chế, thuật ngữ "gây ra đáp ứng hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích" dùng để chỉ khả năng của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích tương tác với endopeptidaza tái hướng đích để tạo thành phức endopeptidaza/thụ thể và tiếp đó là nội bào hoá phức này vào tế bào chất.

Theo sáng chế, thuật ngữ "thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên" dùng để chỉ thụ thể endopeptidaza tái hướng đích bất kỳ được sản sinh từ quy trình có trong tự nhiên, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đồng phân thụ thể endopeptidaza tái hướng đích được sản sinh từ cải biến sau dịch mã, sản phẩm phiên mã ghép nối khác nhau hoặc đột biến tự nhiên và các kiểu phụ của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích. Thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên này gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thụ thể opioit có trong tự nhiên giống thụ thể giống opiate 1 (ORL1: opiate-like receptor 1), thụ thể δ-opioit (DOR: δ-opioid receptor), thụ thể κ-opioit (KOR: κ-opioid receptor) và thụ thể μ-opioit (MOR: μ-opioid receptor), chẳng hạn như các thụ thể được mô tả trong: Christopher Evans et al., Opioid Receptor Genes, patent Mỹ số 6,265,563; Christopher Evans et al., Methods of Screening Modulators of Opiod Receptor Activity, patent Mỹ số 6,432,652; Christopher Evans et al., Opioid Receptors and Methods of Use, patent Mỹ số

7,282,563; và Christopher Evans et al., Delta Opioid Receptor Proteins, đơn xin cấp patent Mỹ số 2008/0219925, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. Các ví dụ khác về thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thụ thể galanin 1, thụ thể galanin 2 và thụ thể galanin 3. Các thụ thể opioit có trong tự nhiên từ các loài động vật có xương sống khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, ví dụ, linh trưởng, bò, chó, chuột, chuột cống, gà, cá và có thể được sử dụng theo các khía cạnh của sáng chế.

ORL1 có trong tự nhiên, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 hoặc một trình tự thay thế, làm khuyết hoặc bổ sung, ví dụ, 1 axit amin hoặc nhiều hơn, 2 axit amin hoặc nhiều hơn, 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 4 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 6 axit amin hoặc nhiều hơn, 7 axit amin hoặc nhiều hơn, 8 axit amin hoặc nhiều hơn, 9 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 30 axit amin hoặc nhiều hơn, 40 axit amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 100 axit amin hoặc nhiều hơn so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25 hoặc SEQ ID NO: 26. DOR có trong tự nhiên, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28 hoặc một trình tự thay thế, làm khuyết hoặc bổ sung ví dụ, 1 axit amin hoặc nhiều hơn, 2 axit amin hoặc nhiều hơn, 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 4 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 6 axit amin hoặc nhiều hơn, 7 axit amin hoặc nhiều hơn, 8 axit amin hoặc nhiều hơn, 9 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 30 axit amin hoặc nhiều hơn, 40 axit amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 100 axit amin hoặc nhiều hơn so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27 hoặc SEQ ID NO: 28. KOR có trong tự nhiên, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30 hoặc một trình tự mà thay thế, làm khuyết hoặc bổ sung ví dụ, 1 axit amin hoặc nhiều hơn, 2 axit amin hoặc nhiều hơn, 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 4 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 6 axit amin hoặc nhiều hơn, 7 axit amin hoặc nhiều hơn, 8 axit amin hoặc nhiều hơn, 9 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 30 axit amin hoặc nhiều hơn, 40 axit amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 100 axit amin hoặc nhiều hơn so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29 hoặc SEQ ID

NO: 30. MOR có trong tự nhiên, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, SEQ ID NO: 31 hoặc một trình tự mà thay thế, làm khuyết hoặc bổ sung ví dụ, 1 axit amin hoặc nhiều hơn, 2 axit amin hoặc nhiều hơn, 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 4 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 6 axit amin hoặc nhiều hơn, 7 axit amin hoặc nhiều hơn, 8 axit amin hoặc nhiều hơn, 9 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 30 axit amin hoặc nhiều hơn, 40 axit amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 100 axit amin hoặc nhiều hơn so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31.

Thụ thể galanin 1 có trong tự nhiên, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thụ thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 và SEQ ID NO: 138 hoặc một trình tự mà thay thế, làm khuyết hoặc bổ sung ví dụ, 1 axit amin hoặc nhiều hơn, 2 axit amin hoặc nhiều hơn, 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 4 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 6 axit amin hoặc nhiều hơn, 7 axit amin hoặc nhiều hơn, 8 axit amin hoặc nhiều hơn, 9 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 30 axit amin hoặc nhiều hơn, 40 axit amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 100 axit amin hoặc nhiều hơn so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 hoặc SEQ ID NO: 138. Thụ thể galanin 2 có trong tự nhiên, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thụ thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139 hoặc một trình tự mà thay thế, làm khuyết hoặc bổ sung ví dụ, 1 axit amin hoặc nhiều hơn, 2 axit amin hoặc nhiều hơn, 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 4 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 6 axit amin hoặc nhiều hơn, 7 axit amin hoặc nhiều hơn, 8 axit amin hoặc nhiều hơn, 9 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 30 axit amin hoặc nhiều hơn, 40 axit amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 100 axit amin hoặc nhiều hơn so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139. Thụ thể galanin 3 có trong tự nhiên, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự nêu trong SEQ ID NO: 140 hoặc một trình tự mà thay thế, làm khuyết hoặc bổ sung ví dụ, 1 axit amin hoặc nhiều hơn, 2 axit amin hoặc nhiều hơn, 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 4 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 6 axit amin hoặc nhiều hơn, 7 axit amin hoặc nhiều hơn, 8 axit amin hoặc nhiều hơn, 9 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 30 axit amin hoặc nhiều hơn, 40 axit

amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 100 axit amin hoặc nhiều hơn so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 140.

Theo sáng chế, thuật ngữ "biến thể thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên" dùng để chỉ thụ thể endopeptidaza tái hướng đích bất kỳ được tạo ra nhờ sự trợ giúp bởi thao tác hoặc thiết kế của con người, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền bằng cách sử dụng kỹ thuật đột biến ngẫu nhiên hoặc thiết kế hợp lý và thụ thể endopeptidaza tái hướng đích được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học. Các ví dụ không giới hạn về các biến thể của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên bao gồm, ví dụ, các biến thể thụ thể endopeptidaza tái hướng đích bảo toàn, các biến thể thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không bảo toàn, các biến thể khảm của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích và các mảnh thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có hoạt tính.

Theo sáng chế, thuật ngữ "thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên" dùng để chỉ thụ thể endopeptidaza tái hướng đích bất kỳ mà cấu trúc của nó đã được cải biến nhờ sự trợ giúp bởi thao tác của con người, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích được sản xuất bằng kỹ thuật di truyền bằng cách sử dụng kỹ thuật đột biến ngẫu nhiên hoặc thiết kế hợp lý và thụ thể endopeptidaza tái hướng đích được tạo ra bằng sự tổng hợp *in vitro*. Thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên có thể thay thế, làm khuyết hoặc bổ sung ví dụ, 1 axit amin hoặc nhiều hơn, 2 axit amin hoặc nhiều hơn, 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 4 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 6 axit amin hoặc nhiều hơn, 7 axit amin hoặc nhiều hơn, 8 axit amin hoặc nhiều hơn, 9 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 30 axit amin hoặc nhiều hơn, 40 axit amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc 100 axit amin hoặc nhiều hơn so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 140.

Vì vậy, theo một phương án, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích là một thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên chẳng hạn, ví dụ, ORL1, DOR, KOR hoặc MOR. Theo các khía cạnh của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng

đích này là đồng phân thụ thể endopeptidaza tái hướng đích hoặc kiểu phụ thụ thể endopeptidaza tái hướng đích. Theo các khía cạnh của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 hoặc SEQ ID NO: 31. Theo các khía cạnh khác của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên, ví dụ, có mức độ tương đồng về trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 hoặc SEQ ID NO: 31.

Theo một phương án khác, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên, chẳng hạn, ví dụ, ORL1 được thiết kế di truyền, DOR được thiết kế di truyền, KOR được thiết kế di truyền hoặc MOR được thiết kế di truyền. Theo các khía cạnh khác của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích này là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên, ví dụ, có mức độ tương đồng về mặt trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 hoặc SEQ ID NO: 31. Theo các khía cạnh khác của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích này là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên ví dụ, có 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung axit amin không liền kề so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 hoặc SEQ ID NO: 31. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích này là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên ví dụ, có 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều

hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung axit amin liền kề so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 hoặc SEQ ID NO: 31.

Theo một phương án khác, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên chẳng hạn, ví dụ, thụ thể galanin 1, thụ thể galanin 2 hoặc thụ thể galanin 3. Theo các khía cạnh của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích là đồng phân của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích hoặc kiểu phụ của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích. Theo các khía cạnh của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên này là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 hoặc SEQ ID NO: 140. Theo các khía cạnh khác của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên, ví dụ, có mức độ tương đồng về trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 hoặc SEQ ID NO: 140.

Theo một phương án khác, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích này là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên, chẳng hạn, ví dụ, thụ thể galanin 1 được thiết kế di truyền, thụ thể galanin 2 được thiết kế di truyền hoặc thụ thể galanin 3 được thiết kế di truyền. Theo các khía cạnh khác của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên, ví dụ, có mức độ tương đồng về mặt trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 hoặc SEQ ID NO: 140. Theo các khía cạnh khác của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích là một thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên ví dụ, có 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung axit amin không liền kề so với trình tự nêu trong SEQ ID

NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 hoặc SEQ ID NO: 140. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích này là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên ví dụ, có 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung axit amin liền kề so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 hoặc SEQ ID NO: 140.

Thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có thể là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh hoặc thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh. Theo sáng chế, thuật ngữ "thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh" dùng để chỉ thụ thể endopeptidaza tái hướng đích xuất hiện tự nhiên trong tế bào vì nó được mã hóa tự nhiên trong hệ gen của tế bào đó, để cho tế bào này vốn đã biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích mà không cần nguồn thụ thể endopeptidaza tái hướng đích bên ngoài hoặc nguồn vật liệu di truyền bên ngoài mã hóa thụ thể endopeptidaza tái hướng đích này. Việc biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh có thể cần hoặc không cần kích thích từ môi trường chẳng hạn ví dụ, biệt hóa tế bào hoặc kích hoạt đoạn khởi đầu phiên mã. Lấy ví dụ, các dòng tế bào đã thiết lập sau đây biểu hiện ít nhất một thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh: AGN P33, Neuro-2a, SiMa và SK-N-DZ. Thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh có thể chỉ là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên hoặc các biến thể có trong tự nhiên của nó.

Theo sáng chế, thuật ngữ "thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh" dùng để chỉ thụ thể endopeptidaza tái hướng đích được biểu hiện trong tế bào thông qua việc đưa một nguồn thụ thể endopeptidaza tái hướng đích bên ngoài hoặc nguồn vật liệu di truyền bên ngoài mã hóa thụ thể endopeptidaza tái hướng đích bởi thao tác của con người. Việc biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh này có thể cần hoặc không cần kích thích từ môi trường chẳng hạn, ví dụ, biệt hóa tế bào hoặc kích hoạt đoạn khởi đầu phiên mã. Là một ví dụ không giới hạn, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập có thể biểu hiện một hoặc nhiều thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh bằng cách chuyển nhiễm ổn định hoặc tạm thời phân tử polynucleotit mã

hóa thụ thể endopeptidaza tái hướng đích đó, chẳng hạn, ví dụ, ORL1, DOR, KOR, MOR, thụ thể galanin 1, thụ thể galanin 2 hoặc thụ thể galanin 3. Là một ví dụ không giới hạn khác, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập có thể biểu hiện một hoặc nhiều thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh bằng cách chuyển nhiễm protein của các thụ thể endopeptidaza tái hướng đích này, chẳng hạn, ví dụ, ORL1, DOR, KOR, MOR, thụ thể galanin 1, thụ thể galanin 2 hoặc thụ thể galanin 3. Thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh có thể là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên hoặc các biến thể có trong tự nhiên của nó hoặc thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên hoặc các biến thể không có trong tự nhiên của nó.

Vì vậy, theo một phương án, tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh. Theo các khía cạnh của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh được biểu hiện bởi các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên. Theo một khía cạnh khác của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh được biểu hiện bởi các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập này có trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 140. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh được biểu hiện bởi các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên, chẳng hạn, ví dụ, đồng phân của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích hoặc kiểu phụ của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích. Theo các khía cạnh khác của phương án này, thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh được biểu hiện bởi các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập là thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên, ví dụ, có mức độ tương đồng về mặt trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 140.

Theo một phương án khác, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh.

Theo một khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên có trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 140. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên, chẳng hạn, ví dụ, đồng phân của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích hoặc kiểu phụ của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích có trong tự nhiên, ví dụ, có mức độ tương đồng về mặt trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 140.

Theo một khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên, ví dụ, có mức độ tương đồng về mặt trình tự axit amin ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 140. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên ví dụ, có 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều

hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung không liền kề so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 140. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích không có trong tự nhiên ví dụ, có 1 hoặc nhiều hơn, 2 hoặc nhiều hơn, 3 hoặc nhiều hơn, 4 hoặc nhiều hơn hoặc 5 hoặc nhiều hơn, 6 hoặc nhiều hơn, 7 hoặc nhiều hơn, 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn hoặc 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 40 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn hoặc 100 hoặc nhiều hơn đoạn thay thế, đoạn khuyết hoặc đoạn bổ sung axit amin liền kề so với trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 140.

Theo một phương án khác, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện ORL1 ngoại sinh, DOR ngoại sinh, KOR ngoại sinh, MOR ngoại sinh hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện ORL1 có trong tự nhiên, DOR có trong tự nhiên, KOR có trong tự nhiên, MOR có trong tự nhiên hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện ORL1 không có trong tự nhiên, DOR không có trong tự nhiên, KOR không có trong tự nhiên, MOR không có trong tự nhiên hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện ORL1 có trong tự nhiên hoặc ORL1 không có trong tự nhiên, DOR có trong tự nhiên hoặc DOR không có trong tự nhiên, KOR có trong tự nhiên hoặc KOR không có trong tự nhiên, MOR có trong tự nhiên hoặc MOR không có trong tự nhiên hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án khác nữa, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể galanin 1 ngoại sinh, thụ thể galanin 2

ngoại sinh, thụ thể galanin 3 ngoại sinh hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể galanin 1 có trong tự nhiên, thụ thể galanin 2 có trong tự nhiên, thụ thể galanin 3 có trong tự nhiên hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể galanin 1 không có trong tự nhiên, thụ thể galanin 2 không có trong tự nhiên, thụ thể galanin 3 không có trong tự nhiên hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập được thiết kế tạm thời hoặc ổn định để biểu hiện thụ thể galanin 1 có trong tự nhiên hoặc thụ thể galanin 1 không có trong tự nhiên, thụ thể galanin 2 có trong tự nhiên hoặc thụ thể galanin 2 không có trong tự nhiên, thụ thể galanin 3 có trong tự nhiên hoặc thụ thể galanin 3 không có trong tự nhiên hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng.

Các tế bào biểu hiện một hoặc nhiều thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh hoặc ngoại sinh có thể được xác định bằng các phương pháp thông thường bao gồm các thử nghiệm trực tiếp và gián tiếp để hấp thu endopeptidaza tái hướng đích. Các thử nghiệm xác định liên kết endopeptidaza tái hướng đích hoặc các tính chất hấp thu có thể được sử dụng để đánh giá xem liệu tế bào đó có biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích hay không. Các thử nghiệm như vậy gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thử nghiệm liên kết chéo bằng cách sử dụng endopeptidaza tái hướng đích được đánh dấu, chẳng hạn, ví dụ, endopeptidaza tái hướng đích [125I], ví dụ, xem: 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 Cl, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes, 29(2) Toxicon 261-264 (1991); và Tei-ichi Nishiki et al., Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes, 269(14) J. Biol. Chem. 10498-10503 (1994). Các thử nghiệm không giới hạn khác bao gồm các thử nghiệm hóa miễn dịch phát hiện liên kết endopeptidaza tái hướng đích bằng cách sử dụng các kháng thể được đánh dấu hoặc không đánh dấu, ví dụ, xem: Atsushi Nishikawa et al., The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells, 319(2) Biochem. Biophys. Res. Commun. 327-333 (2004) và thử nghiệm

kết tủa miễn dịch, ví dụ, xem: 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), phương pháp này phát hiện endopeptidaza tái hướng đích đã được liên kết bằng cách sử dụng các kháng thể được đánh dấu hoặc không được đánh dấu. Các kháng thể hữu ích đối với các thử nghiệm này gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể được lựa chọn dựa trên endopeptidaza tái hướng đích và/hoặc kháng thể được lựa chọn dựa trên thụ thể endopeptidaza tái hướng đích, chẳng hạn, ví dụ, ORL1, DOR, KOR, MOR, thụ thể galanin 1, thụ thể galanin 2 hoặc thụ thể galanin 3. Nếu kháng thể này được đánh dấu, thì liên kết của phân tử đó có thể phát hiện được bằng nhiều phương pháp khác nhau, bao gồm phân tích thẩm tách Western, quan sát trực tiếp vị trí kháng thể trong tế bào trên kính hiển vi, xác định kháng thể liên kết với tế bào hoặc cơ chất sau bước rửa, phương pháp đếm tế bào theo dòng, điện di hoặc điện di mao quản, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Nếu kháng thể không được đánh dấu, có thể sử dụng một phương pháp sử dụng kháng thể thứ cấp được đánh dấu để phát hiện gián tiếp phân tử đã được liên kết và việc phát hiện này có thể được thực hiện giống như đối với kháng thể được đánh dấu. Đã biết rằng các phương pháp này và các thử nghiệm tương tự mà xác định các tính chất hoặc đặc tính hấp thu endopeptidaza tái hướng đích này có thể hữu dụng trong việc xác định các tế bào biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh hoặc ngoại sinh.

Các thử nghiệm theo dõi việc giải phóng phân tử sau khi tiếp xúc với endopeptidaza tái hướng đích cũng có thể được sử dụng để đánh giá xem liệu một tế bào có biểu hiện một hoặc nhiều thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh hoặc ngoại sinh hay không. Theo các thử nghiệm này, việc ức chế sự giải phóng phân tử có thể xuất hiện trên các tế bào biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích sau khi xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích. Các thử nghiệm đã biết bao gồm các phương pháp xác định sự ức chế sự giải phóng catecholamin đã được đánh dấu phóng xạ ra khỏi các tế bào thần kinh, chẳng hạn, ví dụ, giải phóng [3H] noradrenalin hoặc [3H] dopamin, ví dụ, xem: 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); and 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) hoặc xác định sự giải phóng catecholamin bằng cách sử dụng phương pháp xác định huỳnh quang, ví dụ, xem: 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); và 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). Các ví dụ không giới hạn khác bao gồm các phương pháp đo sự ức chế sự giải phóng hormon ra khỏi tế bào nội tiết, chẳng hạn, ví dụ, tế bào tuyến yên phía trước hoặc tế bào buồng trứng. Đã biết rằng, các thử nghiệm này và các thử nghiệm tương tự về sự giải phóng phân tử có thể hữu dụng trong việc xác định các tế bào biểu hiện thụ thể nội sinh hoặc ngoại sinh hoặc endopeptidaza tái hướng đích.

Các thử nghiệm phát hiện sự phân cắt cơ chất SNAP-25 sau khi tiếp xúc với endopeptidaza tái hướng đích cũng có thể được sử dụng để đánh giá xem liệu một tế bào có biểu hiện một hoặc nhiều thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh hoặc ngoại sinh hay không. Theo các thử nghiệm này, việc tạo ra sản phẩm SNAP-25 phân cắt hoặc sự biến mất của SNAP-25 nguyên vẹn có thể phát hiện được trong các tế bào biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích sau khi xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích. Các ví dụ không giới hạn về phương pháp phân tích thẩm tách Western đặc hiệu, cũng như các chất phản ứng đặc trưng, điều kiện và quy trình chuẩn đã được các nhà cung cấp bán trên thị trường gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI và Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Đã biết rằng các thử nghiệm này và các thử nghiệm tương tự về sự phân cắt SNAP-25 có thể hữu dụng trong việc xác định tế bào biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh hoặc ngoại sinh.

Là các ví dụ không giới hạn, phân tích thẩm tách Western sử dụng kháng thể nhận diện sản phẩm SNAP-25 phân cắt ở cả dạng SNAP-25 được phân cắt hoặc không được phân cắt có thể được sử dụng để thử nghiệm sự hấp thu của endopeptidaza tái hướng đích. Các ví dụ về các kháng thể α-SNAP-25 hữu dụng đối với các thử nghiệm này gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng SMI-81 của chuột (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng CI 71.1 của chuột (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng CI 71.2 của chuột (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng SP12 của chuột (Abcam, Cambridge, MA), kháng thể α-SNAP-25 kháng huyết thanh đa dòng của thỏ (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), kháng thể α-SNAP-25 kháng huyết thanh đa dòng S9684 của thỏ (Sigma, St. Louis, MO) và kháng thể α-SNAP-25 kháng huyết thanh đa dòng của thỏ (Abcam, Cambridge, MA).

Các khía cạnh theo sáng chế đề cập đến các tế bào được tạo thành thông qua thao tác di truyền hoặc kỹ thuật tái tổ hợp để biểu hiện SNAP-25 ngoại sinh và/hoặc một hoặc nhiều thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh. Các tế bào hữu ích để biểu hiện SNAP-25 ngoại sinh và/hoặc một hoặc nhiều thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh thông qua thao tác di truyền hoặc kỹ thuật tái tổ hợp bao gồm tế bào thần kinh và tế bào không phải là tế bào thần kinh có thể hoặc không thể biểu hiện SNAP-25 nội sinh và/hoặc một hoặc nhiều thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh. Cũng biết rằng các tế bào được thao tác di truyền hoặc được tạo ra bằng công nghệ tái tổ hợp như vậy có thể biểu hiện SNAP-25 ngoại sinh và một hoặc nhiều thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh dưới sự kiểm soát yếu tố khởi đầu phiên mã, trình tự tăng cường có thể cảm ứng, đặc hiệu tế bào, đặc hiệu mô hoặc cơ bản hoặc cả hai. Đã biết rằng tế bào bất kỳ là hữu dụng miễn là tế bào này có thể được tạo ra bằng thao tác di truyền hoặc thiết kế tái tổ hợp để biểu hiện SNAP-25 ngoại sinh và/hoặc một hoặc nhiều thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh và có khả năng chịu hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích.

Các phương pháp hữu dụng để chuyển vào tế bào một phân tử polynucleotit ngoại sinh mã hóa thành phần cần thiết cho tế bào này để trải qua toàn bộ cơ chế tế bào, qua đó endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25, chẳng hạn, ví dụ, SNAP-25, ORL1, DOR, KOR hoặc MOR, gồm, nhưng

không chỉ giới hạn ở, phương pháp chuyển gen bằng hóa chất, chẳng hạn, ví dụ, phương pháp chuyển gen bằng canxi, bằng dextran dietyl-aminoetyl (DEAE), bằng lipit, bằng polyetyleneimin (PEI), bằng polylysin và bằng polybren; phương pháp chuyển gen bằng phương pháp vật lý, chẳng hạn, ví dụ, phân phối hạt biolistic, vi tiêm, dung hợp nguyên sinh chất và xung điện; và phương pháp chuyển gen thông qua virut, chẳng hạn, ví dụ, chuyển nhiễm bằng retrovirut, ví dụ, xem: 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); và Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, pp 9.16.4-9.16.11 (2000), mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng việc lựa chọn phương pháp đặc trưng để đưa một phân tử polynucleotit vào trong tế bào sẽ phụ thuộc, một phần, vào việc xác định xem liệu tế bào có chứa ổn định hoặc tạm thời thành phần cần thiết để tế bào này trải qua toàn bộ cơ chế tế bào, qua đó endopeptidaza tái hướng đích sẽ phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25. Các ví dụ không giới hạn về phân tử polynucleotit mã hóa thành phần cần thiết để tế bào này trải qua toàn bộ cơ chế tế bào, qua đó endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25 gồm có: phân tử polynucleotit ORL1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61 hoặc SEQ ID NO: 62; phân tử polynucleotit DOR có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63 hoặc SEQ ID NO: 64; phân tử polynucleotit KOR có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 65 hoặc SEQ ID NO: 66; phân tử polynucleotit MOR có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67; phân tử polynucleotit thụ thể galanin 1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 hoặc SEQ ID NO: 143, phân tử polynucleotit thụ thể galanin 2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 144 hoặc phân tử polynucleotit thụ thể galanin 3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 145 và phân tử polynucleotit SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 68 hoặc SEQ ID NO: 69.

Các phương pháp chuyển gen bằng hóa chất đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và đã được mô tả trong, ví dụ, 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), mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. Các phương pháp chuyển gen bằng hóa chất như vậy có thể được tạo ra bằng các quy trình chuẩn và được thương mại hóa, ví dụ, xem: bộ kit chuyển nhiễm CellPhect (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); bộ kit chuyển nhiễm vào động vật có vú, canxi phosphat và DEAE Dextran, (Stratagene, Inc., La Jolla, CA); tác nhân chuyển nhiễm Lipofectamine™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); bộ kit chuyển nhiễm ExGen 500 (Fermentas, Inc., Hanover, MD) và các bộ kit chuyển nhiễm SuperFect và Effectene (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

Các phương pháp chuyển gen bằng phương pháp vật lý là đã biết đối với những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong, ví dụ: 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); và Oliver Greschet al., New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells, 33(2) Methods 151-163 (2004), mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Các phương pháp chuyển gen thông qua virut là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và đã được mô tả trong, ví dụ, 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, patent Mỹ số 5,464,758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, Methods for Regulating Gene Expression, patent Mỹ số 5,814,618; David S. Hogness, Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same, patent Mỹ số 5,514,578; David S. Hogness, Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor, patent Mỹ số 6,245,531; Elisabetta Vegeto et al., Progesterone Receptor Having C. Terminal Hormone Binding Domain Truncations, patent Mỹ số 5,364,791; Elisabetta Vegeto et al., Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy, patent Mỹ số 5,874,534, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. Các phương pháp chuyển gen thông qua virut này có thể được thực hiện bằng các quy trình chuẩn và được thương mại hóa, ví dụ, xem: hệ biểu hiện adenovirut ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) và sổ tay hướng dẫn hệ thống biểu hiện Adenovirut ViraPower™ 25-0543 phiên bản A, Invitrogen, Inc., (15 tháng 07 năm 2002); và hệ thống vectơ Adenovirut AdEasy™ (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) và sổ tay hướng dẫn hệ thống vectơ Adenovirut AdEasy™ 064004f, Stratagene, Inc. Ngoài ra, các hệ chuyển gen thông qua virut này có thể được tạo ra bằng các phương pháp chuẩn và được thương mại hóa, ví dụ, xem: hệ biểu hiện gen BD™ Tet-Off và Tet-On (BD Biosciences-Clonetech, Palo Alto, CA) và sổ tay hướng dẫn sử dụng hệ biểu hiện gen BD™ Tet-Off và Tet-On, PT3001-1, BD Biosciences Clonetech, (14 tháng 03 năm 2003), hệ GeneSwitch™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) và hệ thống biểu hiện được điều hòa bằng Mifepriston hệ thống A GeneSwitch™ sử dụng cho tế bào động vật có vú phiên bản D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (4 tháng 11 năm 2002); hệ thống biểu hiện lentivirut ViraPower™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) và sổ tay hướng dẫn hệ thống biểu hiện lentivirut ViraPower™ 25-0501 phiên bản E, Invitrogen, Inc., (8 tháng 12 năm 2003); và hệ thống biểu hiện ở động vật có vú có thể cảm ứng retrovirut Complete Control® (Stratagene, La Jolla, CA) và sổ tay hướng dẫn hệ thống biểu hiện ở động vật có vú có thể cảm ứng retrovirut Complete Control®, 064005e.

Vì vậy, theo một phương án, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa tạm thời phân tử polynucleotit mã hóa thành phần cần thiết để các tế bào này trải qua toàn bộ cơ chế tế bào nhờ đó

endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25. Theo một phương án khác, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích tạm thời chứa phân tử polynucleotit mã hóa nhiều thành phần cần thiết để tế bào này trải qua toàn bộ cơ chế tế bào nhờ đó endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa tạm thời phân tử polynucleotit mã hóa ORL1, DOR, KOR, MOR hoặc SNAP-25. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa tạm thời phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61 hoặc SEQ ID NO: 62 mã hóa ORL1. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa tạm thời phân tử polynucleotit của SEQ ID NO: 63 hoặc SEQ ID NO: 64 mã hóa DOR. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa tạm thời phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 65 hoặc SEQ ID NO: 66 mã hóa KOR. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa tạm thời phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67 mã hóa MOR.

Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa tạm thời phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 hoặc SEQ ID NO: 143 mã hóa thụ thể galanin 1. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa tạm thời phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 144 mã hóa thụ thể galanin 2. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa tạm thời phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 145 mã hóa thụ thể galanin 3. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa tạm thời phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 68 hoặc SEQ ID NO: 69 mã hóa SNAP-25.

Theo một phương án khác, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa ổn định phân tử polynucleotit mã hóa một thành phần cần thiết để các tế bào này trải qua toàn bộ cơ chế tế bào nhờ đó endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25. Theo một phương án khác, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa ổn định phân tử polynucleotit mã hóa nhiều thành phần cần thiết để các tế bào này trải qua toàn bộ cơ chế tế bào nhờ đó endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa ổn định phân tử polynucleotit mã hóa ORL1, DOR, KOR, MOR hoặc SNAP-25. Theo các khía cạnh của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa ổn định phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61 hoặc SEQ ID NO: 62 mã hóa ORL1. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa ổn định phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63 hoặc SEQ ID NO: 64 mã hóa DOR. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa ổn định phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 65 hoặc SEQ ID NO: 66 mã hóa KOR. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa ổn định phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67 mã hóa MOR.

Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa ổn định phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 hoặc SEQ ID NO: 143 mã hóa thụ thể galanin 1. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa ổn định phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 144 mã hóa thụ thể galanin 2. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa ổn định phân tử polynucleotit của có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 145 mã hóa thụ thể galanin 3. Theo các khía cạnh khác của phương án này, các tế bào từ dòng tế bào đã

thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích chứa ổn định phân tử polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 68 hoặc SEQ ID NO: 69 mã hóa SNAP-25.

Như đã đề cập ở trên, thành phần ngoại sinh cần thiết để các tế bào trải qua toàn bộ cơ chế tế bào trong đó endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25, chẳng hạn, ví dụ, SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, thụ thể galanin 1, thụ thể galanin 2 hoặc thụ thể galanin 3, được bộc lộ theo sáng chế có thể được đưa vào tế bào. Phương pháp bất kỳ và tất cả các phương pháp hữu dụng để chuyển thành phần gen ngoại sinh như vậy với tác nhân chuyển gen vào quần thể tế bào có thể hữu dụng miễn là phương pháp này chuyển được tạm thời thành phần ngoại sinh được bộc lộ theo sáng chế này vào ít nhất nhất 50% tế bào vào trong quần thể tế bào đã cho. Vì vậy, các khía cạnh theo phương án này có thể bao gồm quần thể tế bào, trong đó, ví dụ, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80% hoặc ít nhất là 90% quần thể tế bào đã cho tạm thời chứa thành phần ngoại sinh cần thiết để các tế bào này trải qua toàn bộ cơ chế tế bào nhờ đó endopeptidaza tái hướng đích phân cắt bằng phân giải protein cơ chất SNAP-25, chẳng hạn, ví dụ, SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, thụ thể galanin 1, thụ thể galanin 2 hoặc thụ thể galanin 3, được bộc lộ theo sáng chế. Theo sáng chế, thuật ngữ "tác nhân chuyển gen" dùng để chỉ phân tử bất kỳ có khả năng hoặc tăng cường sự nội bào hóa liên kết cộng hóa trị, liên kết không cộng hóa trị hoặc theo các cách bất kỳ khác kết hợp với polypeptit trong tế bào. Vì vậy, thuật ngữ "tác nhân chuyển gen" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các protein, peptit, giả peptit, phân tử nhỏ, phân tử polynucleotit, liposom, lipit, virut, retrovirut và tế bào mà, nhưng không chỉ giới hạn ở, vận chuyển phân tử liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị với màng tế bào, tế bào chất hoặc nhân. Còn được hiểu là, thuật ngữ "tác nhân chuyển gen" bao gồm các phân tử được nội bào hóa bởi cơ chế bất kỳ, bao gồm các tác nhân chuyển gen có chức năng thông qua sự nhập bào qua trung gian thụ thể và các tác nhân độc lập với sự nhập bào qua trung gian thụ thể.

Tác nhân chuyển gen cũng có thể là tác nhân cho phép hoặc tăng cường sự hấp thu tế bào của thành phần liên kết cộng hóa trị, giống SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, thụ thể galanin 1, thụ thể galanin 2 hoặc thụ thể galanin 3, chẳng hạn, ví dụ, bằng cách tiếp hợp hóa học hoặc bằng các protein dung hợp được tạo ra theo cách di

truyền. Các phương pháp mà liên kết cộng hóa trị với tác nhân chuyển gen và các phương pháp sử dụng các tác nhân này đã được mô tả trong, ví dụ: Steven F. Dowdy, Protein Transduction System and Methods of Use Thereof, WO 00/34308; Gérard Chassaing & Alain Prochiantz, Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules, patent Mỹ số 6,080,724; Alan Frankel et al., Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiert, patent Mỹ số 5,674,980; Alan Frankel et al., TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates, patent Mỹ số 5,747,641; Alan Frankel et al., TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins, patent Mỹ số 5,804,604; Peter F. J. O'Hare et al., Use of Transport Proteins, patent Mỹ số 6,734,167; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, patent Mỹ số 5,807,746; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, patent Mỹ số 6,043,339; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, patent Mỹ số 6,248,558; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, patent Mỹ số 6,432,680; Jack J. Hawiger et al., Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells, patent Mỹ số 6,495,518; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, patent Mỹ số 6,780,843; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes, patent Mỹ số 6,306,993; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes, patent Mỹ số 6,495,663; và Pamela B. Davis et al., Fusion Proteins for Protein Delivery, patent Mỹ số 6,287,817, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Một tác nhân chuyển gen cũng có thể là một tác nhân cho phép hoặc tăng cường sự hấp thu thành phần liên kết không phải cộng hóa trị trong tế bào, như SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, thụ thể galanin 1, thụ thể galanin 2 hoặc thụ thể galanin 3. Các phương pháp thực hiện chức năng khi không có liên kết cộng hóa trị và các phương pháp sử dụng các tác nhân như vậy được mô tả trong, ví dụ, Gilles Divita et al, Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use, patent Mỹ số 6,841,535; Philip L Felgner and Olivier Zelphati, Intracellular Protein Delivery Compositions and

Methods of Use, đơn xin cấp patent Mỹ số 2003/0008813; và Michael Karas, Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2004/0209797, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. Các tác nhân chuyển peptit như vậy có thể được tạo ra và sử dụng bởi các phương pháp chuẩn và được thương mại hóa, ví dụ, xem: chất phản ứng CHARIOT™ (Active Motif, Carlsbad, CA); chất phản ứng BIO-PORTER® (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA), chất phản ứng chuyển protein BIO TREK™ (Stratagene, La Jolla, CA) và chất phản ứng chuyển nhiễm protein PRO-JECT™ (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích. Theo sáng chế, thuật ngữ "mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích" dùng để chỉ vật liệu sinh học bất kỳ chứa hoặc có tiềm năng chứa endopeptidaza tái hướng đích có hoạt tính. Các mẫu khác nhau có thể được thử nghiệm theo phương pháp được bộc lộ theo sáng chế gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, endopeptidaza tái hướng đích đã tinh sạch, tinh sạch một phần hoặc không tinh sạch; endopeptidaza tái hướng đích chuỗi đơn hoặc chuỗi đôi tái tổ hợp với trình tự có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên; endopeptidaza tái hướng đích tổ hợp có tính đặc hiệu proteaza được cải biến; endopeptidaza tái hướng đích tái tổ hợp có tính đặc hiệu tế bào thay đổi; endopeptidaza tái hướng đích số lượng lớn; sản phẩm endopeptidaza tái hướng đích được bào chế; và tế bào hoặc các dịch dung giải tế bào ở dạng thô, được phân đoạn hoặc dịch dung giải tế bào được tinh sạch một phần, thu được, ví dụ, từ nguồn vi khuẩn, nấm men, côn trùng hoặc động vật có vú; máu, huyết thanh hoặc huyết tương; thực phẩm sống, thực phẩm nấu chín, thực phẩm nấu chưa chín hoặc thực phẩm đã được chế biến; đồ uống; thức ăn cho động vật; các mẫu đất; mẫu nước; cặn bùn; thuốc bôi da; mỹ phẩm; và các chế phẩm điều trị lâm sàng. Cũng được hiểu rằng, thuật ngữ mẫu này bao gồm cả các mẫu mô, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các mẫu mô ở động vật có vú, các mẫu mô của vật nuôi chẳng hạn như mẫu mô của cừu, bò và lợn; các mẫu mô của động vật linh trưởng; và các mẫu mô của người. Các mẫu này cũng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các mẫu ruột chẳng hạn như các mẫu ruột non và các mẫu mô thu được từ vết thương. Trong các ví dụ không giới hạn, phương pháp phát hiện lượng hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích ở mức pico mol có thể là hữu ích để phát hiện sự có mặt của hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích trong mẫu thực

phẩm hoặc đồ uống; để thử nghiệm mẫu từ người hoặc động vật, lấy ví dụ, mà tiếp xúc với endopeptidaza tái hướng đích hoặc có một hoặc nhiều triệu chứng ngộ độc *Clostridium botulinum* (botulism); theo dõi hoạt động trong quá trình sản xuất và tinh sạch endopeptidaza tái hướng đích số lượng lớn; để thử nghiệm sản phẩm endopeptidaza tái hướng đích đã bào chế được sử dụng trong các ứng dụng dược phẩm hoặc mỹ phẩm; hoặc thử nghiệm trong huyết thanh máu của đối tượng xem liệu có hoặc không có kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích.

Vì vậy, theo một phương án, mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích là mẫu chứa lượng endopeptidaza tái hướng đích bất kỳ. Theo các khía cạnh của phương án này, mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích có lượng endopeptidaza tái hướng đích trong khoảng 100ng hoặc thấp hơn, khoảng 10ng hoặc thấp hơn, khoảng 1ng hoặc thấp hơn, khoảng 100pg hoặc thấp hơn, khoảng 10pg hoặc thấp hơn hoặc khoảng 1pg hoặc thấp hơn. Theo các khía cạnh khác của phương án này, mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích có lượng endopeptidaza tái hướng đích khoảng 1μM hoặc thấp hơn, khoảng 100nM hoặc thấp hơn, khoảng 10nM hoặc thấp hơn, khoảng 1nM hoặc thấp hơn, khoảng 100nM hoặc thấp hơn, khoảng 10nM hoặc thấp hơn, khoảng 1nM hoặc thấp hơn.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến việc phân lập từ tế bào đã được xử lý thành phần SNAP-25 chứa SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Theo sáng chế, thuật ngữ "thành phần SNAP-25 chứa SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A" dùng để chỉ thành phần tế bào chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt. Được dự định là phương pháp bất kỳ thích hợp để làm giàu hoặc phân lập thành phần SNAP-25 có thể hữu dụng, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các quy trình chuẩn dung giải tế bào, các quy trình tinh sạch bằng cột ly tâm, kết tủa miễn dịch, tinh sạch ái lực và sắc ký protein.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến kháng thể α-SNAP-25 được liên kết với giá thể pha rắn. Theo sáng chế, thuật ngữ "giá thể pha rắn" đồng nghĩa với "pha rắn" dùng để chỉ chất nền bất kỳ có thể sử dụng để cố định kháng thể α-SNAP-25 được bộc lộ theo sáng chế. Các ví dụ không giới hạn về các giá thể pha rắn bao gồm, ví dụ, giá thể dạng ống, dạng đĩa, dạng cột, dạng ghim hoặc "que thử"; hạt từ tính, dạng hạt hoặc chất có thuộc tính sắc ký dạng sợi hoặc hình cầu, chẳng hạn, ví dụ,

agaroza, sepharoza, silic dioxit và nhựa; và các tấm hoặc màng, chẳng hạn, ví dụ, nitroxenluloza và polyvinylidin florua (PVDF). Giá thể pha rắn này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều loại vật liệu khác nhau, chẳng hạn, ví dụ, thủy tinh, cacbon, polystyren, polyvinylclorua, polypropylen, polyetylen, dextran, nylon, diazoxenluloza hoặc tinh bột. Giá thể pha rắn được lựa chọn có thể có tính chất vật lý làm cho nó có thể tách dễ dàng khỏi vật liệu tan hoặc không liên kết và nói chung cho phép các vật liệu không được liên kết, chẳng hạn, ví dụ, các chất phản ứng dư, các sản phẩm phụ phản ứng hoặc các dung môi, có thể được tách hoặc loại bỏ (ví dụ, bằng cách rửa, lọc, ly tâm, v.v..) ra khỏi thành phần thử nghiệm liên kết với giá thể pha rắn. Các ví dụ không giới hạn về cách tạo ra và sử dụng các giá thể pha rắn đã được mô tả trong, ví dụ: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, nêu trên, (2001); và Current Protocols in Molecular Biology, nêu trên, (2004), mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến việc phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 mà liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A và sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Được dự định là hệ thống phát hiện bất kỳ có thể sử dụng để thực hiện các khía cạnh của phương pháp trên cơ sở miễn dịch đã được bộc lộ này, với điều kiện là tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu có thể phân biệt được ở mức có ý nghĩa về mặt thống kê của phức kháng nguyên-kháng thể so với tín hiệu nền. Các ví dụ không giới hạn về các hệ thống phát hiện trên cơ sở miễn dịch bao gồm phân tích thấm miễn dịch, giống thấm tách Western và thấm tách điểm, phân tích kết tủa miễn dịch, thử nghiệm chất hấp thụ miễn dịch gắn enzym (ELISA) và ELISA kiểu bánh kẹp. Việc phát hiện tín hiệu này có thể thu được bằng cách sử dụng phóng xạ tự ghi (autoradiography: AU) tạo ảnh hoặc tạo ảnh bằng ánh sáng, quang hóa (chemiluminescense: CL), điện quang hóa (electrochemiluminescence: ECL), phát quang sinh học (bioluminescence: BL), phát huỳnh quang, truyền năng lượng cộng hưởng, đo mặt phẳng phân cực, đo màu hoặc phương pháp đếm tế bào theo dòng (flow cytometry - FC). Phần mô tả các hệ thống phát hiện trên cơ sở miễn dịch này đã được mô tả trong các tài liệu, ví dụ, 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. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004), mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

ELISA kiểu bánh kẹp (hoặc thử nghiệm miễn dịch kiểu bánh kẹp) là một phương pháp dựa trên hai kháng thể, các kháng thể này liên kết với các epitop khác nhau trên kháng nguyên đó. Kháng thể thu giữ có tính đặc hiệu liên kết cao đối với kháng nguyên đang quan tâm, được liên kết với bề mặt rắn. Tiếp đó kháng nguyên này được bổ sung và sau đó bổ sung kháng thể thứ hai được đề cập đến dưới dạng kháng thể phát hiện. Kháng thể phát hiện này liên kết kháng nguyên với một epitop khác ngoài kháng thể thu giữ. Do đó, kháng nguyên này bị 'kẹp' giữa hai kháng thể. Ái lực liên kết kháng thể đối với kháng nguyên đó thường là yếu tố quyết định chính đến độ nhạy của thử nghiệm miễn dịch đó. Do nồng độ kháng nguyên tăng, lượng kháng thể phát hiện tăng dẫn đến đáp ứng đo được cao hơn. Để định lượng, các hệ chất chỉ thị liên kết khác nhau có thể sử dụng, chẳng hạn, ví dụ, enzym gắn vào kháng thể thứ cấp và cơ chất chỉ thị khi mà phản ứng enzym này tạo thành tín hiệu chỉ thị dưới dạng tín hiệu phát hiện. Tín hiệu được tạo ra tỷ lệ thuận với lượng kháng nguyên đích có mặt trong mẫu đó. Cơ chất chỉ thị được sử dụng để đo hiện tượng liên kết xác định phương thức phát hiện. Thiết bị đọc đĩa quang phổ kế được sử dụng để phát hiện đo màu. Cơ chất quang hóa và quang điện đã được phát triển, cơ chất này khuyếch đại thêm tín hiệu và có thể đọc được bằng thiết bị đo cường độ quang. Chất chỉ thị cũng có thể là chất hiển thị huỳnh quang, ở đó bước thể hiện hoạt tính enzym của thử nghiệm được thay thế bằng chất phát huỳnh quang và sau đó chất hiển thị được xác định bằng thiết bị đọc huỳnh quang. Các chất phản ứng và quy trình cần thiết để thực hiện ELISA kiểu bánh kẹp ECL đã được thương mại hóa, bao gồm, không ngoại trừ, ECL-ELISA kiểu bánh kẹp MSD làm nền tảng phát hiện (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

Vì vậy, theo một phương án, việc phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A và sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phân tích thấm miễn dịch, phân tích kết tủa miễn dịch, ELISA hoặc ELISA kiểu bánh kẹp. Theo các khía cạnh của phương án này, việc phát hiện được tiến hành bằng cách sử dụng phân tích thấm miễn dịch AU, CL, ECL hoặc BL, phân tích kết tủa miễn dịch AU, CL, ECL, BL hoặc FC, ELISA AU, CL, ECL, BL hoặc FC hoặc ELISA kiểu kẹp AU, CL, ECL, BL hoặc FC.

Các khía cạnh theo sáng chế có thể được thực hiện theo mô hình một thành phần hoặc đa thành phần. Phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích được thực hiện theo mô hình một thành phần là một phương pháp chỉ để phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích được thực hiện theo mô hình đa thành phần là phương pháp phát hiện đồng thời sự có mặt của hai hoặc nhiều phức kháng nguyên-kháng thể; một trong số đó là phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; và (các) phức khác là phức kháng nguyên-kháng thể với protein thứ hai, ba, bốn, v.v.. khác nhau. Protein thứ hai có thể được sử dụng, ví dụ, là đối chứng nội để giảm thiểu sự thay đổi của mẫu bằng cách chuẩn hóa lượng phức kháng nguyên-kháng thể α-SNAP-25/SNAP-25 phát hiện được so với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được đối với protein thứ hai. Như vậy, protein thứ hai thường là một protein được biểu hiện nhất quán bởi tế bào, chẳng hạn như protein quản gia. Các ví dụ không giới hạn về protein thứ hai hữu dụng, bao gồm, ví dụ, Glyxeraldehyt-3-Phosphat Dehydrogenaza (GAPDH), Syntaxin, xytokin. Các phương pháp tiến hành thử nghiệm trên cơ sở miễn dịch theo mô hình đa thành phần đã được mô tả trong, ví dụ, xem: 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), mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Vì vậy, theo một phương án, phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích được thực hiện theo mô hình một thành phần chỉ để phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Theo một phương án khác, phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích thực hiện theo mô hình đa thành phần để đồng thời phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A và ít nhất một phức kháng nguyên-kháng thể khác với một protein khác SNAP-25, chẳng hạn, ví dụ, GAPDH hoặc Syntaxin.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định tính kháng miễn dịch của endopeptidaza tái hướng đích. Theo sáng chế, thuật ngữ "tính kháng miễn dịch của endopeptidaza tái hướng đích" có nghĩa là động vật có vú không đáp ứng hoàn toàn với phương pháp điều trị bằng endopeptidaza tái hướng đích hoặc thể hiện tác dụng có lợi giảm của phương pháp điều trị bằng endopeptidaza tái hướng đích do sự đáp ứng miễn dịch của động vật có vú đó trực tiếp hoặc gián tiếp, làm giảm hiệu quả của phương pháp điều trị này. Một ví dụ không giới hạn về hiệu quả giảm sẽ xuất hiện ở động vật có vú có ít nhất một kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích liên kết với endopeptidaza tái hướng đích theo cách làm giảm hoặc ngăn chặn tính đặc hiệu hoặc hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích đó. Theo sáng chế, thuật ngữ "phương pháp điều trị bằng endopeptidaza tái hướng đích" có nghĩa là việc điều trị, cứu chữa, chữa bệnh, làm lành, phục hồi chức năng hoặc các nghĩa bất kỳ khác chống lại những tác dụng không mong muốn ở động vật có vú cần điều hòa thần kinh bằng cách sử dụng endopeptidaza tái hướng đích hoặc cho động vật có vú dùng một hoặc nhiều liều được kiểm soát của dược phẩm, chế phẩm hoặc dạng phối trộn của

endopeptidaza tái hướng đích mà có tác dụng chữa bệnh, điều trị bệnh, chữa bệnh, trang điểm, chữa bệnh hoặc tác dụng có lợi bất kỳ khác. Phương pháp điều trị bệnh bằng endopeptidaza tái hướng đích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng mảnh đã được cải biến hoặc có trong tự nhiên bất kỳ, ở dạng chế phẩm bất kỳ, được kết hợp với chất mang hoặc hoạt chất bất kỳ và được sử dụng bằng đường dùng bất kỳ.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến mẫu thử nghiệm thu được từ động vật có vú để kiểm tra sự có mặt hoặc không có mặt của các kháng thể trung hoà α-endopeptidaza tái hướng đích. Theo sáng chế, thuật ngữ "mẫu thử nghiệm" dùng để chỉ vật liệu sinh học bất kỳ chứa hoặc có khả năng chứa ít nhất một kháng thể α-endopeptidaza tái hướng đích. Kháng thể α-endopeptidaza tái hướng đích này có thể là kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích hoặc kháng thể không trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích. Theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích" có nghĩa là kháng thể α-endopeptidaza tái hướng đích bất kỳ, trong các điều kiện sinh lý, liên kết với vùng endopeptidaza tái hướng đích theo cách để làm giảm hoặc ngăn chặn endopeptidaza tái hướng đích không tạo ra tác dụng trong phương pháp điều trị bằng endopeptidaza tái hướng đích. Theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể không trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích" có nghĩa là kháng thể α-endopeptidaza tái hướng đích bất kỳ mà kháng thể này, trong điều kiện sinh lý, sẽ liên kết với vùng của endopeptidaza tái hướng đích, nhưng không ngăn chặn endopeptidaza tái hướng đích tạo ra tác dụng trong liệu pháp điều trị bằng endopeptidaza tái hướng đích. Được dự định là mẫu bất kỳ và tất cả các mẫu chứa các kháng thể α-endopeptidaza tái hướng đích có thể được sử dụng trong phương pháp này gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, máu, huyết thanh, huyết tương và dịch bạch huyết. Ngoài ra, sinh vật bất kỳ và tất cả các sinh vật có khả năng sinh ra kháng thể α-endopeptidaza tái hướng đích kháng lại endopeptidaza tái hướng đích có thể thích hợp làm nguồn mẫu, gồm nhưng không giới hạn ở, chim và động vật có vú, bao gồm chuột, chuột cống, dê, cừu, ngựa, lừa, bò, động vật linh trưởng và người. Các ví dụ không giới hạn về các quy trình chuẩn cụ thể để thu máu và tạo ra huyết thanh đã được mô tả trong, ví dụ: Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, BLOOD COLLECTION IN HEALTHCARE (F.A. Davis Company, 2001); và Diana Garza & Kathleen Becan-McBride, PHLEBOTOMY HANDBOOK: BLOOD COLLECTION

ESSENTIALS (Prentice Hall, 6th ed., 2002). Các quy trình chuẩn này là các quy trình thông thường đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và đã được hướng dẫn ở đây. Mẫu thử nghiệm có thể thu được từ sinh vật trước khi tiếp xúc với endopeptidaza tái hướng đích, sau khi điều trị một lần bằng endopeptidaza tái hướng đích, sau khi điều trị nhiều lần bằng endopeptidaza tái hướng đích, trước khi bắt đầu kháng lại liệu pháp điều trị bằng endopeptidaza tái hướng đích hoặc sau khi bắt đầu kháng lại liệu pháp điều trị bằng endopeptidaza tái hướng đích.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến mẫu đối chứng. Theo sáng chế, thuật ngữ "mẫu đối chứng" có nghĩa là mẫu bất kỳ trong đó đã biết rõ là có hoặc không có mẫu thử nghiệm và bao gồm cả mẫu đối chứng âm và mẫu đối chứng dương. Đối với các kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích, mẫu đối chứng âm có thể thu được từ cá thể chưa từng tiếp xúc với endopeptidaza tái hướng đích và có thể chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở, mẫu từ cùng cá thể cung cấp mẫu thử nghiệm, nhưng được lấy trước khi điều trị bằng liệu pháp endopeptidaza tái hướng đích; mẫu được lấy từ cá thể khác nhau chưa từng tiếp xúc với endopeptidaza tái hướng đích; mẫu gộp chung được lấy từ nhiều cá thể khác nhau chưa từng tiếp xúc với BoNT/A. Đối với các kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích, mẫu đối chứng dương có thể thu được từ cá thể có biểu hiện endopeptidaza tái hướng đích kháng miễn dịch và gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cá thể thử nghiệm dương tính trong các thử nghiệm kiểm tra trên bệnh nhân; cá thể thử nghiệm dương tính trong thử nghiệm sinh học *in vivo*; và cá thể có biểu hiện siêu miễn dịch, ví dụ, cá thể được chủng ngừa vacxin endopeptidaza tái hướng đích.

Cũng được dự định là các kháng thể α-endopeptidaza tái hướng đích có thể được tinh sạch từ mẫu. Các kháng thể α-endopeptidaza tái hướng đích có thể được tinh sạch từ mẫu bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sắc ký protein A/G và sắc ký ái lực. Các ví dụ không giới hạn về các quy trình chuẩn cụ thể nhằm tinh sạch các kháng thể từ mẫu đã được mô tả trong, ví dụ, 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); và MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, nêu trên, (2001), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Ngoài ra, các ví dụ không giới hạn

về các phương pháp tinh sạch kháng thể cũng như các chất phản ứng đã biết rõ đặc tính, các điều kiện và quy trình chuẩn đã được các nhà cung cấp bán trên thị trường gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; và Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA. Các quy trình này là những quy trình thông thường đã biết nằm trong hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Vì vậy, theo một phương án, mẫu chứa máu. Theo một khía cạnh của phương án này, mẫu này bao gồm máu chuột, máu chuột cống, máu dê, máu cừu, máu ngựa, máu lừa, máu bò, máu động vật linh trưởng hoặc máu người. Theo một phương án khác, mẫu này chứa huyết thanh. Theo một khía cạnh của phương án này, mẫu thử nghiệm này bao gồm huyết thanh chuột, huyết thanh chuột cống, huyết thanh dê, huyết thanh cừu, huyết thanh ngựa, huyết thanh lừa, huyết thanh bò, huyết thanh động vật linh trưởng hoặc huyết thanh người. Theo một phương án khác, mẫu chứa huyết tương. Theo một khía cạnh của phương án này, mẫu này bao gồm huyết tương chuột, huyết tương chuột cống, huyết tương dê, huyết tương cừu, huyết tương ngựa, huyết tương lừa, huyết tương bò, huyết tương động vật linh trưởng và huyết tương người. Theo một phương án khác, mẫu này chứa dịch bạch huyết. Theo một khía cạnh của phương án này, mẫu này bao gồm dịch bạch huyết chuột, dịch bạch huyết chuột cống, dịch bạch huyết dê, dịch bạch huyết cừu, dịch bạch huyết ngựa, dịch bạch huyết lừa, dịch bạch huyết bò, dịch bạch huyết động vật linh trưởng hoặc dịch bạch huyết người. Theo một phương án khác nữa, mẫu là mẫu thử nghiệm. Theo một phương án khác nữa, mẫu là mẫu đối chứng. Theo các khía cạnh của phương án này, mẫu đối chứng là mẫu đối chứng âm hoặc mẫu đối chứng dương.

Theo các khía cạnh, một phần, sáng chế đề cập đến việc so sánh lượng SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A phát hiện được trong bước (d) với lượng SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A phát hiện được trong bước (e). Theo một phương án, lượng sản phẩm SNAP-25 phân cắt trong mẫu thử nghiệm là cao hơn khi so với lượng sản phẩm SNAP-25 phân cắt trong mẫu đối chứng. Theo một khía cạnh của phương án này, lượng sản phẩm SNAP-25 phân cắt trong mẫu thử nghiệm là cao hơn so với mẫu đối chứng dương chỉ ra rằng có sự giảm hoặc không có endopeptidaza tái hướng đích kháng miễn dịch ở động vật có vú. Theo một khía

cạnh khác của phương án này, lượng sản phẩm SNAP-25 phân cắt trong mẫu thử nghiệm là tương đương so với mẫu đối chứng âm chỉ ra rằng có sự giảm hoặc không có endopeptidaza tái hướng đích kháng miễn dịch ở động vật có vú. Theo một phương án khác, lượng sản phẩm SNAP-25 phân cắt trong mẫu thử nghiệm là thấp hơn so với lượng sản phẩm SNAP-25 phân cắt trong mẫu đối chứng. Theo một khía cạnh của phương án này, lượng sản phẩm SNAP-25 phân cắt trong mẫu thử nghiệm là thấp hơn hoặc tương đương so với mẫu đối chứng dương chỉ ra rằng có sự tăng hoặc có mặt endopeptidaza tái hướng đích kháng miễn dịch ở động vật có vú đó. Theo một khía cạnh khác của phương án này, lượng sản phẩm SNAP-25 phân cắttrong mẫu thử nghiệm là thấp hơn so với mẫu đối chứng âm chỉ ra rằng có sự tăng hoặc có mặt endopeptidaza tái hướng đích kháng miễn dịch ở động vật có vú đó.

Được dự định là điều kiện bất kỳ và toàn bộ các điều kiện thử nghiệm thích hợp để phát hiện sự có mặt của kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích trong mẫu là hữu dụng trong các phương pháp được bộc lộ theo sáng chế, chẳng hạn, ví dụ, các điều kiện thử nghiệm tuyến tính và các điều kiện thử nghiệm phi tuyến tính. Theo một phương án, các điều kiện thử nghiệm này là tuyến tính. Theo một khía cạnh của phương án này, lượng endopeptidaza tái hướng đích thử nghiệm là dư thừa. Theo một khía cạnh khác của phương án này, lượng endopeptidaza tái hướng đích thử nghiệm có tỷ lệ giới hạn. Theo một khía cạnh khác của phương án này, lượng mẫu thử nghiệm thử nghiệm có tỷ lệ giới hạn.Các khía cạnh theo sáng chế cũng có thể được mô tả như sau:

1. Phương pháp phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập này mẫn cảm với hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích bởi endopeptidaza tái hướng đích; b) phân lập từ tế bào được xử lý thành phần SNAP-25 chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng ở vị trí phân cắt của BoNT/A; c) cho thành phần SNAP-25 tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng ở vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; và d) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và

sản phẩm SNAP-25 phân cắt; trong đó việc phát hiện phức kháng nguyên-kháng thể chỉ ra hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích.

2. Phương pháp phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập này mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bởi endopeptidaza tái hướng đích; b) phân lập từ tế bào được xử lý thành phần SNAP-25 chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng ở vị trí phân cắt của BoNT/A; c) cho thành phần SNAP-25 tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25 được liên kết với giá thể pha rắn, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng ở vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; và d) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt; trong đó việc phát hiệnbằng phức kháng nguyên-kháng thể chỉ ra hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích.

3. Phương pháp phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập này mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích của endopeptidaza tái hướng đích; b) phân lập từ tế bào được xử lý này thành phần SNAP-25 chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; c) cố định thành phần SNAP-25 lên giá thể pha rắn; d) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; và e) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt; trong đó việc phát hiện bằng phức kháng nguyên-kháng thể chỉ ra hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích đó.

4. Phương pháp phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích; b) phân lập từ tế bào được xử lý này thành phần SNAP-25 chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có

thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; c) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; và d) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt; trong đó việc phát hiện bằng phức kháng nguyên-kháng thể chỉ ra hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích đó.

5. Phương pháp phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập này có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích; b) phân lập từ tế bào được xử lý này thành phần SNAP-25 chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; c) chothành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25 liên kết với giá thể pha rắn, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; và d) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt; trong đó việc phát hiện bằng phức kháng nguyên-kháng thể chỉ ra hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích đó.

6. Phương pháp phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích; b) phân lập từ tế bào được xử lý này thành phần SNAP-25 chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; c) cố định thành phần SNAP-25 lên giá thể pha rắn; d) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; và e) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt; trong đó việc phát hiện bằng phức kháng nguyên-kháng thể chỉ ra hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích đó.

7. Phương pháp xác định endopeptidaza tái hướng đích kháng miễn dịch ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) bổ sung endopeptidaza tái hướng đích vào mẫu thử nghiệm thu được từ động vật có vú để kiểm tra sự có mặt hoặc không có mặt của các kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; b) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu thử nghiệm, trong đó tế bào này thu được từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích; c) phân lập từ tế bào được xử lý này thành phần SNAP-25 bao gồm sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; d) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; e) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt; f) lặp lại các bước từ b) đến e) đối với mẫu đối chứng âm thay cho mẫu thử nghiệm, trong đó mẫu đối chứng âm này chứa endopeptidaza tái hướng đích và huyết thanh đã biết không chứa kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; và g) so sánh lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước e) với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f), trong đó lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước e) thấp hơn so với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f) chỉ ra là có kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích.

8. Phương pháp xác định endopeptidaza tái hướng đích kháng miễn dịch ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) bổ sung endopeptidaza tái hướng đích vào mẫu thử nghiệm thu được từ động vật có vú để kiểm tra sự có mặt hoặc không có mặt của các kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; b) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu thử nghiệm, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập là mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích; c) phân lập từ tế bào được xử lý này thành phần SNAP-25 bao gồm sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; d) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25 liên kết với giá thể pha rắn, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; e) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-

endopeptidaza tái hướng đích và sản phẩm SNAP-25 phân cắt; f) lặp lại các bước từ b) đến e) đối với mẫu đối chứng âm thay cho mẫu thử nghiệm, trong đó mẫu đối chứng âm này chứa endopeptidaza tái hướng đích và huyết thanh không chứa kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; và g) so sánh lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước e) với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f), trong đó lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước e) thấp hơn so với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f) chỉ ra là có kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích.

9. Phương pháp xác định endopeptidaza tái hướng đích kháng miễn dịch ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) bổ sung endopeptidaza tái hướng đích vào mẫu thử nghiệm thu được từ động vật có vú để kiểm tra xem có hoặc không có kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; b) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu thử nghiệm này, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích; c) phân lập từ các tế bào được xử lý này thành phần SNAP-25 chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; d) cố định thành phần SNAP-25 lên giá thể pha rắn; e) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; f) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt; g) lặp lại các bước từ b) đến f) với mẫu đối chứng âm thay cho mẫu thử nghiệm, trong đó mẫu đối chứng âm này chứa endopeptidaza tái hướng đích và huyết thanh không chứa kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; và h) so sánh lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f) với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước g), trong đó lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f) thấp hơn so với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước g) chỉ ra là có kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích.

10. Phương pháp xác định endopeptidaza tái hướng đích kháng miễn dịch ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) bổ sung endopeptidaza tái hướng đích vào mẫu thử nghiệm thu được từ động vật có vú để kiểm tra có hay không có các kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; b) xử lý tế bào từ dòng tế

bào đã thiết lập bằng mẫu thử nghiệm, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập này có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích; c) phân lập từ các tế bào được xử lý này thành phần SNAP-25 chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; d) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; e) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt; f) lặp lại các bước từ b) đến e) đối với mẫu đối chứng âm thay cho mẫu thử nghiệm, mẫu đối chứng âm này chứa endopeptidaza tái hướng đích và huyết thanh đã biết là không chứa các kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; và g) so sánh lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước e) với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f), trong đó lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước e) thấp hơn so với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f) chỉ ra là có kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích.

11. Phương pháp xác định endopeptidaza tái hướng đích kháng miễn dịch ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) bổ sung endopeptidaza tái hướng đích vào mẫu thử nghiệm thu được từ động vật có vú để kiểm tra xem có hay không có các kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; b) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu thử nghiệm, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập này có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích; c) phân lập từ các tế bào được xử lý này thành phần SNAP-25 chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; d) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25 được liên kết với giá thể pha rắn, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; e) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt; f) lặp lại các bước từ b) đến e) đối với mẫu đối chứng âm thay cho mẫu thử nghiệm, mẫu đối chứng âm này chứa endopeptidaza tái hướng đích và huyết thanh không chứa kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; và g) so sánh lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước e)

với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f), trong đó lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước e) thấp hơn so với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f) chỉ ra rằng có kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích.

12. Phương pháp xác định endopeptidaza tái hướng đích kháng miễn dịch ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) bổ sung endopeptidaza tái hướng đích vào mẫu thử nghiệm thu được từ động vật có vú để kiểm tra có hay không có các kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; b) xử lý tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập bằng mẫu thử nghiệm này, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập có thể hấp thu endopeptidaza tái hướng đích; c) phân lập từ các tế bào được xử lý này thành phần SNAP-25 chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A; d) cố định thành phần SNAP-25 lên giá thể pha rắn; e) cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; f) phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt; g) lặp lại các bước từ b) đến f) với mẫu đối chứng âm thay cho mẫu thử nghiệm, trong đó mẫu đối chứng âm này chứa endopeptidaza tái hướng đích và huyết thanh không chứa kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích; và h) so sánh lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f) với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước g), trong đó lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước f) thấp hơn so với lượng phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được trong bước g) chỉ ra là có kháng thể trung hòa α-endopeptidaza tái hướng đích.

13. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 3 và từ 7 đến 9, trong đó tế bào này mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích với lượng endopeptidaza tái hướng đích khoảng 500nM hoặc thấp hơn, khoảng 400nM hoặc thấp hơn, khoảng 300nM hoặc thấp hơn, khoảng 200nM hoặc thấp hơn, khoảng 100nM hoặc thấp hơn.14. Phương pháp nêu trong các mục từ 4 đến 6 và từ 10 đến 12, trong đó tế bào này có thể hấp thu một lượng endopeptidaza tái hướng đích khoảng 500nM hoặc thấp hơn, khoảng 400nM hoặc thấp hơn, khoảng 300nM hoặc thấp hơn, khoảng 200nM hoặc thấp hơn, khoảng 100nM hoặc thấp hơn.

15. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 6, trong đó mẫu này chứa một lượng endopeptidaza tái hướng đích khoảng 100ng hoặc thấp hơn, khoảng 10ng hoặc thấp hơn, khoảng 1ng hoặc thấp hơn, 100fg hoặc thấp hơn, 10fg hoặc thấp hơn hoặc 1fg hoặc thấp hơn.

16. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 6, trong đó mẫu này chứa một lượng endopeptidaza tái hướng đích khoảng 100nM hoặc thấp hơn, khoảng 10nM hoặc thấp hơn, khoảng 1nM hoặc thấp hơn, khoảng 100nM hoặc thấp hơn, khoảng 10nM hoặc thấp hơn, khoảng 1nM hoặc thấp hơn, khoảng 0,5nM hoặc thấp hơn hoặc khoảng 0,1nM hoặc thấp hơn.

17. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 12, trong đó sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể được phát hiện bằng phân tích thẩm tách miễn dịch, phân tích kết tủa miễn dịch, ELISA hoặc ELISA kiểu bánh kẹp.

18. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 12, trong đó phương pháp này có tỷ lệ tín hiệu với tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận dưới là ít nhất 3:1, ít nhất 5:1, ít nhất 10:1, ít nhất 20:1, ít nhất 50:1 hoặc ít nhất 100:1.

19. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 12, trong đó phương pháp này có tỷ lệ tín hiệu với tín hiệu nhiễu đối với tiệm cận trên là ít nhất 10:1, ít nhất 20:1, ít nhất 50:1, ít nhất 100:1, ít nhất 200:1, ít nhất 300:1, ít nhất 400:1, ít nhất 500:1 hoặc ít nhất 600:1.20. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 12, trong đó phương pháp này có thể phát hiện hoạt tính EC_{50} của endopeptidaza tái hướng đích, ví dụ, ít nhất 100ng, ít nhất 50ng, ít nhất 10ng, ít nhất 5ng, ít nhất 100pg, ít nhất 50pg, ít nhất 10pg, ít nhất 5pg, ít nhất 100fg, ít nhất 50fg, ít nhất 10fg hoặc ít nhất 5fg.

21. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 12, trong đó phương pháp này có thể phát hiện hoạt tính EC_{50} của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, ít nhất 10nM, ít nhất 5nM, ít nhất 100nM, ít nhất 50nM, ít nhất 10nM, ít nhất 5nM, ít nhất 1 nM, ít nhất 0,5nM hoặc ít nhất 0,1nM.

22. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 12, trong đó phương pháp này có LOD của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 10pg hoặc thấp hơn, 9pg hoặc thấp hơn, 8pg hoặc thấp hơn, 7pg hoặc thấp hơn, 6pg hoặc thấp hơn, 5pg hoặc thấp hơn, 4pg hoặc thấp hơn, 3pg hoặc thấp hơn, 2pg hoặc thấp hơn, 1pg hoặc thấp hơn.

23. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 12, trong đó phương pháp này có LOD của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 100nM hoặc thấp hơn, 90nM hoặc thấp

hơn, 80nM hoặc thấp hơn, 70nM hoặc thấp hơn, 60nM hoặc thấp hơn, 50nM hoặc thấp hơn, 40nM hoặc thấp hơn, 30nM hoặc thấp hơn, 20nM hoặc thấp hơn hoặc 10nM hoặc thấp hơn.

24. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 12, trong đó phương pháp này có LOQ của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 10pg hoặc thấp hơn, 9pg hoặc thấp hơn, 8pg hoặc thấp hơn, 7pg hoặc thấp hơn, 6pg hoặc thấp hơn, 5pg hoặc thấp hơn, 4pg hoặc thấp hơn, 3pg hoặc thấp hơn, 2pg hoặc thấp hơn, 1pg hoặc thấp hơn.

25. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 12, trong đó phương pháp này có LOQ của endopeptidaza tái hướng đích là, ví dụ, 100nM hoặc thấp hơn, 90nM hoặc thấp hơn, 80nM hoặc thấp hơn, 70nM hoặc thấp hơn, 60nM hoặc thấp hơn, 50nM hoặc thấp hơn, 40nM hoặc thấp hơn, 30nM hoặc thấp hơn, 20nM hoặc thấp hơn hoặc 10nM hoặc thấp hơn.

26. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 12, trong đó phương pháp này có thể phân biệt được endopeptidaza tái hướng đích có hoạt tính toàn phần từ endopeptidaza tái hướng đích có hoạt tính một phần, có 70% hoặc thấp hơn, 60% hoặc thấp hơn, 50% hoặc thấp hơn, 40% hoặc thấp hơn, 30% hoặc thấp hơn, 20% hoặc thấp hơn hoặc 10% hoặc thấp hơn so hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích A có hoạt tính toàn phần.

27. Phương pháp nêu trong các mục từ 1 đến 12, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A trong sản phẩm SNAP-25 phân cắt.

28. Phương pháp nêu trong mục 27, trong đó kháng thể α-SNAP-25 này có hằng số tốc độ kết hợp đối với một epitop không chứa glutamin ở đầu carboxyl của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt là nhỏ hơn $1 \times 10^1 M^{-1} s^{-1}$; và trong đó kháng thể α-SNAP-25 này có hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng đối với epitop đó là nhỏ hơn 0,450nM.

29. Phương pháp nêu trong mục 27, trong đó kháng thể α-SNAP-25 được phân tách này có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80 và SEQ ID NO: 82; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 và SEQ ID NO: 92.

30. Phương pháp nêu trong mục 27, trong đó kháng thể α-SNAP-25 được phân tách này chứa ít nhất V_H CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 93, V_H CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 94, V_H CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 95, V_H CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 118, V_H CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 119 hoặc V_H CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 120.

32. Phương pháp nêu trong mục 27, trong đó kháng thể α-SNAP-25 được phân lập này chứa ít nhất V_H CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 96, V_H CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 97, V_H CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 98, V_H CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 99, V_H CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 121, V_H CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 122 hoặc V_H CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 123.

33. Phương pháp nêu trong mục 27, trong đó kháng thể α-SNAP-25 được phân lập này chứa ít nhất V_H CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 100, V_H CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 101, V_H CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 102 hoặc V_H CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 124.

34. Phương pháp nêu trong mục 27, trong đó kháng thể α-SNAP-25 được phân lập này chứa ít nhất V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 103, V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 104, V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 105, V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 106, V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 107, V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 125, V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 126, V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 127, V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 128 hoặc V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 129.

35. Phương pháp nêu trong mục 27, trong đó kháng thể α-SNAP-25 được phân lập này chứa ít nhất V_L CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 108, V_L CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 109, V_L CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 110, V_L CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 111 hoặc V_L CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 112.

36. Phương pháp nêu trong mục 27, trong đó kháng thể α-SNAP-25 được phân lập này chứa ít nhất V_L CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 113, V_L CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 114, V_L CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 115, V_L

CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 116 hoặc V_L CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 117.

37. Phương pháp nêu trong mục 27, trong đó kháng thể α-SNAP-25 được phân lập này có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 121 và SEQ ID NO: 100; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110 và SEQ ID NO: 115.

38. Phương pháp nêu trong mục 27, trong đó kháng thể α-SNAP-25 được phân lập này liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 148.

39. Phương pháp nêu trong mục 27, trong đó kháng thể α-SNAP-25 được phân lập này liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 hoặc SEQ ID NO: 44.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sàng lọc các dòng tế bào ứng viên để biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích nội sinh

Các ví dụ sau đây nhằm minh họa cách nhận biết các dòng tế bào đã thiết lập có khả năng hấp thu endopeptidaza tái hướng đích, cần thiết để phát triển thử nghiệm hiệu lực trên cơ sở tế bào.

1. Phát triển các dòng tế bào ứng viên từ giống gốc

Để phát triển các dòng tế bào, cấy một mật độ tế bào thích hợp của dòng tế bào được kiểm tra vào bình nuôi cấy mô diện tích 162cm^2 chứa 30mL môi trường sinh trưởng thích hợp (xem Bảng 1) và để phát triển trong tủ ủ 37°C có 5% hoặc 10% cacbon dioxit cho đến khi tế bào đạt được mật độ mong muốn.

Bảng 1. Các môi trường được sử dụng để sàng lọc dòng tế bào

Dòng tế bào	**Thành phần môi trường sinh trưởng chứa huyết thanh**
Các dòng SiMa và SiMa	RPMI 1640, huyết thanh bào thai bò 10%, Penixilin-Streptomyxin 1%, L-Glutamin 2mM
PC12	RPMI 1640, huyết thanh bào thai bò đã được bất hoạt bởi nhiệt 5%, huyết thanh ngựa 10%, GlutaMAX™ 2mM, HEPES 10mM, natri pyruvat 1mM, Penixilin-Streptomyxin 1%

Dòng tế bào	Thành phần môi trường sinh trưởng chứa huyết thanh
N18 ND8/34 NG108-15	DMEM 90%, huyết thanh bào thai bò đã được bất hoạt bởi nhiệt 10%, Glutamin 2mM, glucoza 2mM
SK-N-DZ SK-N-F1 SK-N-SH	DMEM 90%, huyết thanh bào thai bò đã được bất hoạt bởi nhiệt 10%, Glutamin 4mM, glucoza 4mM, axit amin không thiết yếu 0,1mM, $NaHCO_3$ 1,5g/L
BE(2)-C SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM(11090-081, Gibco), Ham's F12 (11765-054, Gibco), huyết thanh bào thai bò đã được bất hoạt bởi nhiệt 10%, Glutamin 2mM, axit amin không thiết yếu 0,1mM,
ND3, ND7, ND15	Môi trường DMEM chứa Glutamin 2mM (Invitrogen, Cat #. 11885), huyết thanh bào thai bò 10% (Invitrogen, Cat #. 16140) và 1x kháng thể/kháng nấm
Tế bào thần kinh-2a	EMEM, huyết thanh bào thai bò đã được bất hoạt bởi nhiệt 10%, Glutamin 2mM, axit amin không thiết yếu 0,1mM, $NaHCO_3$ 1,5g/L, natri pyruvat 1mM

2. Sàng lọc các tế bào biểu hiện thụ thể đích trên bề mặt tế bào

Các dòng tế bào được sàng lọc về sự có mặt của thụ thể đích mong muốn bằng cách sử dụng thử nghiệm đếm tế bào theo dòng và/hoặc liên kết phối tử. Mặc dù các ví dụ dưới đây có sử dụng các chất phản ứng để nhận biết opioit hoặc thụ thể tương tự opioit trên màng tế bào chất, nhưng các phương pháp được trình bày dưới đây có thể được sử dụng để nhận dạng thụ thể cùng nguồn gốc đối với endopeptidaza tái hướng đích bất kỳ.

a. Nhận dạng dòng tế bào bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng

Để nhận dạng các tế bào chứa các dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện các thụ thể đích cho endopeptidaza tái hướng đích trên bề mặt tế bào, tiến hành phân tích đếm tế bào theo dòng. Các tế bào của từng dòng tế bào ứng viên này sinh trưởng như đã mô tả trong phần 1, được xử lý bằng trypson, rửa trong đệm nhuộm chứa 1 x PBS, BSA 0,5% và ly tâm ở 1200 vòng/phút trong thời gian 3 phút. Các tế bào đã tạo viên kết này được tạo huyền phù lại trong đệm nhuộm và khoảng 2,0 x 10^6 tế bào được chuyển vào các ống mới, mỗi thụ thể được tiến hành kiểm tra trong hai ống. Để sàng lọc sự có mặt của opioit hoặc thụ thể giống opioit, từ khoảng 2,0 đến 5,0µL α-ORL-1 RA14133 (Neuromics, Edina, MN), kháng thể α-DOR đa dòng RA10101 của thỏ (Neuromics,

Edina, MN), kháng thể α-KOR đa dòng RA10103 của thỏ (Neuromics, Edina, MN) hoặc kháng thể α-MOR đa dòng RA10104 của thỏ (Neuromics, Edina, MN), được bổ sung vào một ống và phức hợp này được ủ tại 4 °C trong thời gian 1 giờ. Ống thứ hai được ủ ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 1 giờ trong điều kiện không có kháng thể bất kỳ để làm đối chứng âm. Sau khi ủ kháng thể này, 1,0mL đệm nhuộm được bổ sung vào mỗi ống và ly tâm tại 1200 vòng/phút trong thời gian 3 phút. Cặn tế bào này được rửa một lần nữa với 1,0mL đệm nhuộm. Cặn tế bào này được tái huyền phù trong 200µL đệm nhuộm và 2,0µL kháng thể IgG FITC của dê kháng thỏ được bổ sung vào từng ống và ủ ở 4°C trong thời gian 1 giờ trong điều kiện tối. Sau khi ủ với kháng thể thứ cấp, 1,0mL đệm nhuộm được bổ sung vào mỗi ống và ly tâm tại 1200 vòng/phút trong thời gian 3 phút. Cặn tế bào này được rửa một lần nữa với 1,0mL đệm nhuộm và viên kết này được tạo huyền phù lại trong 500µL đệm nhuộm. Mẫu này được phân tích bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng và dữ liệu này được hiển thị là lớp phủ kháng thể kháng thụ thể nhuộm màu trong quá trình nhuộm màu IgG FITC của thỏ.

Kết quả thu được đã chỉ ra rằng trong số các dòng tế bào được kiểm tra, ORL-1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào của khoảng 50% tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập SiMa, SiMa P>33, dòng H10, ND7 và SK-N-DZ; được biểu hiện trên bề mặt tế bào trong khoảng 25% đến khoảng 50% tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập SH-SY5Y và ND15; và được biểu hiện trên bề mặt tế bào thấp hơn khoảng 25% tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập ND3, ND8, N18 và Neuro-2a (Bảng 2). Kết quả này cũng chỉ ra rằng KOR được biểu hiện trên bề mặt tế bào của khoảng 50% tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập SH-SY5Y và ND7; được biểu hiện trên bề mặt tế bào trong khoảng 25% đến khoảng 50% tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập SiMa dòng H10, SiMa P>33, ND15 và Neuro-2a; và được biểu hiện trên bề mặt tế bào thấp hơn khoảng 25% của tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập ND3, ND8 và N18 (Bảng 2). Kết quả này cũng chỉ ra là MOR được biểu hiện trên bề mặt tế bào của khoảng 50% tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập ND7, ND15 và SiMa P>33; được biểu hiện trên bề mặt tế bào trong khoảng 25% đến khoảng 50% tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập SH-SY5Y, SiMa dòng H10, ND8 và Neuro-2a; và được biểu hiện trên bề mặt tế bào thấp hơn khoảng 25% của tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập ND3 và N18 (Bảng 2). Kháng thể α-DOR đa dòng RA10101 của thỏ không hoạt động chính xác và không thu được dữ liệu có thể sử dụng được.

b. Nhận dạng các dòng tế bào bằng cách sử dụng liên kết phối tử

Để nhận dạng các tế bào chứa các dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện các thụ thể đích cho endopeptidaza tái hướng đích trên bề mặt tế bào, tiến hành phân tích liên kết phối tử. Các tế bào từ dòng tế bào ứng viên được kiểm tra và cấy trên đĩa 96 lỗ có đáy trong màu đen trong khoảng thời gian 4 giờ để thúc đẩy sự gắn kết. Để sàng lọc sự có mặt của opioit hoặc các thụ thể tương tự opioit, hút môi trường từ từng lỗ và thay thế bằng 50µL dung dịch phối tử chứa 0 (đối chứng không xử lý), FAM-nociceptin 0,001nM, 0,01nM, 0,1nM hoặc 1nM (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA); hoặc 0 (đối chứng không xử lý), FAM-dynorphin A 0,001nM, 0,01nM, 0,1nM hoặc 1nM (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA). Tế bào này được ủ với dung dịch phối tử trong thời gian 1 giờ tại nhiệt độ 37°C trong tủ ủ chứa 5% cacbon dioxit. Các tế bào này được rửa để loại bỏ phối tử không liên kết bằng cách rửa các tế bào này 3 lần với 100µL 1 x PBS. Đĩa này được quét trên máy Typhoon (Ex 488 và Em 520 nm) và tiếp đó được đọc trên thiết bị đọc đĩa M5 (M5 Plate Reader) (Ex 495 và Em 520 nm) đối với các tín hiệu RFU. Các kết quả này chỉ ra rằng các tế bào chứa dòng SiMa, các dòng tế bào đã thiết lập H10, SH-SY5Y và SK-N-DZ liên kết với nociceptin, trong khi các tế bào chứa SiMa dòng H10 cũng liên kết với Dynorphin (Bảng 2).

Bảng 2. Các dòng tế bào biểu hiện các thụ thể đích trên bề mặt tế bào

Thụ thể đích	**Dòng tế bào được xác định**				
	Đếm tế bào theo dòng			**Liên kết phối tử**	
	Biểu hiện trên 50%	**Biểu hiện từ 25% đến 50%**	**Biểu hiện dưới 50%**	**Nociceptin**	**Dynorphin A**
ORL-1	AGN P33, SiMa, SiMa dòng H10, ND7, SK-N-DZ	SH-SY5Y, ND15	ND3, ND8, N18, Neuro-2a	SiMa dòng H10, SH-SY5Y, SK-N-DZ	-
DOR	ND	ND	ND	ND	ND
KOR	SH-SY5Y, ND7	SiMa dòng H10, AGN P33, ND15, Neuro-2a	ND3, ND8, N18	-	SiMa dòng H10

Bảng 2. Các dòng tế bào biểu hiện các thụ thể đích trên bề mặt tế bào

Thụ thể đích	Dòng tế bào được xác định				
	Đếm tế bào theo dòng			Liên kết phối tử	
	Biểu hiện trên 50%	Biểu hiện từ 25% đến 50%	Biểu hiện dưới 50%	Nociceptin	Dynorphin A
MOR	ND7, ND15, AGN P33	SH-SY5Y, SiMa dòng H10, ND8, Neuro-2a	ND3, N18	ND	ND

Sử dụng cách tiếp cận tương tự, các dòng tế bào chứa các tế bào có các thụ thể có cùng nguồn gốc đối với các endopeptidaza tái hướng đích khác có thể được nhận dạng bằng cách đánh dấu FAM vùng đích đối với các endopeptidaza này và sàng lọc các dòng tế bào như được mô tả ở trên.

3. Sàng lọc liều dùng đơn của các dòng tế bào ứng viên bằng cách sử dụng phân tử endopeptidaza tái hướng đích

Để xác định xem liệu một dòng tế bào có thể hấp thu phân tử endopeptidaza tái hướng đích thích hợp hay không, cấy một mật độ tế bào thích hợp từ giống gốc của dòng tế bào được kiểm tra vào các lỗ của các đĩa nuôi cấy mô 24 lỗ chứa 1mL môi trường sinh trưởng chứa huyết thanh thích hợp (Bảng 1). Tế bào này được cho sinh trưởng trong tủ ủ ở nhiệt độ 37°C có 5% cacbon dioxit cho đến khi tế bào đạt được mật độ mong muốn (khoảng từ 18 đến 24 giờ). Để đánh giá sự hấp thu của endopeptidaza tái hướng đích opioit, môi trường sinh trưởng trong các lỗ này được hút ra và thay thế bằng hoặc là 1) môi trường sinh trưởng mới không chứa endopeptidaza tái hướng đích opioit (dòng tế bào không được xử lý) hoặc là bằng 2) môi trường sinh trưởng mới chứa 30nM endopeptidaza tái hướng đích nociceptin (Noc/A) hoặc 100nM endopeptidaza tái hướng đích dynorphin (Dyn/A) (dòng tế bào được xử lý). Sau khi ủ qua đêm, các tế bào này được rửa bằng cách hút môi trường sinh trưởng và súc rửa mỗi lỗ này bằng 200µL 1 x PBS. Để thu các tế bào này, 1 x PBS được hút ra, tế bào này được dung giải bằng cách bổ sung 50µL 2 x SDS đệm nạp mẫu, dịch dung giải tế bào này được chuyển vào ống thử nghiệm sạch và mẫu này được gia nhiệt đến nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút.

Để phát hiện sự có mặt của cả cơ chất SNAP-25 không bị phân cắt và các sản phẩm SNAP-25 phân cắt, phần mẫu đại diện từ mỗi mẫu đã được thu được phân tích

bằng kỹ thuật thẩm tách Western. Trong phân tích này, 12µL phần mẫu đại diện của mẫu thu được này được tách bằng kỹ thuật điện di trên gel MOPS polyacrylamit bằng cách sử dụng các gel polyacrylamit đúc sẵn Bis-Tris NuPAGE® Novex 12% (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) trong điều kiện khử, biến tính. Các peptit đã phân tách này được chuyển từ gel lên màng polyvinyliden florua (PVDF) (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) bằng thẩm tách Western bằng cách sử dụng thiết bị điện chuyển tế bào nửa khô TRANS-BLOT® SD (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Các màng PVDF được phong bế bằng cách ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ trong dung dịch chứa đệm muối Tris (TBS) (axit 2-amino-2-hydroxymetyl-1,3-propandiol hydrocloric 25mM (Tris-HCl) (độ pH=7,4), natri clorua 137mM, kali clorua 2,7mM), TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat), albumin huyết thanh bò (BSA) 2%, sữa bột tách béo 5%. Màng đã phong bế này được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm trong TBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat), BSA 2% và sữa bột tách béo 5% chứa hoặc là 1) kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng của chuột được pha loãng dưới dạng kháng thể sơ cấp (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD) với tỷ lệ 1:5.000; hoặc 2) kháng thể đa dòng α-SNAP-25 kháng huyết thanh S9684 của thỏ được pha loãng dưới dạng kháng thể sơ cấp (Sigma, St. Louis, MO) với tỷ lệ 1:5.000. Cả hai kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng của chuột và kháng thể đa dòng của thỏ này có thể phát hiện được cả cơ chất SNAP-25 không bị phân cắt và sản phẩm SNAP-25 phân cắt, cho phép đánh giá sự biểu hiện tổng thể của SNAP-25 trong mỗi dòng tế bào và phần trăm SNAP-25 bị phân cắt sau khi xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích dưới dạng thông số để đánh giá lượng hấp thu endopeptidaza tái hướng đích. Đầu dò thẩm tách kháng thể sơ cấp được rửa ba lần, mỗi lần 15 phút trong TBS, TWEEN-20® (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Màng sau khi rửa này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ trong TBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat), BSA 2% và sữa khô tách béo 5% chứa hoặc là 1) globulin miễn dịch G đa dòng của dê kháng chuột pha loãng 1:10.000, kháng thể chuỗi nặng và nhẹ (IgG, H+L) được tiếp hợp với peroxidaza của cây cải ngựa (Zymed, South San Francisco, CA) làm kháng thể thứ cấp; hoặc 2) globulin miễn dịch G đa dòng của dê kháng thỏ được pha loãng 1:10.000, kháng thể chuỗi nặng và nhẹ (IgG, H+L) được tiếp hợp với peroxidaza của cây cải ngựa (Zymed, South San Francisco, CA) làm kháng thể thứ cấp. Đầu dò thẩm tách kháng thể thứ cấp

được rửa ba lần, mỗi lần 15 phút trong TBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Việc phát hiện tín hiệu các sản phẩm SNAP-25 đã đánh dấu được hiển thị bằng cách sử dụng hệ thống phát hiện thẩm tách Western ECL Plus™ (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) và màng này được in hình và định lượng phần trăm sản phẩm đã phân cắt bằng Typhoon 9410 Variable Mode Imager và phần mềm phân tích hình ảnh (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Việc lựa chọn kích thước điểm ảnh (100 đến 200 điểm ảnh) và cài đặt hiệu điện thế PMT (từ 350 đến 600, thường là 400) tùy vào mỗi lần thẩm tách.

Trên cơ sở phát hiện sản phẩm SNAP-25 phân cắt, các dòng tế bào sau đây biểu hiện sự hấp thu 30nM Noc/A: BE(2)-C, N18TG2, Neuro-2a, SiMa, SK-N-BE(2)-C và SK-N-DZ (Bảng 3); trong khi các dòng tế bào sau đây biểu hiện sự hấp thu 100nM Dyn/A: N18TG2, Neuro-2a, PC12 và SiMa. Một số dòng tế bào nhạy này được kiểm tra với các hợp chất có liều thấp hơn và/hoặc với các đáp ứng liều dùng đầy đủ.

Bảng 3. Sàng lọc liều dùng đơn của các dòng tế bào ứng viên bằng cách sử dụng Noc/A và Dyn/A tái hướng đích

Dòng tế bào	**Mô tả**	**Nguồn**	**Hấp thu Noc/A 30nM**	**Hấp thu Dyn/A 100nM**
BE(2)-C	U nguyên bào thần kinh của người	ATCC CRL-2268	Có	NT
N18TG2	U nguyên bào thần kinh của chuột nhắt	DSMZ ACC 103	Có	Có
ND3	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt/DRG sơ cấp của chuột cống sơ sinh	ECACC 92090901	NDA	NDA
ND7/23	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt/DRG sơ cấp của chuột cống	ECACC 92090903	Không	Không
ND8	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt/DRG sơ cấp của chuột cống sơ sinh	ECACC 92090904	NDA	NDA
ND15	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt/DRG sơ cấp của chuột cống sơ sinh	ECACC 92090907	Không	Không
Neuro-2a	U nguyên bào thần kinh của chuột nhắt	ATCC CCL-131	Có	Có

Dòng tế bào	Mô tả	Nguồn	Hấp thu Noc/A 30nM	Hấp thu Dyn/A 100nM
NG108-15	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt/u thần kinh đệm của chuột cống	ECACC 88112302	Không	NT
PC12	U tế bào ưa crôm của chuột cống	ATCC CRL-1721	NT	Có
SH-SY5Y	U nguyên bào thần kinh của người	ATCC CRL-2266	Không	NT
SiMa	U nguyên bào thần kinh của người	DSMZ ACC 164	Có	Có
SK-N-BE(2)-C	U nguyên bào thần kinh của người	ATCC CRL-2271	Có	NT
SK-N-DZ	U nguyên bào thần kinh của người	ATCC CRL-2149	Có	NT
SK-N-F1	U nguyên bào thần kinh của người	ATCC CRL-2142	Không	NT
SK-N-SH	U nguyên bào thần kinh của người	ECACC 86012802	Không	NT
NT: không được thử nghiệm NDA: không phát hiện được lượng SNAP-25 trong dòng tế bào này				

Sử dụng cách tiếp cận tương tự, các dòng tế bào chứa tế bào có các thụ thể có cùng nguồn gốc đối với các endopeptidaza tái hướng đích khác có thể đánh giá đối với sự hấp thu endopeptidaza tái hướng đích.

Ví dụ 2. Sàng lọc các dòng tế bào vô tính ứng viên có biểu hiện thụ thể endopeptitdaza tái hướng đích nội sinh

1. Sàng lọc liều dùng đơn endopeptidaza tái hướng đích của các dòng tế bào vô tính ứng viên từ dòng tế bào SiMa gốc

Đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế của Zhu Hong et al., Cell Lines Useful in Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, đơn xin cấp patent Mỹ số 61/160,199 bộc lộ các dòng tế bào vô tính có nguồn gốc từ dòng tế bào SiMa gốc hữu ích để sử dụng trong thử nghiệm hiệu lực của BoNT/A, như đã được bộc lộ trong Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, đơn xin cấp patent Mỹ số 12/403,531, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. Để xác định xem liệu các dòng tế bào vô tính này có thể hấp thu một lượng endopeptidaza tái hướng đích phù

hợp hay không, từng dòng tế bào này đã được sàng lọc bằng cách sử dụng thử nghiệm ELC ELISA kiểu bánh kẹp.

Để tạo ra dịch dung giải được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích, mật độ tế bào thích hợp từ dòng tế bào giống gốc kiểm tra này được cấy vào các đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ chứa 100µL môi trường sinh triển chứa huyết thanh thích hợp (Bảng 1) qua đêm. Sau đó, môi trường từ tế bào nuôi cấy đó được hút ra khỏi lỗ và thay thế bằng môi trường mới chứa 30nM endopeptidaza tái hướng đích Noc/A hoặc 80nM endopeptidaza tái hướng đích Dyn/A. Sau khi ủ 24 giờ, tế bào này được rửa bằng cách hút bỏ môi trường sinh trưởng này và lắc rửa mỗi lỗ này với 200µL 1 x PBS. Để thu các tế bào này, 1 x PBS được hút ra, các tế bào được dung giải bằng cách bổ sung 30µL đệm dung giải chứa Tris-HCl 20mM (độ pH=7,5), NaCl 150mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Triton X-100 1% vào mỗi lỗ và đĩa này được ủ trên máy lắc quay ở tốc độ 500 vòng/phút trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi đĩa này được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C để lắng mảnh vỡ tế bào và dịch nổi bề mặt này được chuyển vào đĩa 96 lỗ có phủ kháng thể thu giữ để tiến hành bước phát hiện.

Để pha chế dung dịch kháng thể thu giữ α-SNAP-25_{197}, kháng thể α-SNAP-25_{197} đơn dòng của chuột chứa dịch cổ trướng từ dòng tế bào lai 2E2A6 (Ví dụ 11) được tinh sạch bằng cách sử dụng quy trình tinh sạch protein A.

Để pha chế dung dịch kháng thể phát hiện α-SNAP-25, kháng thể α-SNAP-25 đa dòng S9684 của thỏ (Sigma, St. Louis, MO) được tiếp hợp với chất phản ứng đánh dấu Este Ruteni(II)-tris-bipyridin-(4-metysulfonat) NHS (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Phản ứng tiếp hợp được thực hiện bằng cách bổ sung 30µL dung dịch gốc MSD SULFO-TAG™ được hoàn nguyên bằng nước cất vào 200µL kháng thể α-SNAP-25 đa dòng 2mg/mL và ủ hỗn hợp phản ứng này ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ trong bóng tối. Các kháng thể được đánh dấu này được tinh sạch bằng cách sử dụng quy trình cột ly tâm chuẩn và nồng độ protein này được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm protein đo màu chuẩn. Việc hấp thụ của thể tiếp hợp kháng thể α-SNAP-25/MSD SULFO-TAG™ này được xác định ở bước sóng 455 nm bằng cách sử dụng quang phổ kế để xác định nồng độ mol trên lít (mol/L). Dung dịch

kháng thể phát hiện này được bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi cần sử dụng. Phần chia đều không sử dụng sẽ được bảo quản trong thời gian dài ở nhiệt độ -20°C.

Để tạo ra giá thể pha rắn α-SNAP-25 chứa kháng thể thu giữ α-SNAP-25_{197}, khoảng 5µL dung dịch kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng thích hợp (20µg/mL trong 1 x PBS) được bổ sung vào từng lỗ trên đĩa MSD Liên kết Mật độ Cao 96 lỗ và dung dịch này được để làm khô trong không khí trong tủ an toàn sinh học trong trong thời gian từ 2 đến 3 giờ với mục đích làm bay hơi dung dịch. Các đĩa đã phong bế này được dán kín và bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi cần sử dụng.

Để phát hiện sự có mặt của sản phẩm SNAP-25 đã được phân cắt bằng ELC ELISA kiểu bánh kẹp, các lỗ được liên kết kháng thể thu giữ này được phong bế bằng cách bổ sung 150µL đệm phong bế chứa chất phong bế Amersham 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) và huyết thanh dê 10% (VWR, West Chester, PA) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Đệm phong bế này được hút ra và bổ sung 25µL dung dịch dung giải tế bào đã được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích vào từng lỗ và đĩa này được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Các lỗ của đĩa này được rửa ba lần bằng cách hút dịch dung giải tế bào và lắc rửa từng lỗ này ba lần bằng 200µL 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Sau khi rửa, bổ sung 25µL dung dịch kháng thể phát hiện α-SNAP-25 5µg/mL chứa đệm phong bế Amersham 2% trong 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat) vào từng lỗ, dán kín và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ trong điều kiện lắc. Sau khi ủ kháng thể phát hiện α-SNAP-25 này, các lỗ được rửa ba lần bằng 200µL 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Sau khi rửa, bổ sung 150µL đệm đọc 1 x (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) vào từng lỗ và các đĩa này được đọc trên thiết bị đọc hình ảnh SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Dữ liệu thô thu được bằng cách sử dụng thiết bị in hình ECL.

Kết quả thu được đã chỉ ra rằng dòng tế bào SiMa gốc cũng như dòng tế bào vô tính H10 cho thấy có sự hấp thu tốt endopeptidaza tái hướng đích Noc/A (Bảng 4). Ngoài ra, các kết quả này cũng bộc lộ một số dòng tế bào biểu hiện hấp thu endopeptidaza tái hướng đích Dyn/A (Bảng 4). Có ba dòng tế bào vô tính (1E11, AF4 và DC4) cho thấy có sự hấp thu tốt endopeptidaza tái hướng đích Dyn/A; mười một dòng tế bào vô tính (1E3, 2D2, 2D6, 3D8, 5C10, 5F3, BB10, BF8, CG8, CG10 và

DE7) cho thấy sự hấp thu trung bình endopeptidaza tái hướng đích Dyn/A; và các dòng (3B8, 2B9, CE6, YB8, 4C8, 2F5, AC9, CD6, DD10, YF5) cho thấy sự hấp thu tối thiểu endopeptidaza tái hướng đích Dyn/A. Một số dòng tế bào ứng viên được kiểm tra trong thử nghiệm đáp ứng liều dùng đầy đủ với endopeptidaza tái hướng đích tương ứng.

Bảng 4. Sàng lọc theo liều dùng đơn của các dòng tế bào vô tính ứng viên bằng cách sử dụng Noc/A và Dyn/A tái hướng đích

Dòng tế bào	**Hấp thu 30 nM Noc/A**	**Hấp thu 80 nM Dyn/A**
AGN P33	+++	NT
A10	–	NT
D11	–	NT
H1	–	–
H10	+++	–
1D4	NT	–
2E4	NT	–
3D5	NT	–
3G10	NT	–
4D3	NT	–
BB3	NT	–
CC11	NT	–
DF5	NT	–
YB7	NT	–
BE3	NT	–
4B5	NT	–
2B9	NT	+
2F5	NT	+
3B8	NT	+
4C8	NT	+
AC9	NT	+
CD6	NT	+

Dòng tế bào	Hấp thu 30 nM Noc/A	Hấp thu 80 nM Dyn/A
CE6	NT	+
DD10	NT	+
YB8	NT	+
YF5	NT	+
1E3	NT	++
2D2	NT	++
2D6	NT	++
3D8	NT	++
5C10	NT	++
5F3	NT	++
BF8	NT	++
BB10	NT	++
CG8	NT	++
CG10	NT	++
DE7	NT	++
1E11	NT	+++
AF4	NT	+++
DC4	NT	+++
NT: không được thử nghiệm –: không hấp thu; +: hấp thu tối thiểu; ++: hấp thu vừa phải; +++: hấp thu tốt		

2. Sàng lọc đáp ứng liều dùng đầy đủ của các dòng tế bào ứng viên

Các dòng tế bào đã thiết lập đã được nhận dạng ở trên, tiếp đó được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp đáp ứng liều dùng đầy đủ của endopeptidaza tái hướng đích thích hợp. Các tế bào từ các dòng tế bào khác nhau được đặt vào đĩa 96 lỗ và được cho tiếp xúc với Noc/A có các nồng độ (0, 0,14nM, 0,4nM, 1,23nM, 3,7nM, 11,1nM, 33,3nM và 100nM) hoặc Dyn/A (0,017nM, 0,05nM, 0,15nM, 0,45nM, 1,4nM, 4,1nM, 12nM, 37nM, 111nM, 333 nM và 1000nM) trong thời gian 24 giờ. Sau đó, môi trường chứa endopeptidaza tái hướng đích được loại bỏ và thay thế bằng môi trường mới. Các đĩa được ủ trong 24 giờ nữa trong điều kiện CO_2 5% ở nhiệt độ 37°C

để cho phép phân cắt SNAP-25. Sau đó các tế bào được dung giải trong đệm dung giải (Bảng 5) và các đĩa này được ly tâm để loại bỏ mảnh vỡ tế bào. Các dịch dung giải này được sử dụng trong thử nghiệm thẩm tách Western hoặc ELISA kiểu bánh kẹp.

Đối với phân tích thẩm tách Western, mẫu được thử nghiệm về sự có mặt của cả SNAP-25 nguyên vẹn và sản phẩm SNAP-25 phân cắt như được mô tả trong Ví dụ 1.

Đối với phân tích ELISA kiểu bánh kẹp, các đĩa ELISA mà được phủ bằng kháng thể đơn dòng 2E2A6 và được phong bế bằng 150µL đệm phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Sau khi loại bỏ đệm phong bế, bổ sung 25µL dịch dung giải tế bào vào từng lỗ và các đĩa này được ủ ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 2 giờ. Các đĩa được rửa ba lần bằng PBS-T và bổ sung 25 µL SULFO-TAG NHS-Ester được đánh dấu bằng kháng thể phát hiện pAb kháng SNAP25 có nồng độ 5µg/mL với chất phản ứng phong bế 2% trong PBS-T vào góc đáy các lỗ. Các đĩa này được dán kín và lắc ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, tiếp đó rửa ba lần bằng PBS-T. Sau khi rửa hoàn toàn, bổ sung 150µL đệm đọc 1x vào từng lỗ và đĩa này được đọc trên máy đọc hình ảnh SI6000. Để xác định độ nhạy của mỗi dòng trong số các dòng tế bào được kiểm tra, giá trị EC_{50} được tính toán cho từng dòng tế bào. Giá trị đối với endopeptidaza tái hướng đích Noc/A này được tóm tắt trong Bảng 5. Đáp ứng liều dùng đầy đủ của endopeptidaza tái hướng đích Dyn/A chỉ được thực hiện với PC12 và dòng AF4. Trong cả hai trường hợp, thử nghiệm này đều không đạt tới đường tiệm cận trên và không thể tính được EC_{50}. Liều dùng thấp hơn mà tạo ra tín hiệu đối với dòng AF4 là 12nM đối với cả hai dòng tế bào.

Bảng 5. Sàng lọc liều dùng đầy đủ của các dòng tế bào ứng viên bằng cách sử dụng Noc/A và Dyn/A tái hướng đích

Dòng tế bào	**Mô tả**	**Nguồn**	**Hấp thu EC_{50} Noc/A**	**Hấp thu EC_{50} Dyn/A**
AGN P33	U nguyên bào thần kinh của người	-	5-10nM	NT
BE(2)-C	U nguyên bào thần kinh của người	ATCC CRL-2268	NT	NT
N18TG2	U nguyên bào thần kinh của chuột nhắt	DSMZ ACC 103	NT	NT
N18	U nguyên bào thần kinh của chuột nhắt	ECACC 88112301	>100 nM	NT

ND3	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt/DRG sơ cấp của chuột cống sơ sinh	ECACC 92090901	NDA	NT
ND7/23	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt/DRG sơ cấp của chuột cống	ECACC 92090903	>100 nM	NT
ND8	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt/DRG sơ cấp của chuột cống sơ sinh	ECACC 92090904	NDA	NT
ND15	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt/DRG sơ cấp của chuột cống sơ sinh	ECACC 92090907	>100 nM	NT
Neuro-2a	U nguyên bào thần kinh của chuột nhắt	ATCC CCL-131	30 nM	NT
NG108-15	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt/u thần kinh đệm của chuột cống	ECACC 88112302	NT	NT
PC12	U tế bào ưa crôm của chuột cống	ATCC CRL-1721	NT	>1000 nM
SH-SY5Y	U nguyên bào thần kinh của người	ATCC CRL-2266	NT	NT
SiMa	U nguyên bào thần kinh của người	DSMZ ACC 164	30nM	NT
SiMa dòng AF4	U nguyên bào thần kinh của người	-	NT	>300nM
SiMa dòng H1	U nguyên bào thần kinh của người	-	>100nM	NT
SiMa dòng H10	U nguyên bào thần kinh của người	-	20 nM	NT
SK-N-BE(2)-C	U nguyên bào thần kinh của người	ATCC CRL-2271	NT	NT
SK-N-DZ	U nguyên bào thần kinh của người	ATCC CRL-2149	0,5-2nM	NT
SK-N-F1	U nguyên bào thần kinh của người	ATCC CRL-2142	>100nM	NT

SK-N-SH	U nguyên bào thần kinh của người	ECACC 86012802	>100nM	NT
NT: không được thử nghiệm. NDA: không phát hiện được lượng SNAP-25 trong dòng tế bào này.				

Sử dụng các cách tiếp cận tương tự, các dòng tế bào vô tính chứa tế bào có các thụ thể có cùng nguồn gốc với các endopeptidaza tái hướng đích khác có thể được sàng lọc và đánh giá sự hấp thu của endopeptidaza tái hướng đích.

Ví dụ 3. Đánh giá các điều kiện sinh trưởng đối với sự hấp thu endopeptidaza tái hướng đích trong các dòng tế bào ứng viên

Các ví dụ sau đây nhằm minh họa cách xác định điều kiện nuôi cấy, sinh trưởng và biệt hóa đối với các dòng tế bào đã thiết lập sự hấp thu tối đa endopeptidaza tái hướng đích.

1. Ảnh hưởng của sự biệt hóa tế bào và các yếu tố dinh dưỡng đối với sự hấp thu endopeptidaza tái hướng đích của các dòng tế bào ứng viên

Để xác định xem liệu có sự biệt hóa tế bào hoặc sự có mặt của các yếu tố dinh dưỡng trong các môi trường sinh trưởng cải thiện sự hấp thu endopeptidaza tái hướng đích hay không, các dòng tế bào biểu hiện sự hấp thu tốt Noc/A được thử nghiệm với các chế phẩm môi trường khác nhau. Cấy mật độ tế bào thích hợp từ giống gốc của dòng tế bào SiMa P>30 được thử nghiệm vào các lỗ trong đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ chứa 100µL môi trường không có huyết thanh chứa RPMI1640, Penixilin-Streptomyxin 1%, L-Glutamin 2mM, được bổ sung B27 và N2 hoặc 100µL môi trường không có huyết thanh chứa RPMI1640, Penixilin-Streptomyxin 1%, L-Glutamin 2mM, được bổ sung B27, N2 và NGF (Nerve Growth Factor, 100 ng/mL). Các tế bào này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ có cacbon dioxit 5% cho đến khi các tế bào này được biệt hóa như được đánh giá theo tiêu chuẩn hình thái học chuẩn và thông dụng, chẳng hạn như kìm hãm sinh trưởng và kéo dài nơron (khoảng từ 1 đến 2 ngày). Để làm đối chứng, cấy nồng độ tế bào thích hợp từ giống gốc của dòng tế bào được thử nghiệm vào các lỗ của các đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ chứa 100µL môi trường sinh trưởng thích hợp (Bảng 1) có hoặc không có NGF (100ng/mL). Các tế bào đối chứng không được biệt hóa này được cho phát triển ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ có 5% cacbon dioxit cho đến khi các tế bào này đạt mật độ mong muốn (khoảng từ 18 đến 24 giờ). Hút môi trường từ cả môi

trường nuôi cấy được biệt hóa và đối chứng không được biệt hóa từ từng lỗ và thay bằng môi trường mới chứa hoặc là 0 (mẫu không được xử lý) hoặc với nhiều nồng độ Noc/A khác nhau (0,14, 0,4, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3 và 100nM). Sau 24 giờ xử lý, các tế bào này được rửa và ủ 24 giờ trong môi trường không có endopeptidaza tái hướng đích để làm tăng lượng $SNAP25_{197}$ được tạo ra. Tiếp đó, rửa và thu các tế bào để làm thử nghiệm phân tích ELISA kiểu bánh kẹp ELC như được mô tả trong Ví dụ 2.

Ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng cũng được thử nghiệm đối với dòng tế bào SK-N-DZ. Các tế bào SK-N-DZ này được cấy lên đĩa 96 lỗ được phủ poly-D-lysin với 25.000 tế bào mỗi lỗ trong tám môi trường SM khác nhau (Bảng 6) trong thời gian 72 giờ. Các tế bào này được xử lý trong cùng tám môi trường với Noc/A có liều lượng bằng 0, 0,3nM, 3nM và 30nM. Sau 24 giờ xử lý, rửa và ủ các tế bào này 24 giờ trong môi trường không có endopeptidaza tái hướng đích để tăng lượng sản phẩm $SNAP-25_{197}$ phân cắt được tạo ra. Tiếp đó, rửa và thu các tế bào để phân tích thẩm tách Western như được mô tả trong Ví dụ 1.

Mặc dù, sự biệt hóa không ảnh hưởng đến sự hấp thu Noc/A trong dòng tế bào SiMa >P30, nhưng nó được xem là để tăng cường sự hấp thu trong dòng tế bào SK-N-DZ. Môi trường cơ sở này có ảnh hưởng đáng kể đến sự hấp thu Noc/A trong dòng tế bào SK-N-DZ với RPMI1640 chứa các yếu tố dinh dưỡng N2 và B27 là sự kết hợp tốt nhất. Sự có mặt của NGF trong môi trường này dường như không cải thiện sự hấp thu trong cả hai dòng tế bào được thử nghiệm.

Bảng 6. Ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng và sự biệt hóa tế bào đối với sự hấp thu Noc/A của các dòng tế bào ứng viên

Không được biệt hóa	**Được biệt hóa**	**Hấp thu EC_{50} Noc/A**	
		AGN P33	**SK-N-DZ**
DMEM, FBS 10%	-	NT	> 30 nM
DMEM, FBS 10%, N2, B27	-	NT	3 nM
DMEM, FBS 10%, N2, B27, NGF	-	NT	3 nM
DMEM, FBS 10%, N2, B27, RA	-	NT	>30 nM
RPMI1640, FBS 10%	-	NT	10 nM
RPMI1640, FBS 10%, N2, B27	-	7,2 nM	1 nM
RPMI1640, FBS 10%, N2, B27, NGF	-	9,1 nM	1 nM

Không được biệt hóa	Được biệt hóa	Hấp thu EC_{50} Noc/A	
		AGN P33	SK-N-DZ
RPMI1640, FBS 10%, N2, B27, RA	-	NT	10 nM
-	RPMI1640, N2, B27	10,2 nM	1 nM
-	RPMI1640, N2, B27, NGF	9,8 nM	0,6 nM
NGF: Yếu tố sinh trưởng thần kinh; RA: Axit retinoic NT: Không được thử nghiệm			

Sử dụng cách tiếp cận tương tự, có thể đánh giá được sự sinh trưởng và các điều kiện biệt hóa đối với dòng tế bào vô tính chứa các tế bào có các thụ thể có cùng nguồn gốc đối với các endopeptidaza tái hướng đích khác.

Ví dụ 4. Phát triển các dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện các thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh

Ví dụ sau nhằm minh họa cách tạo ra dòng tế bào đã thiết lập biểu hiện thụ thể endopeptidaza tái hướng đích ngoại sinh.

1. Chuyển nhiễm thụ thể đích vào các tế bào chứa dòng tế bào ứng viên

Endopeptidaza tái hướng đích Noc/A chứa vùng đích nociceptin là phối tử tự nhiên của thụ thể giống opioit 1 (Opioid Receptor Like-1: ORL-1). Để thu cấu trúc biểu hiện chứa khung đọc mở cho ORL-1, thu cấu trúc biểu hiện pReceiver-M02/ORL-1 từ GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD).

Theo cách khác, phân tử polynucleotit dựa trên trình tự axit amin ORL-1 (ví dụ, trình tự axit amin SEQ ID NO: 25 hoặc SEQ ID NO: 26) có thể được tổng hợp bằng các kỹ thuật chuẩn (BlueHeron® Biotechnology, Bothell, WA). Các oligonucleotit có chiều dài từ 20 đến 50 bazơ được tổng hợp bằng cách sử dụng kỹ thuật tổng hợp phosphoramidit chuẩn. Các oligonucleotit này được lai hóa thành chuỗi xoắn kép và được gắn với nhau để tạo thành phân tử polynucleotit có chiều dài đầy đủ. Phân tử polynucleotit này sẽ được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp sinh học phân tử chuẩn thành vectơ pUCBHB1 tại vị trí *Sma*I để tạo ra pUCBHB1/ORL-1. Phân tử polynucleotit đã được tổng hợp này được xác nhận bằng cách giải trình tự sử dụng thiết bị Big Dye Terminator™ Chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Foster City,

CA) và thiết bị giải trình tự ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Nếu muốn, phân tử polynucleotit được tối ưu hóa sự biểu hiện dựa trên trình tự axit amin ORL-1 (ví dụ, trình tự axit amin SEQ ID NO: 25 hoặc SEQ ID NO: 26) có thể được tổng hợp để tăng cường sự biểu hiện trong chủng *Escherichia coli*. Phân tử polynucleotit mã hóa ORL-1 này có thể được cải biến để 1) chứa các codon cùng nghĩa thường xuất hiện trong phân tử polynucleotit tự nhiên của chủng *Escherichia coli*; 2) chứa thành phần G+C mà phù hợp hơn với thành phần trung bình G+C của phân tử polynucleotit tự nhiên được tìm thấy trong chủng *Escherichia coli*; 3) giảm vùng polymononucleotit có trong phân tử polynucleotit này; và/hoặc 4) loại bỏ vị trí cấu trúc hoặc điều hòa nội phân tử có trong phân tử polynucleotit đó, ví dụ, xem: Lance E. Steward et al., Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type A, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2008/0057575 (6 tháng 03 năm 2008); và Lance E. Steward et al., Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type E, U.S 2008/0138893 (12 tháng 06 năm 2008). Ngay khi việc tối ưu hóa trình tự này đã hoàn thành, các oligonucleotit có chiều dài từ 20 đến 50 bazơ được tổng hợp bằng kỹ thuật tổng hợp phosphoramidit tiêu chuẩn. Các oligonucleotit này được lai với nhau thành chuỗi xoắn kép và được gắn với nhau để tạo thành phân tử polynucleotit có chiều dài đầy đủ. Phân tử polynucleotit này được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp sinh học phân tử tiêu chuẩn thành vectơ pUCBHB1 tại vị trí *Sma*I để tạo ra pUCBHB1/ORL-1. Phân tử polynucleotit đã được tổng hợp được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Nếu muốn, việc tối ưu hóa sự biểu hiện đối với các sinh vật khác nhau, chẳng hạn, ví dụ, chủng nấm men, dòng tế bào côn trùng hoặc dòng tế bào động vật có vú, có thể được thực hiện, ví dụ, xem: Steward, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2008/0057575, nêu trên, (2008); và Steward, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2008/0138893, nêu trên, (2008). Các phân tử polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa ORL-1 bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61 và SEQ ID NO: 62.

Để xây dựng một cấu trúc biểu hiện mã hóa ORL-1, cấu trúc pUCBHB1/ORL-1 sẽ được cắt bằng enzym giới hạn endonucleaza mà enzym này 1) cắt phân tử polynucleotit mã hóa khung đọc mở ORL-1; và 2) cho phép phân tử polynucleotit này liên kết một cách có kiểm soát với vectơ pcADN3 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Đoạn chèn vào này sẽ được tạo dòng phụ bằng cách sử dụng quy trình nối ADN T4 thành vectơ pcADN3 mà vectơ này sẽ được cắt bằng enzym giới hạn endonucleaza

thích hợp để thu được pcADN3/ORL-1. Hỗn hợp cắt này sẽ được chuyển vào các tế bào *E. coli* BL21(DE3) khả biến bằng điện bằng cách sử dụng phương pháp xung điện (Edge Biosystems, Gaitherburg, MD) và các tế bào này được cấy lên các đĩa chứa 1,5% thạch Luria-Bertani (độ pH=7,0) chứa 50µg/mL ampixilin và được đưa vào tủ ủ ở nhiệt độ 37°C để phát triển qua đêm. Các vi khuẩn chứa các cấu trúc biểu hiện sẽ được nhận dạng là các khuẩn lạc kháng ampixilin. Các cấu trúc ứng viên sẽ được phân lập bằng cách sử dụng quy trình điều chế lượng plasmit ít bằng cách dung giải kiềm và được phân tích bằng cách lập bản đồ cắt giới hạn endonucleaza để xác định sự có mặt và định hướng đoạn được chèn vào. Chiến lược tách dòng này sẽ tạo ra cấu trúc biểu hiện pcADN3 chứa phân tử polynucleotit mã hóa ORL-1.

Endopeptidaza tái hướng đích Dyn/A này chứa miền dynorphin hướng đích, miền này là một phối tử tự nhiên của thụ thể κ-opioit (KOR). Để thu được cấu trúc biểu hiện chứa khung đọc mở cho ORL-1, thu cấu trúc biểu hiện pReceiver-M02/KOR-1 từ GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD). Theo cách khác, cấu trúc biểu hiện mã hóa KOR này có thể được tổng hợp và được tạo dòng phụ bằng cách sử dụng cách tiếp cận tương tự với cách đã được mô tả ở trên để tạo ra cấu trúc biểu hiện pcADN3.1/KOR. Các trình tự axit amin KOR được nêu làm ví dụ bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30; các phân tử polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa KOR gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 65 và SEQ ID NO: 66.

Các chiến lược tách dòng tương tự có thể được sử dụng để tạo ra các cấu trúc biểu hiện mã hóa các thụ thể endopeptidaza tái hướng đích khác, chẳng hạn, ví dụ, pcADN3.1/DOR hoặc pcADN3.1/MOR, pcADN3.1/thụ thể galanin 1, pcADN3.1/thụ thể galanin 2 hoặc pcADN3.1/thụ thể galanin 3. Các trình tự axit amin DOR được nêu làm ví dụ bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28; các trình tự axit amin MOR điển hình bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31; các trình tự axit amin thụ thể galanin 1 điển hình bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 và SEQ ID NO: 138; các trình tự axit amin thụ thể galanin 2 được nêu làm ví dụ bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139; và các trình tự axit amin thụ thể galanin 3 được nêu làm ví dụ bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 140. Các phân tử polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa DOR bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63 và SEQ ID NO: 64; các phân tử polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa MOR bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67; các phân tử polynucleotit được nêu

làm ví dụ mã hóa thụ thể galanin 1 bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 và SEQ ID NO: 143; các phân tử polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa thụ thể galanin 2 bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 144; và các phân tử polynucleotit được nêu làm ví dụ mã hóa thụ thể galanin 3 bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 145.

Để đưa cấu trúc biểu hiện mã hóa thụ thể endopeptidaza tái hướng đích vào, các dòng tế bào được chuyển nhiễm với cấu trúc biểu hiện mã hóa thụ thể endopeptidaza tái hướng đích. Để chuyển nhiễm dòng tế bào có opioit hoặc thụ thể giống opioit, các tế bào từ dòng tế bào ứng viên này được cấy với mật độ 1 x 10^7 tế bào vào bình nuôi cấy có phủ T_{175} Colagen IV và được cho phát triển trong tủ ủ có 5% cacbon dioxit cho đến khi tế bào này đạt đến mật độ mong muốn. 4,2mL dung dịch chuyển nhiễm được tạo ra bằng cách bổ sung 4mL môi trường OPTI-MEM giảm huyết thanh chứa 200µL LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) và ủ tại nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút với 4mL môi trường OPTI-MEM giảm huyết thanh chứa 20µg pReceiver-M02/ORL-1 hoặc 20µg pReceiver-M02/KOR-1. Dung dịch chuyển nhiễm này được ủ ở nhiệt độ trong phòng khoảng 20 phút. Các môi trường này được thay thế bằng 8mL môi trường mới không có huyết thanh và không chứa kháng sinh và dung dịch chuyển nhiễm này được bổ sung vào tế bào. Sau đó, các tế bào này được ủ trong tủ ủ có cacbon dioxit 5% trong khoảng từ 16 đến 18 giờ. Các môi trường chuyển nhiễm này được thay thế bằng các môi trường sinh trưởng mới và ủ các tế bào trong tủ ủ 37°C có cacbon dioxit 5%. Sau 24 giờ, các môi trường sinh trưởng này được thay thế bằng các môi trường sinh trưởng mới chứa kháng sinh G418 với nồng độ 1mg/mL trong các môi trường nuôi cấy (môi trường chọn lọc) và các tế bào này được ủ trong 7 ngày. Môi trường chọn lọc này được thay thế hàng tuần trong tổng số 4 tuần (khoảng 90% tế bào chết và được loại bỏ hàng tuần khi thay môi trường).

Các dòng tế bào ứng viên được chuyển nhiễm thụ thể ORL-1 bao gồm các dòng tế bào SiMa >P30, ND15, ND7, NG108-T15 và SK-N-DZ. Các dòng tế bào ứng viên được chuyển nhiễm thụ thể KOR-1 bao gồm dòng tế bào SiMa, SiMa >P30, ND15, ND7, NG108-T15 và SK-N-DZ. Các dòng tế bào chuyển nhiễm NG108-T15 không sống sót khi chọn lọc trong G418.

2. Sàng lọc đáp ứng liều dùng và liều dùng đơn của các dòng tế bào được chuyển nhiễm ổn định bằng cách sử dụng các phân tử endopeptidaza tái hướng đích

Các tế bào từ dòng tế bào ứng viên được chuyển nhiễm và chọn lọc ở trên được cấy trên các đĩa 96 lỗ phủ poly-D-lysin hoặc Colagen IV với mật độ $1x10^5$ tế bào/lỗ trong môi trường RPMI1640 có bổ sung N2 và B27 và NGF (50-100ng/ml) trong 20 ±4 giờ trước khi xử lý với hợp chất. Tiếp đó, các tế bào được chuyển nhiễm ổn định với thụ thể ORL-1 được xử lý với endopeptidaza tái hướng đích Noc/A ở nồng độ 30nM trong cùng môi trường trong thời gian 24 ±2 giờ, ngoại trừ dòng tế bào SK-N-DZ được xử lý ở nồng độ 10nM. Các tế bào này được dung giải trong 120µL dung dịch đệm dung giải và 20µL dịch dung giải được trộn với 2x đệm SDS để phân tích thẩm tách Western được thực hiện như đã được mô tả cụ thể trong Ví dụ 1. Tất cả các dòng tế bào này đều có biểu hiện tăng cường hấp thụ hợp chất Noc/A tái hướng đích khi được chuyển nhiễm với thụ thể ORL-1 (Bảng 7).

Bảng 7. Các dòng tế bào được chuyển nhiễm ổn định với ORL-1 được thử nghiệm bằng endopeptidaza tái hướng đích Noc/A

Dòng tế bào	**Mô tả**	**% SNAP25 phân cắt tại 30nM**	
		Không được chuyển nhiễm	**Được chuyển nhiễm**
AGN P33	U nguyên bào thần kinh của người	20%	40%
SK-N-DZ	U nguyên bào thần kinh của người	25% @ 10nM	40% @ 10nM
ND7	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt và các tế bào DRG của chuột cống	10%	42%
ND15	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt và các tế bào DRG của chuột cống	8%	20%
NG108-T15	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột nhắt/u thần kinh đệm của chuột cống	Không có tế bào sống sót	Không có tế bào sống sót

Các tế bào từ các dòng tế bào ứng viên được chuyển nhiễm và chọn lọc từ mục trên được cấy trên các đĩa 96 lỗ phủ poly-D-lysin hoặc Colagen IV với mật độ $1x10^5$ tế bào/lỗ trong môi trường RPMI1640 có bổ sung FBS 10% và N2 và B27 trong 20 ±4 giờ trước khi xử lý với hợp chất. Các tế bào này được chuyển nhiễm ổn định với thụ thể KOR-1 được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích Dyn/A ở nồng độ 100nM trong cùng môi trường trong thời gian 24±2 giờ. Các tế bào được dung giải trong

120µL đệm dung giải và 20µL dịch dung giải tế bào được trộn với đệm 2x SDS để phân tích thẩm tách Western được thực hiện như đã được chi tiết hóa trong Ví dụ 1. Tất cả các dòng tế bào này đều biểu hiện sự hấp thu tăng cường hợp chất Dyn/A tái hướng đích khi được chuyển nhiễm với thụ thể KOR-1 của người.

3. Chọn lọc các dòng tế bào vô tính được chuyển nhiễm ổn định biểu hiện độ nhạy cao bằng cách pha loãng theo loạt

Ví dụ sau đây nhằm minh họa cách xác định các tế bào vô tính từ dòng tế bào đã thiết lập được chuyển nhiễm ổn định, mẫn cảm với hoạt động của endopeptidaza tái hướng đích hoặc có khả năng hấp thu endopeptidaza tái hướng đích.

Đối với việc tách dòng tế bào đơn từ dòng tế bào được mô tả ở trên, sử dụng phương pháp tách dòng dòng tế bào bằng cách pha loãng giới hạn. Các tế bào này được trypsin hóa, đếm, pha loãng đạt mật độ từ 0,5 đến 1 tế bào trên 100µL và cấy trên các môi trường chọn lọc trong năm đĩa 96 lỗ được phủ poly-D-lysin với lượng 100µL mỗi lỗ. Các tế bào được ủ trong hơn 2 tuần cho đến khi hình thành khuẩn lạc ở đáy lỗ. Các khuẩn lạc dương tính có nguồn gốc từ các tế bào đơn được đánh dấu. Ảnh của các dòng thu được từ tế bào đơn được chụp bằng cách sử dụng máy ảnh của kính hiển vi. Các tế bào từ các lỗ có các dòng đơn được cho phát triển trong một tuần nữa và chuyển vào các đĩa 24 lỗ trong khoảng 4 tuần sau khi bắt đầu tách dòng.

Để chọn lọc dòng, thông số chính được sử dụng để sàng lọc các dòng dương tính là lượng SNAP-25 phân cắt cao nhất thu được sau khi xử lý với Noc/A hoặc Dyn/A, được đo bằng cách sử dụng phân tích thẩm tách Western với kháng thể mà nhận diện cả SNAP-25 nguyên vẹn và đã được phân cắt. Các dòng biểu hiện quá mức ORL-1 được thử nghiệm bằng 10nM và 30nM endopeptidaza tái hướng đích Noc/A qua đêm ngay sau khi đủ lượng tế bào (Bảng 8). Các dòng biểu hiện quá mức KOR-1 được thử nghiệm với 100nM endopeptidaza tái hướng đích Dyn/A qua đêm (Bảng 9). Ngoài ra, các dòng biểu hiện quá mức KOR-1 được thử nghiệm trên thử nghiệm liên kết Dynorphin như được mô tả trong Ví dụ 1.

Bảng 8. Sàng lọc liều đơn của các dòng tế bào vô tính ứng viên được chuyển nhiễm ổn định với ORL-1 bằng cách sử dụng endopeptidaza tái hướng đích Noc/A

Dòng tế bào	Số dòng	Hấp thu 10nM Noc/A	Hấp thu 30nM Noc/A	Sàng lọc lần 2 @ 1nM (% được phân cắt)
AGN P33	1	+	+	28%
AGN P33	2	++	+++	50%
AGN P33	3	–	+	NT
AGN P33	4	ND	ND	NT
AGN P33	5	-	+	31%
AGN P33	6	++	+++	60%
AGN P33	7	+	+	14%
AGN P33	8	+	+	NT
AGN P33	9	+	+	38%
AGN P33	10	+	++	29%
AGN P33	11	+	+	NT
AGN P33	12	+	+	27%
ND7	1C11	NT	++	NT
ND7	2F3	NT	–	NT
ND7	1D10	NT	–	NT
ND7	1F9	NT	–	NT
ND7	1G10	NT	–	NT
ND7	2D8	NT	–	NT
ND7	2E2	NT	–	NT
ND7	4B7	NT	+++	NT
ND7	3C11	NT	–	NT
ND7	3C3	NT	+	NT
ND7	3E8	NT	–	NT
ND7	3E11	NT	–	NT
ND7	2G3	NT	–	NT

Dòng tế bào	Số dòng	Hấp thu 10nM Noc/A	Hấp thu 30nM Noc/A	Sàng lọc lần 2 @ 1nM (% được phân cắt)
ND7	4D5	NT	+	NT
ND7	4D8	NT	+	NT
ND7	4C8	NT	–	NT
ND7	4C9	NT	+++	NT
ND7	4E8	NT	+	NT
ND7	2E6	NT	++	NT
ND7	4F4	NT	+++	NT
ND7	5D6	NT	–	NT
ND7	5G3	NT	–	NT
ND7	4D5	NT	++	NT
ND15	1C10	NT	+	NT
ND15	1F10	NT	++	NT
ND15	2D8	NT	++	NT
ND15	2E11	NT	–	NT
ND15	2F4	NT	++	NT
ND15	2F10	NT	++	NT
ND15	2F11	NT	–	NT
ND15	3C4	NT	+	NT
ND15	3C7	NT	++	NT
ND15	3E8	NT	+++	NT
ND15	4C8	NT	+	NT
ND15	4D8	NT	+	NT
SK-N-DZ	#2	–	–	NT
SK-N-DZ	#4	–	–	NT
SK-N-DZ	#5	+++	++	NT
SK-N-DZ	#6	NT	++	NT
SK-N-DZ	#7	+	NT	NT
SK-N-DZ	#8	–	NT	NT

Dòng tế bào	Số dòng	Hấp thu 10nM Noc/A	Hấp thu 30nM Noc/A	Sàng lọc lần 2 @ 1nM (% được phân cắt)
SK-N-DZ	#9	+	NT	NT
SK-N-DZ	#10	–	NT	NT
SK-N-DZ	#11	+	+++	NT
SK-N-DZ	#12	–	NT	NT
SK-N-DZ	#14	++	NT	NT
SK-N-DZ	#16	–	NT	NT
SK-N-DZ	#17	+	+++	NT
SK-N-DZ	#19	+	+++	NT
SK-N-DZ	#20	–	NT	NT
SK-N-DZ	#23	NT	++	NT
SK-N-DZ	#25	–	NT	NT
SK-N-DZ	#26	–	++	NT
SK-N-DZ	#27	+	NT	NT
SK-N-DZ	#28	++	+	NT
SK-N-DZ	#30	++	NT	NT
SK-N-DZ	#31	–	NT	NT
SK-N-DZ	#32	++	++	NT
SK-N-DZ	#33	+	NT	NT
SK-N-DZ	#34	+++	ND	NT
SK-N-DZ	#35	+	++	NT
SK-N-DZ	#36	–	NT	NT
SK-N-DZ	#37	+++	++	NT
SK-N-DZ	#42	–	NT	NT
SK-N-DZ	#43	+	++	NT

ND: Không được xác định; NT: Không được thử nghiệm
–: không hấp thu; +: hấp thu tối thiểu; ++: hấp thu trung bình; +++: hấp thu tốt

Bảng 9. Sàng lọc liều dùng đơn của các dòng tế bào vô tính ứng viên được chuyển nhiễm ổn định với KOR-1 bằng cách sử dụng endopeptidaza tái hướng đích Dyn/A

Dòng tế bào	Số dòng	Hấp thu 100nM Dyn/A	Liên kết 100nM Dyn	Được lựa chọn để kiểm tra tiếp
SiMa	2	–	–	Không
SiMa	6	+	+	Không
SiMa	8	+	+	Không
SiMa	12	+++	++	Có
SiMa	14	++	++	Không
SiMa	20	+	++	Không
SiMa	25	++	++	Không
AGN P33	1	+++	+	Có
AGN P33	3	++	+	Không
AGN P33	5	++	+	Có
AGN P33	6	++	+	Không
AGN P33	7	+++	+	Có
AGN P33	8	++	+	Có
AGN P33	9	+++	+	Có
AGN P33	10	+++	+	Có
AGN P33	11	++	+	Không
AGN P33	12	+++	+	Có
AGN P33	14	+	+	Không
AGN P33	16	++	+	Không
AGN P33	17	+++	+	Có
AGN P33	21	+	++	Không
ND7	A1	+	+	Không
ND7	A2	–	–	Không
ND7	A3	–	–	Không
ND7	A4	–	–	Không
ND7	A5	–	–	Không

Dòng tế bào	Số dòng	Hấp thu 100nM Dyn/A	Liên kết 100nM Dyn	Được lựa chọn để kiểm tra tiếp
ND7	A6	–	–	Không
ND7	A7	–	–	Không
ND7	A8	–	–	Không
ND7	A9	–	–	Không
ND7	A10	–	–	Không
ND7	A11	–	–	Không
ND7	A12	+++	+++	Có
ND7	B1	–	–	Không
ND7	B2	–	–	Không
ND7	B3	–	–	Không
ND7	B4	–	–	Không
ND7	B5	+	+	Có
ND7	B6	–	–	Không
ND7	B7	–	–	Không
ND7	B8	–	–	Không
ND7	B9	–	–	Không
ND7	B10	–	–	Không
ND7	B11	–	–	Không
ND7	B12	–	–	Không
ND7	C1	–	–	Không
ND7	C2	–	–	Không
ND7	C3	–	–	Không
ND7	C4	–	–	Không
ND7	C5	–	–	Không
ND7	C6	+	+	Không
ND7	C7	–	–	Không
ND7	C8	–	–	Không
ND7	C9	–	–	Không

Dòng tế bào	Số dòng	Hấp thu 100nM Dyn/A	Liên kết 100nM Dyn	Được lựa chọn để kiểm tra tiếp
ND7	C10	–	–	Không
ND7	C11	–	–	Không
ND7	C12	–	–	Không
ND7	D1	–	–	Không
ND7	D2	–	–	Không
ND7	D3	–	–	Không
ND7	D4	–	–	Không
ND7	D5	–	–	Không
ND7	D6	++	++	Có
ND7	D7	++	++	Có
ND7	D8	–	–	Không
ND7	D9	–	–	Không
ND7	D10	–	–	Không
ND7	D11	–	–	Không
ND7	D12	–	–	Không
ND7	E1	–	–	Không
ND7	E2	–	–	Không
ND7	E3	–	–	Không
ND7	E4	–	–	Không
ND7	E5	–	–	Không
ND7	E6	–	–	Không
ND7	E7	–	–	Không
ND7	E8	–	–	Không
ND7	E9	–	–	Không
ND7	E10	–	–	Không
ND7	E11	–	–	Không
ND7	E12	++	++	Có
ND7	F1	–	–	Không

Dòng tế bào	Số dòng	Hấp thu 100nM Dyn/A	Liên kết 100nM Dyn	Được lựa chọn để kiểm tra tiếp
ND7	F2	–	–	Không
ND7	F3	–	–	Không
ND7	F4	–	–	Không
ND15	A1	–	–	Không
ND15	A2	–	–	Không
ND15	A3	+	–	Không
ND15	A4	+	–	Không
ND15	A5	–	–	Không
ND15	A6	++	–	Không
ND15	A7	++	–	Không
ND15	A8	++	–	Không
ND15	A9	+	–	Không
ND15	A10	+	–	Không
ND15	A11	–	–	Không
ND15	A12	–	–	Không
ND15	B1	–	–	Không
ND15	B2	++	–	Không
ND15	B3	–	–	Không
ND15	B4	–	–	Không
ND15	B5	+++	–	Có
ND15	B6	+	–	Không
ND15	B7	–	–	Không
ND15	B8	–	–	Không
ND15	B9	–	–	Không
ND15	B10	–	–	Không
ND15	B11	–	–	Không
ND15	B12	–	–	Không
ND15	C1	–	–	Không

Dòng tế bào	Số dòng	Hấp thu 100nM Dyn/A	Liên kết 100nM Dyn	Được lựa chọn để kiểm tra tiếp
ND15	C2	+++	+	Có
ND15	C3	–	–	Không
ND15	C4	–	–	Không
ND15	C5	+	NT	Không
ND15	C6	+++	NT	Có
SK-N-DZ	#11	NT	NT	ND
ND: Không được xác định; NT: Không được thử nghiệm. –: không hấp thu; +: hấp thu tối thiểu; ++: hấp thu trung bình; +++: hấp thu tốt				

4. Sàng lọc đáp ứng liều dùng của các dòng tế bào vô tính được chuyển nhiễm ổn định bằng cách sử dụng endopeptidaza tái hướng đích

Các dòng tế bào vô tính chuyển nhiễm ổn định ứng viên từ mục 3 cho thấy sự hấp thu tốt endopeptidaza tái hướng đích Noc/A được thử nghiệm trong các thử nghiệm đáp ứng liều dùng đầy đủ để xác định độ nhạy và hiệu lực đối với endopeptidaza tái hướng đích Noc/A. Các tế bào này được cấy trên các đĩa 96 lỗ phủ poly-D-lysin hoặc Colagen IV với mật độ $1x10^5$ tế bào/lỗ trong môi trường RPMI1640 chứa các chất bổ sung N2 và B27 và NGF (50-100ng/mL) trong 20±4 giờ trước khi xử lý với hợp chất. Các tế bào từ dòng tế bào AGN P33 gốc và các dòng tế bào vô tính ND7 được xử lý bằng Noc/A có nồng độ 0, 0,14nM, 0,4nM, 1,23nM, 3,7nM, 11,1nM, 33,3nM và 100nM trong cùng môi trường, trong thời gian 24 giờ và ủ thêm 24 giờ trong môi trường không có endopeptidaza tái hướng đích để cho phép phân cắt SNAP-25. Các tế bào từ dòng tế bào AGN P33 gốc cũng được xử lý với Noc/A có nồng độ 0, 0,03nM, 0,08nM, 0,24nM, 0,74nM, 2,22nM, 6,67nM và 20nM trong cùng môi trường trong thời gian 24 giờ và ủ thêm 24 giờ trong môi trường không chứa endopeptidaza tái hướng đích để cho phép phân cắt SNAP-25. Tiếp đó, môi trường được loại bỏ và các tế bào được rửa và dung giải để phân tích ELISA kiểu bánh kẹp ECL như được cụ thể hóa trong Ví dụ 2. Dữ liệu từ các dòng tế bào vô tính và AGN P33 gốc được chuyển nhiễm ổn định với thụ thể ORL-1 được tóm lược trong Bảng 10. Các dòng #2 và #6 đã chứng tỏ có độ nhạy và hiệu lực đối với endopeptidaza tái hướng đích Noc/A tốt hơn so với dòng tế bào gốc. Hơn nữa, độ nhạy tăng trong các dòng tế bào vô tính

mới cho phép sử dụng các nồng độ thấp hơn để đáp ứng liều dùng, xác nhận là các dòng tế bào vô tính mới này là nhạy hơn.

Bảng 10. Bảng tóm tắt các tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu (S/N) và các giá trị EC_{50} của ba dòng nhạy nhất biểu hiện quá mức ORL-1 trong dòng tế bào cơ sở AGN P33

	Dòng gốc	**Dòng 2**	**Dòng 6**	**Dòng 8**
Tỷ lệ S/N 0,03nM/BK		41	26	1,8
Tỷ lệ S/N 20nM/BK		259	522	33,1
Tỷ lệ 0,14nM/BK				
Tỷ lệ S/N 100nM/BK				
EC_{50} (nM)	6,8 ± 1,1	0,6 ± 0,1	0,7± 0,07	0,3 ± 0,2

Dữ liệu từ các dòng tế bào vô tính và dòng gốc ND7 được chuyển nhiễm ổn định với thụ thể ORL-1 được tóm lược trong Bảng 11. Tất cả các dòng đã thử nghiệm đều cải thiện độ nhạy và hiệu lực đối với endopeptidaza tái hướng đích Noc/A hơn so với dòng ND7 gốc. Các dòng 4B7, 1E6 và 1C11 là nhạy nhất với các giá trị EC_{50} thấp hơn 10pM.

Bảng 11. Bảng tóm tắt các tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu (S/N) và các giá trị EC_{50} của sáu dòng nhạy nhất có biểu hiện quá mức ORL-1 trong dòng tế bào cơ sở ND7

	Dòng gốc	**1C11**	**4B7**	**4C9**	**4F4**	**1E6**	**3E9**
Tỷ lệ S/N 0,14nM/BK	1,7	9,3	11,1	5,3	3,6	5,8	5,1
Tỷ lệ S/N 100nM/BK	53	217	243	126	169	123	121
EC_{50} (nM)	>50	8,6 ± 2	5,7 ± 0,5	33 ± 11	24 ± 5	6,7 ± 1	>30 nM

Bảng 12 tóm lược các kết quả thu được từ việc tạo ra và thử nghiệm các dòng tế bào vô tính biểu hiện quá mức thụ thể ORL-1 trên các tế bào cơ sở khác nhau.

Bảng 12: Tóm lược các dòng tế bào vô tính biểu hiện quá mức thụ thể ORL-1 của người được kiểm tra với Noc/A

Dòng tế bào cơ sở	**Loài**	**Các dòng tế bào ổn định được thử nghiệm với liều dùng Noc/A đầy đủ**	**EC_{50} (nM)**
AGN P33	U nguyên bào thần kinh của người	Ba	0,6-2,5
ND7	Thể lai u nguyên bào thần kinh của chuột cống và DRG	Sáu	3,7-8
SK-N-DZ	U nguyên bào thần kinh của người	Không (7 dòng ổn định được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo)	N/A

Ví dụ 5. Phát triển các dòng tế bào vô tính từ dòng tế bào SK-N-DZ gốc

Ví dụ sau nhằm minh họa cách xác định các tế bào vô tính từ dòng tế bào gốc đã được thiết lập, mẫn cảm với sự ức chế sự xuất bào của endopeptidaza tái hướng đích hoặc có khả năng hấp thu endopeptidaza tái hướng đích.

1. Phân lập dòng tế bào vô tính

Trong khi xác định đặc điểm của dòng tế bào SK-N-DZ, đã phát hiện rằng các tế bào chứa dòng tế bào đã thiết lập này chứa ít nhất năm kiểu hình tế bào khác nhau. Để xác định xem liệu kiểu hình nào trong số các tế bào khác biệt về kiểu hình này chịu trách nhiệm về độ nhạy của dòng tế bào này đối với sự ức chế endopeptidaza tái hướng đích xuất bào, tiến hành hai lần sàng lọc pha loãng giới hạn khác nhau để thu dạng phân lập khuẩn lạc đơn đối với mỗi kiểu tế bào khác nhau về kiểu hình này.

Mật độ tế bào thích hợp từ giống gốc SK-N-DZ được cho phát triển trên DMEM, huyết thanh bào thai bò 10% (bị bất hoạt bởi nhiệt), axit amin không thiết yếu 0,1mM, HEPES 10mM, natri pyruvat 1mM, Penixilin 100U/ml, Streptomyxin 100µg/ml, được chứa trong bình nuôi cấy phủ T175 Colagen IV. Sau lần cấy chuyển thứ hai, tế bào này được xử lý với trypsin để tạo ra huyền phù tế bào và xác định nồng độ tế bào. Khoảng 4,0 x 10^6 tế bào từ dịch huyền phù tế bào này được chuyển vào ống 50mL và các tế bào này được phân ly thành các tế bào đơn bằng cách phun mạnh lặp lại qua kim tiêm cỡ 18,5 sử dụng ống tiêm 10mL. Sau đó, các tế bào từ dịch huyền phù tế bào đơn đã phân ly này được pha loãng đến nồng độ 0,2 x 10^6 tế bào/mL bằng cách bổ sung 15mL môi trường sinh trưởng mới và 2,5µL dung dịch pha loãng này được bổ sung vào 50mL môi trường sinh trưởng mới để thu được nồng độ 10 tế bào/mL. Từ phần pha

loãng gốc cuối cùng này, 100µL môi trường sinh trưởng được bổ sung vào từng lỗ trên các đĩa 96 lỗ có phủ Colagen IV và tế bào này được cho phát triển ở 37°C trong tủ ủ có cacbon dioxit 5% trong bốn tuần. Tạo ra bốn đĩa 96 lỗ để phân tích. Sau bốn tuần, từng lỗ này được xem xét trên kính hiển vi để xác định sự phát triển của các khuẩn lạc đơn và đối với mỗi khuẩn lạc được xác định này, bổ sung 100µL môi trường sinh trưởng mới vào mỗi lỗ và các tế bào này được cho phát triển yên trong tủ ủ 37°C có cacbon dioxit 5% trong hai tuần. Sau hai tuần phát triển, các khuẩn lạc phát triển đơn này được xử lý với trypsin và chuyển vào đĩa 96 lỗ mới để tiếp tục phát triển. Ngay khi khuẩn lạc được cho phát triển đến khoảng 1.000 tế bào, trên cơ sở kiểm tra bằng mắt thường, các tế bào này được xử lý với trypsin và mỗi dịch huyền phù tế bào này được chuyển vào lỗ mới trên đĩa 24 lỗ được phủ Colagen IV. Các tế bào này được phát triển trong tủ ủ 37°C có cacbon dioxit 5% với môi trường sinh trưởng mới được bổ sung từ 2 đến 3 ngày/lần, nếu cần. Các tế bào này được cho phát triển đến khi dịch nuôi cấy đạt độ che phủ khoảng 60% hoặc lớn hơn, khi đó các tế bào này được xử lý bằng trypsin và mỗi dịch huyền phù tế bào này được chuyển vào bình nuôi cấy 25cm^2 có phủ Colagen IV dựa trên sự che phủ của các tế bào trên đĩa 24 lỗ. Các tế bào này được cho phát triển trong tủ ủ 37°C có cacbon dioxit 5% với môi trường sinh trưởng mới được bổ sung từ 2 đến 3 ngày/lần, nếu cần. Ngay khi các tế bào trong bình nuôi cấy đạt độ che phủ khoảng từ 70 đến 80%, chúng được làm đông lạnh và bảo quản trong nitơ lỏng cho đến khi các dòng tế bào vô tính này được thử nghiệm để xác định tính mẫn cảm của chúng với sự ức chế sự xuất bào của Noc/A. Trong số 384 chủng phân lập khuẩn lạc ban đầu được tạo ra qua cả hai lần sàng lọc, 24 dòng tế bào vô tính được chọn lọc dựa trên tiêu chuẩn về khả năng sống và khả năng phát triển và được phát triển để thực hiện các quy trình sàng lọc tiếp theo. Trong số đó, đã xác định được 12 dòng tế bào phát triển nhanh.

2. Sàng lọc sơ bộ tính mẫn cảm đối với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích của các tế bào từ dòng tế bào vô tính bằng cách sử dụng endopeptidaza tái hướng đích

Để xác định xem liệu các tế bào từ dòng tế bào vô tính có mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza Noc/A tái hướng đích hay không, tiến hành sàng lọc sơ bộ bằng cách sử dụng phương pháp trên cơ sở miễn dịch để xác định hoạt tính endopeptidaza.

Mười ba dòng SK-N-DZ (#3, #4, #5, #8, #9, #10, #13, #15, #16, #17, #18, #22 và #23) cộng với tế bào SK-N-DZ gốc được cấy lên đĩa 96 lỗ (không biết số tế bào trong mỗi lỗ) trong EMEM, FBS 10%, 1x B27 và 1xN2 và được ủ qua đêm. Các tế bào này được xử lý với Noc/A 1nM trong thời gian 24 giờ. Các tế bào này được dung giải với

100µL đệm dung giải trong thời gian 20 phút và ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong thời gian 20 phút. Bổ sung 50µL đệm mẫu 2x SDS vào 50µL dịch dung giải tế bào và được gia nhiệt đến nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút. Nạp 10µL mẫu protein vào mỗi làn trên gel NuPage 12% và tiến hành phân tích thẩm tách Western như được mô tả trong Ví dụ 1. Đánh giá SNAP-25 tổng số và SNAP-25 đã phân cắt cho thấy rằng sự hấp thu Noc/A của các dòng #3, #8, #15 và #22 ít nhất là tốt như hấp thu các tế bào gốc. Xử lý và phân tích liều dùng đầy đủ được thực hiện với thử nghiệm ELISA kiểu bánh kẹp ECL sau khi các tế bào được nuôi cấy mẻ lớn.

3. Sàng lọc đáp ứng thứ cấp các dòng tế bào vô tính bằng cách sử dụng phân tử endopeptidaza tái hướng đích

Để xác định xem liệu các tế bào từ dòng tế bào vô tính có mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích Noc/A hay không, tiến hành sàng lọc thứ cấp bằng cách sử dụng phương pháp trên cơ sở miễn dịch để xác định hoạt tính endopeptidaza.

Để so sánh tiếp các dòng tế bào SK-N-DZ được nhân dòng này, thực hiện phân tích ELC ELISA kiểu bánh kẹp. Năm dòng (#3, #9, #15, #16, #22) cộng với tế bào SK-N-DZ gốc được cấy lên đĩa 96 lỗ phủ poly-D-lysin, mỗi dòng tế bào được cấy 25.000 tế bào mỗi lỗ trong môi trường RPMI 1640, FBS 10%, 1x B27 và 1x N2 (không có NGF) và để qua những ngày cuối tuần. Các tế bào được xử lý với Noc/A có liều lượng từ 0 đến 20nM (0, 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67, 20nM) trong thời gian 24 giờ. SNAP-25_{197} đã phân cắt được định lượng bằng phân tích ECL ELISA như đã được cụ thể hóa trong Ví dụ 1.

Bảng 13 thể hiện các giá trị EC_{50} và tỷ lệ tín hiệu - tiến hiệu nhiễu đối với năm dòng và dòng tế bào gốc của chúng. Có ba dòng là #3, #9 và #15 cho giá trị EC_{50} thấp hơn (< 1nM) và dòng #16 và #22 cho giá trị EC_{50} tương đương với dòng tế bào gốc (~ 2nM). Tuy nhiên, tổng lượng tín hiệu từ SNAP25 đã phân cắt là cao hơn trong dòng #3, #22 và các tế bào gốc. Các dòng #9, #16 và #15 có tổng lượng tín hiệu thấp hơn khi so sánh với các dòng tế bào còn lại.

Bảng 13. Bảng tóm tắt các tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu (S/N) và các giá trị EC_{50} của năm dòng thu được từ các tế bào SK-N-DZ bằng cách tách dòng pha loãng giới hạn

	Dòng gốc	**3**	**9**	**19**	**16**	**22**
Tỷ lệ S/N 0,03nM/BK	2	3	2	2	2	3

Bảng 13. Bảng tóm tắt các tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu (S/N) và các giá trị EC_{50} của năm dòng thu được từ các tế bào SK-N-DZ bằng cách tách dòng pha loãng giới hạn

	Dòng gốc	**3**	**9**	**19**	**16**	**22**
Tỷ lệ S/N 20nM/BK	19	27	12	8	14	20
EC_{50} (nM)	2,6 ± 1,5	0,8 ± 0,07	0,7 ±0,04	0,6 ± 0,1	2,2 ± 0,8	1,9 ± 0,6

Các điều kiện để xử lý Noc/A đối với các dòng SK-N-DZ được tối ưu hóa và một thử nghiệm được thực hiện để so sánh các dòng #3, #15 và #22 và dòng tế bào gốc SK-N-DZ không đồng nhất. Bảng 14 thể hiện kết quả so sánh và chứng minh là việc tối ưu hóa thử nghiệm cải thiện lớn đến tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu đối với thử nghiệm đó. Các dòng #3 và #22 được lựa chọn để tiến hành phát triển các thử nghiệm tiếp theo do chúng có độ nhạy và hiệu lực tốt.

Bảng 14. Bảng tóm tắt các tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu (S/N) và các giá trị EC_{50} của ba dòng thu được từ các tế bào SK-N-DZ với các điều kiện được tối ưu hóa

	Dòng gốc	**3**	**15**	**22**
Tỷ lệ S/N 0,03nM/BK	15	8	5	10
Tỷ lệ S/N 20nM/BK	107	89	33	60
EC_{50} (nM)	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,09

Ví dụ 5. Xác định đặc tính và so sánh các dòng tế bào vô tính đối với sự hấp thu endopeptidaza tái hướng đích

Ví dụ sau đây nhằm minh họa cách xác định đặc tính và so sánh các dòng tế bào vô tính có nguồn gốc từ một dòng tế bào đã thiết lập chứa một quần thể không đồng nhất hoặc bằng cách chuyển nhiễm thụ thể đích và tiếp đó là tách dòng dòng tế bào đó.

Để đánh giá tính đặc hiệu hoặc tính chọn lọc của việc hấp thu endopeptidaza tái hướng đích, tiến hành các thử nghiệm hấp thu không đặc hiệu bằng cách sử dụng endopeptidaza tái hướng đích thiếu vùng đích. Đối với endopeptidaza tái hướng đích opioit, các tế bào từ dòng tế bào AGN P33 dòng #6 (chứa các tế bào được chuyển nhiễm ổn định với cấu trúc biểu hiện mã hóa thụ thể ORL-1) và dòng tế bào SK-N-DZ

dòng #3 và #22 (chứa các tế bào biểu hiện thụ thể nội sinh ORL-1) được cấy với lượng 150.000 tế bào trên mỗi lỗ trên đĩa 96 lỗ phủ poly-D-lysin trong môi trường RPMI 1640 không có huyết thanh chứa chất bổ sung N2 và B27 và NGF (50ng/mL) và được ủ trong thời gian 20 ±4 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ có CO_2 5% trước khi xử lý với hợp chất. Các tế bào này được xử lý với 8 liều dùng Noc/A có phạm vi nằm trong khoảng từ 0 đến 20nM hoặc từ 0 đến 40nM và hoặc 8 liều dùng LH_N/A có phạm vi nằm trong khoảng từ 0 đến 400nM hoặc từ 0 đến 40nM trong cùng môi trường trong thời gian 22 giờ. Sau đó các môi trường này được loại bỏ và các tế bào được rửa, dung giải và được ly tâm để loại bỏ mảnh vụn trong phần tạo ra để thử nghiệm ELISA kiểu bánh kẹp. Một đĩa ELISA phủ kháng thể 2E2A6 đơn dòng được phong bế với 150µL đệm phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Sau khi đệm phong bế được loại bỏ, 30µL dịch dung giải tế bào được bổ sung vào từng lỗ và đĩa được ủ ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 2 giờ. Đĩa này được rửa ba lần với PBS-T và 30µL kháng thể đa dòng phát hiện α-SNAP25 được đánh dấu SULFO-TAG NHS-Ester 5µg/mL trong chất phong bế 2% trong PBS-T được bổ sung vào góc đáy các lỗ. Đĩa này được dán kín và lắc ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, sau đó rửa ba lần với PBS-T. Sau khi rửa xong, bổ sung 150µL 1x đệm đọc vào mỗi lỗ và đọc đĩa này trên thiết bị đọc hình ảnh SI6000. Các kết quả so sánh lượng hấp thu Noc/A so với mẫu đối chứng âm LH_N/A được thể hiện trong Bảng 15 và Bảng 16. Các kết quả này chỉ ra rằng có khoảng cách tốt giữa sự hấp thu Noc/A và LH_N/A trong cả hai dòng tế bào, chứng minh tính hấp thu đặc hiệu Noc/A.

Bảng 15. Hấp thu không đặc hiệu đối với SK-N-DZ dòng #3.
Tóm tắt bốn thí nghiệm độc lập

nM	**% hấp thu không đặc hiệu**	**SEM (sai số chuẩn của giá trị trung bình)**
0	2	0,5
1	6	0,5
2	8	0,5
5	10	1
15	19	0,9

Bảng 15. Hấp thu không đặc hiệu đối với SK-N-DZ dòng #3.

Tóm tắt bốn thí nghiệm độc lập

nM	% hấp thu không đặc hiệu	SEM (sai số chuẩn của giá trị trung bình)
44	33	1,5
133	65	2,4
400	93	2,3

Bảng 16. Hấp thu không đặc hiệu đối với các tế bào hORL-1 #6. Tóm tắt ba thí nghiệm độc lập

nM	% hấp thu không đặc hiệu	SEM (sai số chuẩn của giá trị trung bình)
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

Bảng 17 tóm lược các kết quả đối với việc xác định đặc tính và so sánh giữa ba dòng tế bào. Các tế bào vô tính SK-N-DZ các dòng #3 và #22 có độ nhạy giống hệt với eDRG sơ cấp và có tỷ lệ tín hiệu – tín hiệu nhiễu rất tốt để phát triển thử nghiệm tin cậy đối với endopeptidaza tái hướng đích Noc/A. Tế bào vô tính AGN P33 dòng #6 cũng là một ứng viên rất tốt với việc hấp thu không đặc hiệu và độ nhạy thích hợp.

Bảng 17

Thông số	SK-N-DZ dòng 3	SK-N-DZ dòng 22	AGN P33 dòng 6	eDRG
Loại dòng tế bào	Dòng vô tính của người	Dòng vô tính của người	Dòng vô tính của người	Sơ cấp của chuột cống

Bảng 17

Thông số	SK-N-DZ dòng 3	SK-N-DZ dòng 22	AGN P33 dòng 6	eDRG
Biểu hiện thụ thể tế bào	ORL1 nội sinh của người	ORL1 nội sinh của người	ORL1 được chuyển nhiễm của người	ORL1 nội sinh của chuột cống
Khoảng động lực học	Đáp ứng liều dùng từ 0,03 đến 20nM	Đáp ứng liều dùng từ 0,03 đến 20nM	Đáp ứng liều dùng từ 0,04 đến 40nM	Đáp ứng liều dùng từ 0,17 đến 20nM
Độ nhạy (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)
ULOQ	20nM	20nM	20nM	10-20nM
S/N ULOQ/nền	98 ± 15 (N=10)	86 ± 17 (N=9)	385 ± 32 (N=19)	~300
S/N LLOQ/nền	12 ± 2 (N=11)	10 ± 2 (N=9)	29 ± 7 (N=18)	N/A
Tính đặc hiệu so với LH_N/A	≥ 2 log (N=4)	≥ 2 log (N=4)	≥ 2 log (N=3)	N/A
Biểu hiện SNAP-25	Nội sinh	Nội sinh	Nội sinh	Nội sinh
Cạnh tranh với Nociceptin Var.	Cạnh tranh toàn phần (n=4)	Cạnh tranh toàn phần (n=4)	Cạnh tranh một phần (n=4)	N/A
Ức chế bởi Ab kháng-nociceptin	Cạnh tranh toàn phần (n=4)	Cạnh tranh toàn phần (n=4)	Cạnh tranh toàn phần (n=4)	N/A
Ức chế bởi Ab kháng-868	Cạnh tranh một phần (N=3)	Cạnh tranh một phần (N=3)	Cạnh tranh một phần (N=3)	N/A

Để đánh giá độ nhạy của quá trình hấp thu endopeptidaza tái hướng đích, tiến hành các thử nghiệm liên kết bão hòa phối tử. Tương tác của hầu hết các phối tử với các vị trí liên kết của nó có thể được xác định về mặt ái lực liên kết (hướng dẫn thử nghiệm NIH). Nói chung, liên kết với ái lực cao liên quan đến thời gian lưu trú dài hơn của phối tử đó tại vị trí liên kết thụ thể của nó so với trường hợp có ái lực liên kết thấp. Hằng số phân ly thường được sử dụng để mô tả ái lực giữa phối tử (**L**) (chẳng hạn như thuốc) và protein (**P**), nghĩa là mức độ liên kết chặt của một phối tử liên kết với protein cụ thể như thế nào. Một thí nghiệm liên kết cân bằng bão hòa tại trạng thái cân bằng xác định tổng liên kết và liên kết không đặc hiệu (NSB) ở các nồng độ phối tử phóng

xạ khác nhau. Hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng hoặc ái lực đối phối tử phóng xạ, K_d và số lượng tối đa các vị trí liên kết của thụ thể, B*max*, có thể được tính toán từ các liên kết đặc hiệu (tổng số - NSB) bằng cách sử dụng phân tích hồi quy phi tuyến tính. K_d đối với liên kết đặc hiệu này có thể được tính toán bằng cách sử dụng phân tích hồi quy phi tuyến tính hypecbon cho một vị trí liên kết (nghĩa là GraphPad Prism) như được thể hiện trong phương trình bên dưới, trong đó B*max* là số vị trí liên kết tối đa (pmol/mg hoặc pmol/tế bào hoặc vị trí/tế bào) và K_d (nM, pM, v.v..) là nồng độ của phối tử phóng xạ cần để đạt đến liên kết bán phần tối đa:

$$\text{Liên kết} = \frac{B_{max} \text{ x } [L]}{[L] + K_d}$$

Đối với endopeptidaza được tái hướng đích opioit, các tế bào từ dòng tế bào AGN P33 dòng #6 (bao gồm các tế bào được chuyển nhiễm ổn định với cấu trúc biểu hiện mã hóa thụ thể ORL-1), dòng tế bào gốc SK-N-DZ và các tế bào vô tính SK-N-DZ các dòng #3, #15 và #22 (chứa các tế bào biểu hiện thụ thể ORL-1 nội sinh) được cấy với mật độ 200.000 tế bào/lỗ trên đĩa 48 lỗ phủ poly-D-lysin trong các môi trường không chứa huyết thanh RPMI 1640 chứa các chất bổ sung 1x N2 và 1x B27 và ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ chứa CO_2 5%. Loại bỏ môi trường và bổ sung các tế bào và 50µL đệm liên kết Tris vào các lỗ được sử dụng để đánh giá tổng lượng liên kết, bổ sung 100µL đệm liên kết Tris vào lỗ được sử dụng để đánh giá liên kết không đặc hiệu. Khoảng 50µL nociceptin lạnh có nồng độ cuối 4x (2,5µM vào các dòng tế bào SK-N-DZ và 1µM vào tế bào vô tính AGN P33 dòng #6) được bổ sung vào lỗ liên kết không đặc hiệu và 50µL ^{3}H-nociceptin có nồng độ cuối 4x (0nM, 0,05nM, 0,1nM, 0,2nM, 0,4nM, 0,8nM, 1,6nM, 3,1 nM, 6,3nM, 12,5nM, 25nM và 50nM vào các dòng tế bào SK-N-DZ và 0, 0,01nM, 0,02nM, 0,039nM, 0,078nM, 0,156nM, 0,313nM, 0,625nM, 1,25nM, 2,5nM, 5,0nM và 10nM vào dòng tế bào vô tính AGN P33 #6) được bổ sung vào cả hai lỗ liên kết đặc hiệu và lỗ liên kết không đặc hiệu với thể tích cuối bằng 200µL. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 30 phút, lỗ này được rửa hai lần trong 0,5mL đệm rửa lạnh. Tiếp đó tế bào được biến tính trong 200µL NaOH 2N và chuyển vào các lọ nhấp nháy 20mL chứa 5mL dịch nhấp nháy. Dữ liệu thô được sử dụng để vẽ các đồ thị đáp ứng liều dùng và tính toán K_d cho từng mẫu. Dữ liệu thô thu được được chuyển vào phần mềm SigmaPlot v10.0 và điều chỉnh bão hòa một vị

trí (One Site Saturation fit) được sử dụng để xác định các đường cong đáp ứng liều dùng theo loại phương trình liên kết phối tử. Các báo cáo dạng đồ thị được tạo ra bao gồm các thông số sau: R^2 (hệ số tương quan), B*max* và $K_d \pm SE$ (hệ số ± sai số chuẩn). Các đồ thị liên kết tổng số, liên kết đặc hiệu và liên kết không đặc hiệu thu được từ thử nghiệm được thực hiện trên tế bào vô tính SK-N-DZ dòng #3, #15 và #22 và các tế bào vô tính AGN P33 dòng #6. Tế bào vô tính SK-N-DZ dòng #3 và #22 tạo ra liên kết ^{3}H-nociceptin phụ thuộc nồng độ và bão hòa. Trong cùng điều kiện thí nghiệm, tế bào vô tính SK-N-DZ dòng #15 tạo ra đáp ứng phụ thuộc vào liều dùng của ^{3}H-nociceptin, nhưng không bão hòa ở nồng độ liều dùng cao nhất bằng 50nM. Khi so sánh các dòng tế bào SK-N-DZ biểu hiện ORL-1 nội sinh, các tế bào từ tế bào vô tính AGN P33 dòng #6 có ái lực liên kết cao đáng kể với ^{3}H-nociceptin (liều dùng cao nhất là 10nM so với 50nM trong SK-N-DZ) với liên kết không đặc hiệu thấp.

Các đường cong liên kết bão hòa của tế bào vô tính SK-N-DZ các dòng #3, #22, #15 và tế bào vô tính AGN P33 dòng #6 được sử dụng để đánh giá các trị số K_d và B*max* từ ba thử nghiệm liên kết độc lập cho từng dòng tế bào trong ba ngày khác nhau. Thứ tự xếp hạng của bốn dòng tế bào này là: tế bào vô tính AGN P33 dòng #6 (K_d=1,86nM và B*max*=2,9 fmol/tế bào) > tế bào vô tính SK-N-DZ dòng #3 (K_d=14nM và B*max*=0,6 fmol/tế bào) ≥ tế bào vô tính SK-N-DZ dòng #22 (K_d=17nM và B*max*=0,6 fmol/tế bào) >> tế bào vô tính SK-N-DZ dòng #15 (K_d>50nM). Để thu được đáp ứng liều dùng bão hòa cho tế bào vô tính SK-N-DZ dòng #15, cần sử dụng mức liều dùng ^{3}H-nociceptin cao hơn. Bảng 16 tóm lược dữ liệu về đặc tính của các vị trí liên kết đặc hiệu nociceptin trên màng tế bào huyết tương trong ba dòng tế bào vô tính SK-N-DZ, #3, #15 và #22 và tế bào vô tính AGN P33 dòng #6. Dữ liệu này cho thấy: 1) vị trí có ái lực cao với liên kết không đặc hiệu thấp (K_d, 1,8nM và B*max* 2,9 fmol/tế bào) trong tế bào vô tính AGN P33 dòng #6; 2) liên kết nociceptin có thể được tiến hành trên các tế bào SK-N-DZ nguyên thể có biểu hiện thụ thể nội sinh; 3) tế bào vô tính AGN P33 dòng #6 có ái lực với nociceptin cao gấp khoảng 10 lần so với các dòng tế bào SK-N-DZ; 4) như đã được quan sát thấy trong thử nghiệm hiệu lực trên cơ sở tế bào, tế bào vô tính SK-N-DZ các dòng #3 và #22 (K_d 14-17nM, B*max* 0,6 fmol/tế bào) có vị trí thụ thể trên một tế bào nhiều hơn so với tế bào vô tính SK-N-DZ dòng #15 (không thể bão hòa bởi cùng mức liều lượng).

Bảng 18. Tóm tắt thử nghiệm liên kết bão hòa của ^{3}H-nociceptin đối với bốn dòng tế bào dẫn đầu (n=3 thử nghiệm độc lập)

Dòng tế bào	**K_d (nM±SD)**	**B*max* (fmol/tế bào)**
SK-N-DZ #3	14 ± 1,6	0,59
SK-N-DZ #15	>50	ND
SK-N-DZ #22	16,7 ± 1,1	0,58
Tế bào vô tính AGN P33 dòng #6	1,86 ± 0,1	2,89

Để đánh giá độ nhạy của sự hấp thu endopeptidaza tái hướng đích, lượng thụ thể endopeptidaza tái hướng đích được biểu hiện ở mức mARN được đánh giá bằng cách sử dụng RT-PCR. Lượng thụ thể được biểu hiện trên tế bào là một khía cạnh quan trọng về đặc tính của dòng tế bào được sử dụng để thử nghiệm và nó liên quan đến độ nhạy với endopeptidaza tái hướng đích. Lượng thụ thể endopeptidaza tái hướng đích đã được biểu hiện cũng có thể là một công cụ để sàng lọc các dòng tế bào tiềm năng khác và để loại bỏ các dòng tế bào không biểu hiện thụ thể đích. Một phương pháp để xác định sự biểu hiện của thụ thể là định lượng mARN của thụ thể endopeptidaza tái hướng đích bằng cách sử dụng PCR thời gian thực (RT-PCR).

Đối với endopeptidaza tái hướng đích opioit, ARN được phân lập từ các tế bào của dòng tế bào SiMa gốc không được chuyển nhiễm, các tế bào từ tế bào vô tính AGN P33 dòng #6, các tế bào từ dòng tế bào SK-N-DZ gốc và các tế bào từ tế bào vô tính SK-N-DZ các dòng #3 và #22 được cho phát triển trong môi trường không có huyết thanh hoặc môi trường có huyết thanh. mARN này được chuyển thành cADN và ORL-1 được khuyếch đại và được đo theo thời gian thực để xác định lượng ADN có mặt tương đối trong mỗi dòng tế bào bằng cách sử dụng các đoạn mồi oligonucleotit sau đây cho ORL-1: mồi xuôi 5'-CACTCGGCTGGTGCTGGTGG-3′ (SEQ ID NO: 148) và mồi ngược 5′-AATGGCCACGGCAGTCTCGC-3′ (SEQ ID NO: 149). ADN này được định lượng bằng cách sử dụng SYBR® xanh lá cây mà phát huỳnh quang so với lượng ADN chuỗi kép (sản phẩm PCR) có mặt trong phản ứng đó. Vẽ đồ thị lượng huỳnh quang và số chu kỳ sẽ thu được đường cong logictic với mỗi phản ứng. Phản ứng càng nhanh đạt đến pha tuyến tính của đường cong, thì có càng nhiều cADN của

thụ thể ORL-1 trong phản ứng. Phản ứng RT đối chứng, không có mặt enzym, được sử dụng để xác định nếu có tạp chất. Do enzym RT không có mặt trong phản ứng này, nên cADN sẽ không được tạo ra. Sản phẩm PCR không thể được tạo ra bằng cách sử dụng khuôn ARN, do đó nếu xuất hiện đường cong PCR trong phản ứng -RT thì chỉ có thể là do sự nhiễm tạp ADN của hệ gen. Trong các phản ứng –RT, không xuất hiện biểu đồ PCR, xác nhận rằng có sự nhiễm tạp ADN của hệ gen tối thiểu (dữ liệu không được thể hiện). Bảng 18 liệt kê các dòng tế bào với giá trị CT của chúng. CT là số chu kỳ PCR sử dụng để cho phản ứng PCR tương ứng tạo ra tín hiệu trên một ngưỡng định trước. Lượng mARN của thụ thể ORL-1 trong một dòng tế bào có thể được so sánh với lượng mARN trong dòng khác bằng cách tìm các giá trị CT tương ứng của chúng. Theo các giá trị CT này, các tế bào từ tế bào vô tính AGN P33 dòng #6 có mARN của ORL-1 lớn hơn nhiều so với các tế bào từ dòng tế bào SiMa gốc trong môi trường không có huyết thanh (giá trị trung bình CT: 28,6 so với 17,3) và trong môi trường có huyết thanh (giá trị trung bình CT: 26,1 so với 16,5). Ngoài ra, có một sự khác biệt tối thiểu về lượng mARN thu được từ các tế bào tại lần cấy chuyển thứ 6 so với các tế bào tại lần cấy chuyển thứ 16 của tế bào vô tính AGN P33 dòng #6. Ngoài ra, có sự khác biệt tối thiểu giữa các giá trị CT và biểu đồ trong dòng tế bào gốc SK-N-DZ so với tế bào vô tính các dòng #3 và #22. Kết luận này đúng với các tế bào được phát triển trong môi trường có và không có huyết thanh và nó phản ánh tính tương tự của các dòng tế bào quan sát được trong thử nghiệm hiệu lực trên cơ sở tế bào đối với Noc/A.

Bảng 19. Giá trị CT trung bình đối với sự biểu hiện ORL-1 trong các dòng tế bào

Môi trường	**Dòng tế bào**	**CT trung bình**
Môi trường không có huyết thanh	SiMa gốc p26	28,6
	SiMa hORL-1 dòng #6 p6	17,3
	SiMa hORL-1 dòng #6 p16	17,3
Môi trường đầy đủ	SiMa gốc p26	26,1
	SiMa hORL-1 dòng #6 p6	16,4
	SiMa hORL-1 dòng #6 p16	16,6
Môi trường không	SK-N-DZ	26,3

Môi trường	Dòng tế bào	CT trung bình
có huyết thanh	SK-N-DZ dòng #3	25,9
	SK-N-DZ dòng #22	26,6
Môi trường đầy đủ	SK-N-DZ	26,2
	SK-N-DZ dòng #3	25,8
	SK-N-DZ dòng #22	26,4

Ví dụ 7. Phát triển các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A

Ví dụ sau đây nhằm minh họa cách tạo ra các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A.

1. Tạo kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng

Để phát triển các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, đoạn peptit 13 gốc CDSNKTRIDEANQ$_{COOH}$ (SEQ ID NO: 38) đã được thiết kế là một sản phẩm kháng nguyên SNAP-25 có thể phân cắt. Đoạn peptit này chứa một vùng liên kết linh động và gốc cystein đầu N để tiếp hợp với KLH và các axit amin 186-197 trong SNAP-25 của người (SEQ ID NO: 5) có glutamin ở đầu C được carboxyl hóa (SEQ ID NO: 38). Việc tạo ra các kháng thể đơn dòng có trình tự peptit duy nhất, được lựa chọn kỹ cho phép kiểm soát toàn bộ tính đặc hiệu của epitop, cho phép nhận dạng các tiểu quần thể cụ thể của protein này trong tập hợp các đồng phân có liên quan mật thiết. Các tra cứu Blast đã cho thấy rằng đoạn peptit này chỉ có tính tương đồng cao với SNAP-25 và hầu như không có khả năng phản ứng chéo với các protein khác trong các tế bào thần kinh. Trình tự này cũng được nghiên cứu kỹ lưỡng bằng cách sử dụng các thuật toán tính toán trên máy tính để xác định chỉ số thủy liệu pháp, xác suất bề mặt protein, các vùng linh động và cấu trúc bậc hai có lợi, sau đó định hướng và trình diện chính xác trình tự peptit được lựa chọn. Peptit được tổng hợp và tiếp hợp với Hemoxyanin lấy từ con hà (KLH) để làm tăng tính gây miễn dịch. Sáu con chuột Balb/c được gây miễn dịch bằng peptit này và sau ba lần chủng ngừa

trong khoảng tám tuần, các con chuột này được lấy máu để thử nghiệm. Mẫu máu này được để cho đông tụ lại bằng cách ủ ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 60 phút. Tiếp đó, ly tâm mẫu máu đã đông tụ này ở 10.000x g ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 10 phút để tạo viên kết phần cặn mảnh tế bào. Mẫu huyết thanh thu được này được chia thành các phần chia đều 50µl và bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi cần sử dụng.

Một chiến lược tương tự dựa trên các kháng nguyên SNAP-25 khác theo sáng chế được sử dụng để phát triển các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng mà có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Ví dụ, kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45 có thể được tiếp hợp với KLH thay cho kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 38. Là một ví dụ khác, các axit amin 186-197 của SNAP-25 ở người từ kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 38 có thể được thay thế bằng 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 hoặc SEQ ID NO: 44.

2. Sàng lọc sự có mặt của các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng

Để xác định sự có mặt của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, tiến hành ELISA so sánh và thử nghiệm phân cắt trên cơ sở tế bào bằng cách sử dụng huyết thanh chuột đã được chiết. Đối với ELISA so sánh, hai protein dung hợp được thiết kế: BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 48 và BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ chứa đoạn peptit BirA có 16 axit amin được biotyl hóa một cách tự nhiên, có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 50 được liên kết đầu amin với peptit SNAP-25 có các axit amin 134-197 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ chứa đoạn peptit BirA có 16 axit amin được biotinyl hóa một cách tự nhiên có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 50 được liên kết đầu amin với peptit SNAP-25 chứa axit amin 134-206 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5. Hai cơ chất này được tạo hỗn dịch trong 1 x PBS với nồng độ 10µg/mL BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ và BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$. BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ và BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ này được phủ lên trên các đĩa riêng rẽ bằng cách bổ sung khoảng 100µl dung dịch cơ chất thích hợp và ủ các đĩa

này ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Các đĩa đã được rửa này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian một giờ với BSA 0,5% trong 1 x TBS chứa dịch pha loãng từ 1:10 đến 1:100 của huyết thanh chứa kháng thể có nguồn gốc từ một trong sáu con chuột nhắt đã được gây miễn dịch (chuột nhắt số 1, chuột nhắt số 2, chuột nhắt số 3, chuột nhắt số 4, chuột nhắt số 5 và chuột nhắt số 6). Các đĩa dò kháng thể sơ cấp này được rửa bốn lần, mỗi lần 5 phút bằng 200µl TBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Các đĩa đã được rửa này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ với 1 x TBS chứa dịch pha loãng 1:10.000 của kháng thể IgG đa dòng của dê kháng chuột được tiếp hợp với peroxidaza của cây cải ngựa (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) đóng vai trò làm kháng thể thứ cấp. Các đĩa dò kháng thể thứ cấp này được rửa bốn lần trong 200µl TBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Phát hiện sự sinh màu của các sản phẩm SNAP-25 đã được đánh dấu được quan sát thấy bằng cách phát hiện sự sinh màu bằng cách sử dụng bộ kít cơ chất ImmunoPure TMB (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Sự hiện màu vàng trong đĩa đã được phủ BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197,}$ nhưng không xuất hiện màu vàng trong đĩa đã được phủ BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$, chỉ ra rằng kháng thể α-SNAP-25 ưu tiên nhận dạng sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt. Kết quả này cũng chỉ ra rằng trong sáu con chuột được sử dụng để gây miễn dịch này, có ba con chuột nhắt (chuột nhắt số 2, chuột nhắt số 3 và chuột nhắt số 4) có các hiệu giá cao hơn và có tính đặc hiệu cao hơn đối với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A.

Các kết quả này đã được kiểm chứng bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính ELISA chuỗi nhẹ. Một đĩa 96 lỗ phủ Reacti-Bind Streptavidin (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) được chuẩn bị bằng cách bổ sung khoảng 100µl dung dịch cơ chất sau: các hàng A-C được phủ 100µL BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ với mười hai nồng độ khác nhau; các hàng D-H được phủ 100µL BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ với nồng độ 10µg/mL. Các đĩa này được rửa bằng cách hút dung dịch cơ chất và lắc rửa mỗi lỗ ba lần bằng 200µl TBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Dịch pha loãng BoNT/A đã được khử trước ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 20 phút trong đệm ủ BoNT/A (HEPES 50mM, độ pH=7,4, huyết thanh bào thai bò 1%, $ZnCl_2$ 10µM, dithiotrietol 10mM) và 100µl BoNT/A đã được khử trước được bổ sung vào đĩa có phủ cơ chất và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 90 phút. Đĩa đã được xử lý

BoNT/A được rửa bằng cách hút đệm ủ BoNT/A và lắc rửa mỗi đĩa ba lần bằng 200µl TBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Đĩa đã được rửa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian một giờ với BSA 0,5% có 1 x TBS chứa dịch pha loãng từ 1:10 đến 1:100 của huyết thanh chứa kháng thể được thử nghiệm. Các đĩa dò kháng thể sơ cấp được rửa bốn lần, mỗi lần trong thời gian 5 phút bằng 200µl TBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Đĩa đã được rửa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ với 1 x TBS chứa dịch pha loãng 1:10.000 của kháng thể IgG đơn dòng của dê kháng chuột được tiếp hợp với peroxidza của cây cải ngựa (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) đóng vai trò làm kháng thể thứ cấp. Các đĩa dò kháng thể thứ cấp được rửa bốn lần bằng 200µl TBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Phát hiện sự sinh màu của các sản phẩm SNAP-25 đã được đánh dấu được quan sát bằng cách phát hiện sự sinh màu bằng cách sử dụng bộ kít cơ chất ImmunoPure TMB (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Sự hiện màu vàng có liên quan đến sự có mặt của sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt phát hiện được trong các mẫu đã được xử lý bằng BoNT/A, nhưng không phát hiện thấy trong các đối chứng không được xử lý, bằng cách sử dụng huyết thanh chứa kháng thể từ sáu con chuột nhắt đã được gây miễn dịch (chuột nhắt số 1, chuột nhắt số 2, chuột nhắt số 3, chuột nhắt số 4, chuột nhắt số 5 và chuột nhắt số 6). Vì vậy, thử nghiệm ELISA so sánh đã chỉ ra rằng trong số những con chuột nhắt được sử dụng để gây miễn dịch, ba con chuột nhắt (chuột nhắt số 2, chuột nhắt số 3 và chuột nhắt số 4) có các hiệu giá cao hơn và có tính đặc hiệu cao hơn đối với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A.

Đối với thử nghiệm phân cắt trên cơ sở tế bào, mật độ thích hợp của các tế bào PC12 được cấy lên các đĩa nuôi cấy mô diện tích 60mm^2 chứa 3mL môi trường thích hợp có huyết thanh (Bảng 1). Các tế bào này được phát triển trong tủ ủ ở nhiệt độ 37°C, có cacbon dioxit 5% cho đến khi các tế bào đạt được mật độ mong muốn. Pha chế 500µL dung dịch chuyển nhiễm bằng cách bổ sung 250µL môi trường OPTI-MEM giảm huyết thanh chứa 15µL LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian năm phút vào 250µL môi trường OPTI-MEM giảm huyết thanh chứa 10µg cấu trúc biểu hiện pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (SEQ ID NO: 51). Cấu trúc biểu hiện pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC này có vectơ biểu hiện pQBI-25 (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA) có thành phần đoạn khởi đầu phiên mã

được liên kết về mặt chức năng với polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ GFP-BoNT/A có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 52. Hỗn hợp chuyển nhiễm này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian khoảng 20 phút. Môi trường này được thay thế bằng môi trường bổ sung mới và 500µL dung dịch chuyển nhiễm được bổ sung vào các tế bào đó. Tiếp đó, ủ các tế bào này trong tủ ủ ở nhiệt độ 37°C có cacbon dioxit 5% trong thời gian khoảng từ 6 đến 18 giờ. Rửa và thu các tế bào này như đã được mô tả trong Ví dụ 2. Để phát hiện sự có mặt của sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt, phần chia đều từ mẫu thu được này được phân tích bằng thẩm tách Western như đã được mô tả trong Ví dụ 2, ngoại trừ kháng thể sơ cấp được sử dụng là dịch pha loãng 1:1.000 của huyết thanh chứa kháng thể và kháng thể thứ cấp được sử dụng là peroxidaza cải ngựa α-IgG của chuột (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) pha loãng 1:20.000. Một băng đơn tương ứng với sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt đã phát hiện được trong các mẫu được xử lý BoNT/A, nhưng không phát hiện được trong các đối chứng không được xử lý, bằng cách sử dụng huyết thanh chứa kháng thể thu được từ ba con chuột nhắt (chuột nhắt số 2, chuột nhắt số 3 và chuột nhắt số 4). Vì vậy, thử nghiệm phân cắt trên cơ sở tế bào này đã chỉ ra rằng trong số các con chuột nhắt được sử dụng để gây miễn dịch, ba con chuột nhắt (chuột nhắt số 2, chuột nhắt số 3 và chuột nhắt số 4) có các hiệu giá cao hơn và có tính đặc hiệu cao hơn đối với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A.

3. Tạo tế bào lai

Để tạo ra các tế bào lai sản sinh ra các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, thu lá lách từ chuột nhắt số 2 ba ngày sau khi tạo miễn dịch "liều bổ sung" lần cuối và các tế bào lá lách này được dung hợp với các tế bào u tủy P3-X63 Ag8.653 bằng cách sử dụng các quy trình lai tế bào chuẩn. Các tế bào này được cấy lên năm đĩa 96 lỗ và các thể lai được lựa chọn bằng cách sử dụng môi trường HAT. Trong vòng từ 8 đến 14 ngày sau khi dung hợp, việc sàng lọc lần đầu tiên đối với khoảng 480 dòng gốc được tiến hành bằng cách sử dụng ELISA so sánh với peptit BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ và BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ được phủ lên hai đĩa riêng biệt. ELISA so sánh này cung cấp một phương pháp sàng lọc nhanh để nhận dạng thể lai sản sinh ra kháng thể đặc hiệu đối với SNAP-25_{197} đã được phân cắt, 18 dòng vô tính trên cùng còn được sàng lọc bằng

cách sử dụng thử nghiệm phân cắt trên cơ sở tế bào nêu trên và nhuộm màu miễn dịch các tế bào đã được chuyển nhiễm LC/A. (Bảng 20).

Bảng 20. Phân tích dịch nổi bề mặt chứa kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng

Dòng	ELISA so sánh				Thử nghiệm trên cơ sở tế bào	
	OD $SNAP\text{-}25_{197}$	OD $SNAP\text{-}25_{206}$	Tỷ lệ$_{197/206}$	Tỷ lệ$_{206/197}$	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$
1D3	1,805	0,225	8,02	0,13	+++	–
1F12	0,365	0,093	3,92	0,25	–	–
1G10	0,590	0,137	4,31	0,23	++	–
1H1	0,335	0,121	2,77	0,36	–	–
1H8	0,310	0,302	1,03	0,97	+	–
2C9	0,139	0,274	0,51	1,97	–	–
2E2	0,892	0,036	24,78	0,04	++	–
2E4	0,228	0,069	3,30	0,30	+	–
2F11	1,095	1,781	0,61	1,63	–	–
3C1	1,268	0,053	23,92	0,04	++	–
3C3	0,809	0,052	15,56	0,06	++	–
3E1	0,086	0,155	0,55	1,80	0	–
3E8	2,048	0,053	38,64	0,03	+++	–
3G2	0,053	0,158	0,34	2,98	–	–
4D1	0,106	0,218	0,49	2,06	–	–
4G6	0,061	0,159	0,38	2,61	–	–
5A5	0,251	0,106	2,37	0,42	+	–
5F11	0,243	0,061	3,98	0,25	–	–

Các dòng 1D3, 1G10, 2E2, 3C1, 3C3 và 3E8 còn được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn bởi vì các môi trường có điều kiện được tạo ra bởi các dòng chứa các kháng thể α-SNAP-25, có tính đặc hiệu liên kết ưu tiên với tỷ lệ$_{197/206}$ ít nhất là 4:1 của sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt so với cơ chất $SNAP\text{-}25_{206}$ không được phân cắt và sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt phát hiện được bằng cách sử dụng thử nghiệm phân cắt trên cơ sở tế bào và nhuộm màu miễn dịch các tế bào PC12 được chuyển nhiễm với

GFP-LC/A. Các dòng tương tự 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 và 4G6 còn được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn bởi vì các môi trường có điều kiện được tạo ra bởi các dòng này chứa kháng thể α-SNAP-25 có tính đặc hiệu liên kết ưu tiên với tỷ lệ$_{206/197}$ ít nhất là 1,5:1 của cơ chất SNAP-25$_{206}$ không được phân cắt so với sản phẩm SNAP-25$_{197}$ phân cắt và phát hiện cơ chất SNAP-25$_{206}$ không được phân cắt bằng cách sử dụng thử nghiệm phân cắt trên cơ sở tế bào. Các dòng có nguồn gốc từ tế bào đơn này được sàng lọc lại bằng cách sử dụng ELISA so sánh, phân cắt trên cơ sở tế bào và nhuộm màu miễn dịch để xác nhận ái lực và tính đặc hiệu của chúng và các kháng thể này được phân typ bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn. Dịch cổ trướng được tạo ra từ các dòng 1D3B8 (IgM.k), 1G10A12 (IgG3.k), 2C9B10 (IgG3.k), 2E2A6 (IgG3.k), 2F11B6 (IgM.k), 3C1A5 (IgG2a.k) và 3C3E2 (IgG2a.k). Dòng 3E8 ngừng sản xuất các kháng thể trong quá trình tách dòng nên không được đánh giá tiếp.

4. Đánh giá tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng

Để đánh giá tính đặc hiệu liên kết của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, dịch cổ trướng thu được từ các dòng 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5 và 3C3E2 được sử dụng để phát hiện sản phẩm SNAP-25 phân cắt bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính trên cơ sở tế bào, phương pháp hóa mô miễn dịch và kết tủa miễn dịch.

Đối với thử nghiệm hoạt tính trên cơ sở tế bào, tính đặc hiệu liên kết được xác định bằng cách phân tích khả năng của dịch cổ trướng chứa kháng thể α-SNAP-25 để phát hiện cơ chất SNAP-25$_{206}$ không được phân cắt và sản phẩm SNAP-25$_{197}$ phân cắt bằng phương pháp phân tích thẩm tách Western. Mật độ thích hợp của các tế bào PC12 được cấy lên các đĩa nuôi cấy mô có diện tích 60mm^2 chứa 3mL môi trường huyết thanh thích hợp, được cho phát triển trong tủ ủ 37°C có cacbon dioxit 5% cho đến khi đạt đến mật độ tế bào thích hợp và được chuyển nhiễm bằng dung dịch chuyển nhiễm không có cấu trúc biểu hiện pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (tế bào không được chuyển nhiễm) hoặc bằng dung dịch chuyển nhiễm chứa cấu trúc biểu hiện pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (tế bào được chuyển nhiễm) như được mô tả ở trên. Rửa và thu tế bào này được chi tiết hóa trong Ví dụ 1. Để phát hiện sự có mặt của cả cơ chất SNAP-25$_{206}$ không được phân cắt và sản phẩm SNAP-25$_{197}$ phân cắt, phần chia đều từ mỗi mẫu thu được này được phân tích bằng phân tích thẩm tách Western như được mô

tả trong Ví dụ 1, ngoại trừ kháng thể sơ cấp được sử dụng là dịch cổ trướng chứa kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng ở mức pha loãng 1:100 và kháng thể thứ cấp được sử dụng là kháng thể α-IgG của chuột được tiếp hợp với peroxidaza cải ngựa pha loãng 1:20.000 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Ngoài ra, ba loại kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng của chuột có bán trên thị trường được thử nghiệm. SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), một kháng thể α-SNAP-25 được nhà sản xuất chỉ định để phát hiện cả cơ chất $SNAP\text{-}25_{206}$ không được phân cắt và sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt, được sử dụng ở mức pha loãng 15.000 theo khuyến cáo của nhà sản xuất. MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), kháng thể α-SNAP-25 được nhà sản xuất chỉ định để phát hiện cả cơ chất $SNAP\text{-}25_{206}$ không được phân cắt và sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt, được sử dụng ở mức pha loãng 1:100 theo khuyến cáo của nhà sản xuất. MC-6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), kháng thể α-SNAP-25 được nhà sản xuất chỉ định chỉ để phát hiện sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt, được sử dụng ở mức pha loãng 1:100 theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Bảng 21 cho thấy dịch cổ trướng chứa kháng thể α-SNAP-25 chỉ phát hiện được sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt. Thử nghiệm phân cắt dựa trên cơ sở tế bào chỉ ra rằng dịch cổ trướng được tạo ra từ các dòng 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 và 3C3E2 sinh tổng hợp kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng có tính đặc hiệu liên kết cao đối với sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt, điều này cho phép nhận diện chọn lọc sản phẩm phân cắt này so với cơ chất $SNAP\text{-}25_{206}$ không được phân cắt. Kháng thể thương mại SMI-81 phát hiện cơ chất $SNAP\text{-}25_{206}$ không được phân cắt nhưng chỉ nhận diện yếu sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt (Bảng 21). Bất ngờ là, kháng thể thương mại MC-6050 chỉ phát hiện được cơ chất $SNAP\text{-}25_{206}$ không được phân cắt mà không nhận biết được sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt (Bảng 21). Bất ngờ hơn nữa, kháng thể thương mại MC-6050 chỉ phát hiện được cơ chất $SNAP\text{-}25_{206}$ không được phân cắt mà không nhận diện được sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt ngay cả khi nhà sản xuất quảng cáo là kháng thể này phát hiện chọn lọc sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt (Bảng 21). Vì vậy, phân tích này chỉ ra rằng trong khi 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 và 3C3E2 biểu hiện tính chọn lọc phù hợp với sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt, nhưng 1G10A12 và 2F11B6 không biểu hiện tính chất này. Ngoài ra, các kháng thể thương mại SMI-81, MC-6050 và MC-6053 đều không thích hợp cho phương pháp dựa trên cơ sở miễn

dịch được bộc lộ theo sáng chế do tất cả các kháng thể không phát hiện chọn lọc sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt.

Đối với phân tích hóa miễn dịch, tính đặc hiệu liên kết được xác định bằng cách phân tích khả năng của dịch cổ trướng chứa kháng thể α-SNAP-25 để phát hiện cơ chất SNAP-25_{206} không được phân cắt và sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt bằng cách nhuộm miễn dịch. Ví dụ, xem: 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). Mật độ thích hợp của các tế bào PC12 được cấy, được để cho phát triển và được chuyển nhiễm bằng dung dịch chuyển nhiễm thiếu cấu trúc biểu hiện pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (tế bào không được chuyển nhiễm) hoặc bằng dung dịch chuyển nhiễm chứa cấu trúc biểu hiện pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (tế bào được chuyển nhiễm) như được mô tả ở trên. Các tế bào được rửa trong 1 x PBS và được cố định trong 5mL PAF ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Các tế bào đã được cố định được rửa bằng dung dịch đệm muối phosphat, ủ với 5mL Triton® X-100 0,5% (polyetylen glycol octylphenol ete) trong 1 x PBS, được rửa bằng 1 x PBS và được thấm trong 5mL methanol ở nhiệt độ -20°C trong thời gian sáu phút. Các tế bào đã thấm được phong bế bằng 5mL glyxin 100mM ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút, được rửa trong 1 x PBS và được phong bế bằng 5mL BSA 0,5% trong 1 x PBS ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Các tế bào đã được phong bế được rửa bằng 1 x PBS và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian hai giờ với BSA 0,5% trong 1 x PBS chứa dịch cổ trướng pha loãng 1:10 từ dòng tế bào lai được thử nghiệm. Các tế bào được dò kháng thể sơ cấp được rửa ba lần, mỗi lần năm phút trong 1 x PBS. Các tế bào đã rửa này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ với 1 x PBS chứa globulin miễn dịch G đa dòng của dê kháng chuột, kháng thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (IgG, H+L) được tiếp hợp với ALEXA® FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) đóng vai trò làm kháng thể thứ cấp. Các tế bào được dò kháng thể thứ cấp này được rửa ba lần, mỗi lần trong năm phút với 1 x PBS. Các tế bào đã rửa được chuẩn bị để kiểm tra trên kính hiển vi bằng cách gắn lên môi trường gắn VECTASHIELD® Mounting Media (Vector Laboratories, Burlingame, CA) và được đậy lá kính. Hình ảnh của sự phát hiện tín hiệu thu được bằng kính hiển vi cùng tiêu điểm Leica bằng cách sử dụng các chế độ cài đặt laze thích hợp. Bảng 21 cho thấy rằng dịch cổ trướng chứa kháng thể α-SNAP-25 phát hiện một cách đặc hiệu

sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt. Phân tích hóa mô miễn dịch cho thấy rằng dịch cổ trướng được tạo ra từ dòng 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 và 3C3E2 tổng hợp kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng có tính đặc hiệu liên kết cao đối với sản phẩm phân cắt SNAP-25_{197}, điều này cho phép nhận diện ưu tiên sản phẩm phân cắt này so với cơ chất SNAP-25_{206} không được phân cắt.

Đối với phân tích kết tủa miễn dịch, tính đặc hiệu liên kết được xác định bằng cách phân tích khả năng của protein A (HiTrap™ Protein A HP Columns, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ), kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng được tinh sạch để kết tủa cơ chất SNAP-25_{206} không được phân cắt và sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt. Ví dụ, xem: Chapter 8 Storing and Purifying Antibodies, pp. 309-311, Harlow & Lane, nêu trên, 1998a. Mật độ thích hợp của các tế bào PC12 thích hợp được cấy, được để cho phát triển và chuyển nhiễm với dung dịch chuyển nhiễm chứa cấu trúc biểu hiện pQBI-25/GFP (các tế bào đối chứng; SEQ ID NO: 53) hoặc dung dịch chuyển nhiễm chứa cấu trúc biểu hiện pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (các tế bào thử nghiệm) như được mô tả ở trên. Cấu trúc biểu hiện pQBI-25/GFP bao gồm một vectơ biểu hiện mà đoạn khởi đầu phiên mã của nó được liên kết về mặt chức năng với polynucleotit mã hóa GFP có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 54. Sau khi ủ qua đêm, các tế bào này được rửa bằng cách hút môi trường sinh trưởng và lắc rửa từng lỗ bằng 200µL 1 x PBS. Để thu tế bào, PBS được hút và dung giải các tế bào này bằng cách bổ sung đệm dung giải kết tủa miễn dịch chứa HEPES 50mM, NaCl 150mM, $MgCl_2$ 1,5mM, EGDT 1mM, glycerol 10%, Triton® X-100 1% (polyetylen glycol octylphenol ete) và dung dịch hỗn hợp chất ức chế proteaza 1 x COMPLETE™ (Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN) và ủ ở nhiệt độ 4°C trong thời gian một giờ. Các tế bào đã dung giải này được ly tâm tại 3.000 x *g* ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 10 phút để loại bỏ mảnh vỡ tế bào và phần dịch nổi này được chuyển vào ống sạch và pha loãng protein đến nồng độ khoảng 1mg/mL. Bổ sung khoảng 5µg kháng thể đơn dòng được tinh sạch vào 0,5mL dịch nổi pha loãng này và được ủ ở nhiệt độ 4°C trong thời gian hai giờ. Sau khi ủ kháng thể sơ cấp, bổ sung khoảng 50µL protein G đã được cố định (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) vào dịch nổi pha loãng này và được ủ ở nhiệt độ 4°C trong thời gian một giờ. Dịch nổi đã được ủ được rửa ba lần, mỗi lần trong 30 phút bằng cách bổ sung 0,5mL đệm dung giải kết tủa miễn dịch, ly tâm ở 300 x *g* ở nhiệt độ 4°C trong thời gian một phút để tạo viên kết protein G đã được cố định và gạn

bỏ phần dịch nổi. Sau khi rửa, viên kết này được tạo huyền phù lại trong 30µl đệm nạp mẫu 1 x SDS và mẫu này được gia nhiệt đến nhiệt độ 95°C trong thời gian năm phút. Để phát hiện sự có mặt của cả cơ chất SNAP-25_{206} không được phân cắt và sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt, phần chia đều từ mỗi mẫu đã thu được phân tích thẩm tách Western như được mô tả trong Ví dụ 1, ngoại trừ kháng thể sơ cấp được sử dụng là huyết thanh chứa kháng thể α-SNAP-25 đa dòng đa dòng ở mức pha loãng 1:1.000 (xem Ví dụ 5) và kháng thể thứ cấp được sử dụng là α-IgG của thỏ được tiếp hợp với peroxidaza cây cải ngựa ở mức pha loãng 1:20.000 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Bảng 21 chỉ ra dịch cổ trướng chứa kháng thể α-SNAP-25 mà kéo xuống một cách đặc biệt sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt bằng phân tích kết tủa miễn dịch. Phân tích kết tủa miễn dịch này đã chỉ ra rằng, dịch cổ trướng được sản sinh từ dòng 2E2A6 và 3C1A5 tổng hợp kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng có tính đặc hiệu liên kết với sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt, điều này cho phép nhận diện ưu tiên sản phẩm phân cắt so với cơ chất SNAP-25_{206} không được phân cắt.

Bảng 21. Phân tích dòng dịch cổ trướng chứa kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng

Dòng	**Thử nghiệm trên cơ sở tế bào**		**Hóa mô miễn dịch**		**Kết tủa miễn dịch**	
	SNAP-25_{197}	**SNAP-25_{206}**	**SNAP-25_{197}**	**SNAP-25_{206}**	**SNAP-25_{197}**	**SNAP-25_{206}**
1D3B8	++	–	++	-	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm
1G10A12	++	++	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm
2C9B10	++	–	++	-	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm
2E2A6	++	–	++	-	++	–
2F11B6	+	+	+	+	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm
3C1A5	++	–	++	–	++	–
3C3E2	+	–	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm

MC-6050	–	+	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm	Không kiểm tra
MC-6053	–	+	Không được thử nghiệm	Không kiểm tra	Không kiểm tra	Không kiểm tra
SMI-81	-/+	++	Không được thử nghiệm	Không kiểm tra	Không kiểm tra	Không kiểm tra

5. Đánh giá ái lực liên kết của các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng

Để xác định ái lực liên kết của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng thể hiện tính đặc hiệu liên kết cao đối với sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt hoặc cơ chất SNAP-25_{206} không được phân cắt, thử nghiệm ái lực liên kết được thực hiện trên thiết bị BIAcore 3000 bằng cách sử dụng chip cảm biến carboxymetyl dextran (CM5) (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Phân tích được tiến hành ở nhiệt độ 25°C trong đệm HBS-EP chứa HEPES 10mM (độ pH=7,4), natri clorua 150mM, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005% (thể tích/thể tích) với tốc độ dòng chảy 10 µL/phút. Các peptit SNAP-25 chứa axit amin 134-197 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 (SNAP-$25_{134-197}$) hoặc axit amin 134-206 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 (SNAP-$25_{134-206}$) được gắn kết cộng hóa trị với bề mặt của chip cảm biến CM5 bằng cách gắn kết amin chuẩn. Tóm lại, các chip CM5 này được hoạt hóa bằng cách tiêm hỗn hợp 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) carbodiimit 0,2M và N-hydroxysucximit 0,05M trong thời gian 7 phút; tiếp đó, peptit SNAP-25 này được tiêm trong natri axetat 10mM (độ pH=4,0) trong thời gian 20 phút với tốc độ dòng chảy 10 µL/phút; và các este sucximit không được phản ứng được phong bế bằng cách tiêm etanolamin hydroclorua 1M trong thời gian 7 phút, độ pH=8,5. Lượng SNAP-$25_{134-197}$ hoặc SNAP-$25_{134-206}$ được cố định trên chip được phản ánh bởi lượng tăng gấp từ 100 đến 150 lần các đơn vị đáp ứng (khoảng từ 0,10 đến 0,15ng/mm^2). Các mẫu kháng thể chứa kháng thể đơn dòng của dịch cổ trướng hoặc kháng thể đơn dòng được tinh sạch được tạo ra từ các dòng 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 và 3C3E2, cũng như các kháng thể α-SNAP-25 có sẵn trên thị trường được cho qua bề mặt của các chip CM5 cho phép thời gian kết hợp 10 phút và thời gian phân ly 20 phút. Bề mặt này được tái tạo giữa các lần chạy bằng cách tiêm glyxin-HCl 10mM (độ pH=2,5) trong thời gian 1 phút với tốc độ chảy 15µL/phút. Các

đường cong tương tác sinh học đáp ứng theo thời gian được điều chỉnh theo mô hình liên kết động lực học đến 1:1 bằng phần mềm đánh giá BIA 3.0.

Kết quả thu được đã chỉ ra rằng cả 2E2A6 và 3C1A5 có tính đặc hiệu cao đối với sản phẩm $SNAP\text{-}25_{197}$ phân cắt trên cơ chất SNAP-25 không được phân cắt (Bảng 22). Khi so sánh các ái lực liên kết của MC-6050 và MC-6053, 1D3B6 có hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng của sản phẩm SNAP-25 phân cắt cao gấp khoảng 10 lần so với các hằng số này của kháng thể thương mại (Bảng 22). Thú vị là, 2E2A6 chỉ có hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng đối với sản phẩm SNAP-25 phân cắt thấp hơn không đáng kể so với các kháng thể thương mại (0,405nM so với 0,497 và 0,508) (Bảng 22). Do không có kháng thể nào trong số các kháng thể α-SNAP-25 thương mại nhận biết một cách chọn lọc sản phẩm SNAP-25 phân cắt (Bảng 21), hằng số phân ly tại trạng thái cân bằng thấp hơn khoảng 0,5 nM dường như, một phần, là giới hạn để thu được tính chọn lọc như vậy. Tương tự, khi so sánh các ái lực liên kết của MC-6050 và MC-6053, 2E2A6 có tốc độ phân ly/hằng số phân ly thấp hơn khoảng ít nhất một lần ($6,74 \times 10^{-5}$ so với $8,82 \times 10^{-4}$ s^{-1} và $1,18 \times 10^{-3}$ s^{-1}) (Bảng 22). Điều này cho thấy rằng tốc độ phân ly/hằng số phân ly thấp hơn khoảng $8,82 \times 10^{-4}$ dường như, một phần, là tới hạn để thu được liên kết chọn lọc đối với sản phẩm SNAP-25 phân cắt này. Kết quả này là phù hợp với 1D3B8, mà có tốc độ phân ly/hằng số phân ly là $5,78 \times 10^{-5}$ s^{-1} (Bảng 22).

Bảng 22. Phân tích ái lực liên kết các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng

Thông số SPR	**1D3B8**		**2E2A6**	
	$SNAP\text{-}25_{197}$	**$SNAP\text{-}25_{206}$[a]**	**$SNAP\text{-}25_{197}$**	**$SNAP\text{-}25_{206}$[b]**
Ka (M^{-1} s^{-1})	$1,06 \times 10^{6}$	—	$1,70 \times 10^{6}$ ($1,66 \times 10^{5}$)	— (—)
Kd (s^{-1})	$5,78 \times 10^{-5}$	—	$1,53 \times 10^{-4}$ ($6,74 \times 10^{-5}$)	— (—)
KD (nM)	0,050	—	0,090 (0,405)	— (—)
Thông số SPR	**3C1A5**		**2C9B10**	
	$SNAP\text{-}25_{197}$	**$SNAP\text{-}25_{206}$[c]**	**$SNAP\text{-}25_{197}$**	**$SNAP\text{-}25_{206}$[d]**
Ka (M^{-1} s^{-1})	$2,17 \times 10^{5}$	—	$1,15 \times 10^{4}$	—
Kd (s^{-1})	$2,88 \times 10^{-4}$	—	$3,11 \times 10^{-4}$	—
KD (nM)	1,33	—	27,1	—

Thông số SPR	MC-6050		MC-6053	
	$SNAP\text{-}25_{197}$	**$SNAP\text{-}25_{206}$**	**$SNAP\text{-}25_{197}$**	**$SNAP\text{-}25_{206}$**
Ka (M^{-1} s^{-1})	$1{,}78 \times 10^{6}$	$3{,}06 \times 10^{2}$	$2{,}32 \times 10^{6}$	$1{,}06 \times 10^{2}$
Kd (s^{-1})	$8{,}82 \times 10^{-4}$	$6{,}07 \times 10^{-3}$	$1{,}18 \times 10^{-3}$	$2{,}56 \times 10^{-5}$
KD (nM)	0,497	19,800	0,508	240

[a] Không quan sát thấy liên kết khi nồng độ kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng 1D3B8 qua bề mặt chip cảm biến CM5 lên đến 125nM sau thời gian kết hợp 10 phút.

[b] Không quan sát thấy liên kết khi nồng độ kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng 2E2A6 qua bề mặt chip cảm biến CM5 lên đến 10μM sau thời gian kết hợp 10 phút.

[c] Không quan sát thấy liên kết khi nồng độ kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng 3C1A5 qua bề mặt chip cảm biến CM5 lên đến 100nM sau thời gian kết hợp 10 phút.

[d] Không quan sát thấy liên kết khi nồng độ kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng 2C9B10 qua bề mặt chip cảm biến CM5 lên đến 100nM sau thời gian kết hợp 10 phút.

Để so sánh sáu kháng thể khác nhau, tốc độ kết hợp (ka) và tốc độ phân ly (kd) cho mỗi kháng thể được chuẩn hóa bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá BIA 4.1. Để so sánh các tốc độ kết hợp, trước hết, từng dữ liệu được lọc bằng cách loại bỏ phần tái tạo lại và nhánh tiêm và tiếp đó chuẩn hóa theo tỷ lệ từ 0 đến 100. Để so sánh tốc độ phân ly, giá trị này được chuẩn hóa điểm dừng tiêm/điểm đỉnh. Phân tích này cho thấy rằng, 2C9B10 có tốc độ kết hợp thấp hơn nhiều so với các kháng thể khác (FIG. 7A) và MC-6053 có tốc độ phân ly (phân ly) nhanh hơn nhiều so với các kháng thể khác (FIG. 7B). Tốc độ phân ly nhanh của MC-6053 cho thấy rằng kháng thể đó không hoạt động tốt trong các phương pháp theo sáng chế do kháng thể này khó duy trì liên kết với cơ chất kháng nguyên trong các bước rửa.

6. Giải trình tự epitop từ các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng được phân lập

Để xác định epitop của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng được phân lập có thể liên kết một cách chọn lọc với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, phân tử polynucleotit mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 và 3C3E2 được giải trình tự. mARN được tách chiết và tinh sạch từ mỗi thể lai đó bằng

cách sử dụng các quy trình chuẩn và được phiên mã ngược thành cADN bằng cách sử dụng đoạn mồi oligo dT đối nghĩa hoặc đoạn mồi đối nghĩa đặc hiệu gen (CH của IgG1 và CL kapa của chuột). Các đoạn mồi vùng ổn định cụ thể của chuột và người đặc hiệu được sử dụng để khuyếch đại cADN bằng PCR sau khi tạo ra cADN để xác định isotyp kháng thể đó. Các đoạn mồi thoái hóa V_H và V_L được sử dụng để khuyếch đại các vùng biến đổi từ cADN. Đối với 5'RACE, đuôi polyme đồng nhất dCTP của người được bổ sung vào đầu 3' của cADN đó. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này được khuyếch đại bằng đoạn mồi oligo dG có nghĩa và một đoạn mồi đối nghĩa của gen đặc hiệu (CH/KC). Các sản phẩm PCR chứa trình tự peptit tín hiệu, các vùng biến đổi và các vùng ổn định và đến đoạn mồi đối nghĩa. Các sản phẩm PCR này được tinh sạch trên gel để loại bỏ những đoạn ngắn và được tách dòng thành vectơ TA hoặc vectơ đầu bằng để giải trình tự. Năm dòng độc lập cho từng chuỗi này được giải trình tự và sắp hàng các chuỗi V_H và VL và xác định các trình tự liên ứng. Các phương pháp được sử dụng để xác định trình tự axit amin V_H và V_L đã được mô tả trong, ví dụ, Roger A. Sabbadini, et al., Novel Bioactive Lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2007/0281320; và Peter Amersdorfer, et al., Molecular Characterization of Murine Humoral Immune Response to Botulinum Neurotoxin Type A Binding Domain as Assessed by Using Phage Antibody Libraries, 65(9) Infect. Immun. 3743-3752, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. Ngoài ra, các dịch vụ thương mại sẵn có để giải trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể và nhận dạng các vùng CDR này, ví dụ, xem, Fusion Antibodies Ltd., Northern Ireland. Trong một trường hợp, đối với vùng V_L 3C1A5, trình tự axit amin cũng được xác định bằng cách phân tách kháng thể được tinh sạch ái lực bằng kỹ thuật điện di 2DE phân giải cao và tiếp đó phân tích nhận dạng đặc điểm các phân mảnh peptit đối với protein này bằng cách sử dụng vi sắc ký khí kèm khối phổ (nanoLC-MSMS) có độ phân giải cao sau khi phân cắt bằng phân giải protein.

Trình tự polynucleotit này chứa các chuỗi V_H và V_L của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai được bộc lộ theo sáng chế như sau: 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 biến thể 1 (SEQ ID NO: 79), 3C3E2 V_H biến thể 2 (SEQ ID NO: 81), 3C3E2 V_H biến thể 3 (SEQ ID NO: 132), 1D3B8 V_L (SEQ ID

NO: 83), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 85), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 87), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 89) và 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 91). Trình tự axit amin này chứa chuỗi V_H và V_L của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai được bộc lộ theo sáng chế như sau: 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 biến thể 1 (SEQ ID NO: 80), 3C3E2 V_H biến thể 2 (SEQ ID NO: 82); 3C3E2 V_H biến thể 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) và 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 92). Các trình tự axit amin này chứa vùng CDR của V_H và V_L của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 và 3C3E2 được nêu trong Bảng 23.

Bảng 23. Trình tự CDR của vùng V_H và V_L của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng

CDR	**Trình tự**	**Được xác định trong**	**SEQ ID NO:**
V_H CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5	93
V_H CDR 1	TFTNYVIH	3C3E2	94
V_H CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V_H CDR 2	YLFPGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5	97
V_H CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C3E2	98
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V_H CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5	100
V_H CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
V_H CDR 3	ARMDY	3C3E2var1	102
V_H CDR 3	ARMGY	3C3E2var2	134
V_H CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C3E2var3	135
V_L CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103

CDR	Trình tự	Được xác định trong	SEQ ID NO:
V_L CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
V_L CDR 1	KSSQSLLYTNGKTYLT	2E2A6	105
V_L CDR 1	KSSQSLLNTNGKTYLT	3C1A5	106
V_L CDR 1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
V_L CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
V_L CDR 2	NAKSLAE	2C9B10	109
V_L CDR 2	LVSELDS	2E2A6	110
V_L CDR 2	LVSKLDS	3C1A5	111
V_L CDR 2	YASQSIS	3C3E2	112
V_L CDR 3	FQGSHVPPT	1D3B8	113
V_L CDR 3	QHHYGTPYT	2C9B10	114
V_L CDR 3	LQSAHFPFT	2E2A6	115
V_L CDR 3	LQSSHFPFT	3C1A5	116
V_L CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

Các ví dụ không giới hạn về các trình tự axit amin chứa các biến thể vùng CDR của V_H của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng này được tạo ra bởi các tế bào lai được bộc lộ theo sáng chế bao gồm biến thể V_H CDR1có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 118 của 1D3B8; biến thể V_H CDR1có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 119 của 2C9B10, 2E2A6 và 3C1A5 V_H; biến thể V_H CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 120 của 3C1A5 V_H và 3C3E2 biến thể 3; biến thể V_H CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 121 của 1D3B8 và 2E2A6; biến thể V_H CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 122 của 2C9B10 và 3C1A5 V_H; biến thể V_H CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 123 của 3C1A5 V_H và 3C3E2 biến thể 3; biến thể MDY của V_H CDR3 của 1D3B8 và 2C9B10; biến thể MGY của V_H CDR3 của 2E2A6 và VH 3C1A5; và biến thể V_H CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 124 của 3C1A5 V_H và 3C3E2 biến thể 3. Các ví dụ không giới hạn về các trình tự axit amin bao gồm các biến thể vùng CDR của V_L của kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai được bộc lộ theo sáng chế bao gồm biến thể V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 125

của 1D3B8; biến thể V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 126 của 2C9B10; biến thể V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 127 của 2E2A6; biến thể V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 128 của 3C1A5; biến thể V_L CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 129 của 3C3E2; biến thể KVS của V_L CDR2 của 1D3B8; biến thể NAK của V_L CDR2 của 2C9B10; biến thể LVS của V_L CDR2 của 2E2A6; biến thể YAT của V_L CDR2 của 3C1A5; và biến thể YAS của V_L CDR2 của 3C3E2.

Ví dụ 8. Phát triển kháng thể α-SNAP-25 đa dòng liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A

Ví dụ sau đây nhằm minh họa cách tạo ra các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng có thể liên kết một cách có chọn lọc với epitop SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A.

1. Phát triển các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng

Để phát triển các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, đoạn peptit có 10 gốc CGGGRIDEANQ (SEQ ID NO: 46) đã được thiết kế làm một sản phẩm kháng nguyên SNAP-25 phân cắt. Peptit này chứa gốc xystein ở đầu N để tiếp hợp với KLH, vùng đệm linh động đệm-G (GGG) được liên kết với các axit amin 191-197 trong SNAP-25 của người (SEQ ID NO: 5) và có glutamin ở đầu C được carboxyl hóa. Tra cứu Blast đã nhận ra rằng đoạn peptit này chỉ có độ tương đồng cao với SNAP-25 và hầu hết không có khả năng phản ứng chéo với các protein khác trong tế bào thần kinh. Trình tự này được xem xét một cách cẩn thận bằng cách sử dụng các thuật toán trên máy tính để xác định chỉ số thủy liệu pháp, xác suất bề mặt protein, vùng linh động và cấu trúc bậc hai có lợi, sau đó đính hướng và thể hiện thích hợp trình tự peptit được chọn. Đoạn peptit được tổng hợp và tiếp hợp với Hemoxyamin lấy từ con hà (KLH) để làm tăng tính gây miễn dịch. Đối với động vật được gây miễn dịch, trước tiên, những con thỏ chưa qua thử nghiệm được sàng lọc dựa trên dịch dung giải tế bào từ các dòng tế bào ứng viên trong thẩm tách Western để xác định các con vật không có phản ứng miễn dịch với protein có mặt trong dịch dung giải tế bào. Hai con thỏ đã được sàng lọc trước được gây miễn dịch bằng peptit này và sau ba lần gây miễn dịch trong khoảng tám tuần, lấy mẫu máu của những con thỏ này để thử nghiệm. Mẫu máu này được cho đông lại bằng cách ủ ở nhiệt độ 4°C trong thời

gian 60 phút. Mẫu máu đã đông này được ly tâm tại 10.000x g ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 10 phút để loại bỏ mảnh cặn tế bào. Mẫu huyết thanh thu được này được chia thành các phần chia đều 50µL và bảo quản ở nhiệt độ -20°C đến khi cần sử dụng.

Một chiến lược tương tự dựa trên các kháng nguyên SNAP-25 khác được bộc lộ theo sáng chế được sử dụng để phát triển các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Ví dụ, kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47 có thể được tiếp hợp với KLH thay cho kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46. Theo một ví dụ khác, axit amin 191-197 trong SNAP-25 của người từ kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 38 có thể được thay thế bằng trình tự nêu trong 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 hoặc SEQ ID NO: 44.

2. Sàng lọc sự có mặt của các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng

Để phát hiện sự có mặt của các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, thử nghiệm phân cắt trên cơ sở tế bào và ELISA so sánh được thực hiện bằng cách sử dụng huyết thanh lấy từ thỏ như được mô tả trong Ví dụ 3. Huyết thanh từ hai con thỏ đều chứa các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A. Các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng của thỏ đã được chỉ rõ là NTP 22 và NTP 23.

3. Tinh sạch các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng

Để tinh sạch các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, các kháng thể NTP 22 và NTP 23 từ huyết thanh của thỏ được tinh sạch bằng cách sử dụng các cột ái lực chứa kháng nguyên SNAP-25 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46.

4. Đánh giá tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng

Để đánh giá tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng có thể liên kết một cách chọn lọc với kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A, các kháng thể α-SNAP-25

đa dòng NTP 22 và NTP 23 đã tinh sạch được sử dụng để phát hiện sản phẩm phân cắt bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính trên cơ sở tế bào, hóa mô miễn dịch và kết tủa miễn dịch như được mô tả trong Ví dụ 3. Thử nghiệm phân cắt trên cơ sở tế bào, phân tích hóa mô miễn dịch và phân tích kết tủa miễn dịch cho thấy rằng các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng NTP 22 và NTP 23 không phản ứng chéo với SNAP-25 không được phân cắt. Vì vậy, cả NTP 22 và NTP 23 đều có tính đặc hiệu liên kết cao đối với sản phẩm SNAP-25_{197} phân cắt, điều này cho phép nhận biết ưu tiên sản phẩm phân cắt này so với cơ chất SNAP-25_{206} không được phân cắt. Ái lực đối với các kháng nguyên này có thể phát hiện được bằng cách sử dụng SPR trong BiAcore như được mô tả trong Ví dụ 3.

Ví dụ 9. Thành phần và điều kiện để phân tích ELISA kiểu bánh kẹp

Ví dụ sau đây nhằm minh họa cách nhận biết và chuẩn bị các thành phần cũng như các điều kiện cần thiết để tiến hành phân tích ELISA kiểu bánh kẹp hữu ích để thực hiện các phương pháp trên cơ sở miễn dịch nhằm phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bằng cách phát hiện sản phẩm SNAP-25 phân cắt có sử dụng kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng đặc hiệu đối với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A.

1. Chuẩn bị dịch dung giải tế bào từ các tế bào đã được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích

Để thu được dịch dung giải tế bào được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích, mật độ thích hợp của các tế bào từ giống gốc Neuro-2a được cấy vào bình T175 chứa 50mL môi trường không có huyết thanh chứa môi trường cần thiết tối thiểu, GlutaMAX™ I 2mM với muối Earle, chất bổ sung 1 x B27, chất bổ sung 1 x N2, axit amin không thiết yếu 0,1mM, HEPES 10mM. Các tế bào này được ủ trong tủ ủ 37°C có cacbon dioxit 5% cho đến khi các tế bào này được biệt hóa như được đánh giá bằng tiêu chuẩn hình thái học thông thường và tiêu chuẩn, như kìm hãm sự sinh trưởng và kéo dài nơron (khoảng từ 2 đến 3 ngày). Giống như đối chứng, mật độ thích hợp của các tế bào từ giống gốc Neuro-2a được cấy vào bình T175 chứa 50mL môi trường sinh trưởng phát triển thích hợp (Bảng 1). Các tế bào đối chứng không được biệt hóa này được cho phát triển trong tủ ủ 37°C có cacbon dioxit 5% cho đến khi độ che phủ bề mặt đạt 50% (khoảng 18 giờ). Môi trường từ cả môi trường nuôi cấy đối chứng được biệt hóa và không được biệt hóa đều được hút ra khỏi mỗi lỗ và thay thế bằng môi

trường mới chứa 0 (mẫu không được xử lý) hoặc 10nM endopeptidaza tái hướng đích. Sau khi ủ qua đêm, rửa và thu các tế bào bằng cách dung giải trong đệm dung giải Triton X-100 đã được tạo ra từ trước (HEPES 50mM, NaCl 150mM, $MgCl_2$ 1,5mM, EGTA 1mM, Triton X-100 1%) ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 30 phút trong điều kiện có lắc. Các tế bào dung giải được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C để loại bỏ mảnh tế bào bằng cách sử dụng máy ly tâm trên bàn. Các nồng độ protein trong các dịch dung giải tế bào được xác định bằng thử nghiệm Bradford.

2. Chuẩn bị và xác định thành phần dùng trong phân tích ELISA kiểu bánh kẹp

Để xác định việc bắt cặp kháng thể thu giữ - kháng thể phát hiện thích hợp, tiến hành phân tích ELISA kiểu bánh kẹp ECL với hai mươi sáu dạng kết hợp khác nhau giữa các cặp kháng thể thu giữ và phát hiện, có mười một kháng thể thu giữ α-SNAP-25 khác nhau và bảy loại kháng thể phát hiện α-SNAP-25 khác nhau (Bảng 12). Các kháng thể α-SNAP-25 được sử dụng là 2E2A6 và các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng 3C1A5 của chuột được bộc lộ theo sáng chế, SMI-81, MC-6050 và kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng MC-6053 của chuột được bộc lộ theo sáng chế, kháng thể α-SNAP-25 đa dòng NTP 23 của thỏ được bộc lộ theo sáng chế, kháng thể α-SNAP-25 đa dòng S9684 của thỏ (Sigma, St. Louis, MO), kháng thể α-SNAP-25 đa dòng H-50 của thỏ (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), kháng thể α-SNAP-25 đa dòng C-18 của dê (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), kháng thể α-SNAP-25 đa dòng N-19 của dê (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) và kháng thể α-SNAP-25 đa dòng SP12 của chuột nhắt (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

Để chuẩn bị dung dịch kháng thể thu giữ, các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng trong dịch cổ trướng từ các dòng tế bào lai 2E2A6 và 3C1A5 cũng như các kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng MC-6050 và MC-6053 được tinh sạch bằng cách sử dụng quy trình tinh sạch protein A chuẩn. Tất cả các kháng thể α-SNAP-25 khác được mua ở dạng kháng thể đã được tinh sạch.

Để chuẩn bị dung dịch kháng thể phát hiện, kháng thể α-SNAP-25 thích hợp được tiếp hợp với chất phản ứng đánh dấu este Ruteni(II)-tris-bipyridin-(4-metysulfonat) NHS (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Phản ứng tiếp hợp này được

thực hiện bằng cách bổ sung 30µL dung dịch gốc MSD SULFO-TAG™ được hoàn nguyên bằng nước cất vào 200µL các kháng thể α-SNAP-25 đa dòng 2mg/mL và ủ hỗn hợp phản ứng này trong bóng tối ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Các kháng thể đã đánh dấu này được tinh sạch bằng cách sử dụng quy trình cột ly tâm chuẩn và nồng độ protein này được xác định bằng cách sử dụng phân tích đo màu protein chuẩn. Việc hấp thụ thể tiếp hợp kháng thể α-SNAP-25/MSD SULFO-TAG™ được đo tại 455 nm bằng cách sử dụng quang phổ kế để xác định nồng độ ở dạng mol/L. Dung dịch kháng thể phát hiện này được bảo quản ở nhiệt độ 4°C đến khi cần sử dụng.

Để tạo ra giá thể pha rắn chứa kháng thể thu giữ đặc hiệu đối với sản phẩm SNAP-25 phân cắt, bổ sung khoảng 5µL dung dịch kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng thích hợp (20µg/mL trong 1 x PBS) vào từng lỗ trên đĩa MSD liên kết mật độ cao MSD 96 lỗ và dung dịch này được cho phép làm khô trong không khí trong tủ an toàn sinh học trong thời gian từ 2 đến 3 giờ để làm bay hơi dung dịch. Các lỗ được liên kết kháng thể thu giữ được phong bế bằng cách bổ sung 150µL đệm phong bế chứa chất phản ứng phong bế Amersham 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) và huyết thanh dê 10% (VWR, West Chester, PA) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Các đĩa đã phong bế này được bịt kín và bảo quản ở nhiệt độ 4°C đến khi cần sử dụng.

Để phát hiện sự có mặt của sản phẩm SNAP-25 phân cắt được phân cắt bằng phân tích ELISA kiểu bánh kẹp ECL, đệm phong bế từ các đĩa đã được bảo quản này được được hút ra khỏi các lỗ, 25µL dịch dung giải từ các tế bào được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích, như được mô tả ở trên, được bổ sung vào từng lỗ và ủ các đĩa này ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Rửa các lỗ trên đĩa này ba lần bằng cách hút dịch dung giải tế bào và lắc rửa mỗi lỗ ba lần bằng 200µL 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Sau khi rửa, 25µl dung dịch kháng thể phát hiện với nồng độ 5µg/mL chứa chất phản ứng phong bế Amersham 2% trong 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat) được bổ sung vào từng lỗ và các đĩa dán kín được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ có lắc. Sau khi ủ kháng thể phát hiện, rửa các lỗ này ba lần bằng 200 µL 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Sau khi rửa 150µL 1 x đệm đọc (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) được bổ sung vào từng lỗ và các đĩa này được đọc bằng cách sử dụng thiết bị đọc hình ảnh

SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Tính toán tỷ lệ bằng cách chia tín hiệu thu được ở liều lượng 10nM đối với từng cặp kháng thể cho tín hiệu thu được tại liều lượng 0nM đối với mỗi cặp kháng thể (Bảng 24). Các kết quả này cho thấy rằng trong số hai sáu dạng kết hợp khác nhau của các cặp kháng thể được thử nghiệm, chỉ có ba cặp kháng thể có tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu trên 10:1 đối với liều lượng cao nhất được thử nghiệm: Cặp số 1 (mAb 2E2A6 của chuột nhắt và PAb S9684 của thỏ), Cặp số 4 (mAb 3C1A5 của chuột và PAb S9684 của thỏ) và Cặp số 18 (PAb S9684 của thỏ và mAb 2E2A6 của chuột nhắt). Cặp kháng thể 1 được lựa chọn để tiếp tục phân tích.

Bảng 24. Sàng lọc các kết hợp của kháng thể α-SNAP-25

Cặp kháng thể số	**Kháng thể thu giữ**	**Kháng thể phát hiện**	**Phát hiện sản phẩm SNAP-25 phân cắt**	**Phát hiện cơ chất SNAP-25 không được phân cắt**	**Tỷ lệ tín hiệu/tín hiệu nhiễu (10nM/0nM)**
1	mAb 2E2A6 của chuột nhắt	pAb S9684 của thỏ	Có	Không	26,6:1
2	mAb 2E2A6 của chuột nhắt	pAb N-19 của dê	Có	Không	7,3:1
3	mAb 2E2A6 của chuột nhắt	pAb H-50 của thỏ	Có	Không	0,9:1
4	mAb 3C1A5 của chuột nhắt	pAb S9684 của thỏ	Có	Không	12,1:1
5	mAb 3C1A5 của chuột nhắt	pAb N-19 của dê	Có	Không	1,9:1
6	mAb 3C1A5 của chuột nhắt	pAb H-50 của thỏ	Có	Không	0,9:1
7	PAb C-18 của dê	pAb S9684 của thỏ	Không	Không	0,8:1
8	PAb C-18 của dê	pAb N-19 của dê	Không	Không	0,9:1
9	PAb C-18	pAb H-50	Không	Không	0,9:1

	của dê	của thỏ			
10	PAb H-50 của thỏ	mAb 2E2A6 của chuột nhắt	Có	Không	0,9:1
11	PAb H-50 của thỏ	pAb C-18 của dê	Không	Không	1,0:1
12	PAb N-19 của dê	mAb 2E2A6 của chuột nhắt	Có	Không	0,9:1
13	PAb N-19 của dê	pAb C-18 của dê	Không	Không	1,1:1
14	PAb NTP 23 của thỏ	pAb N-19 của dê	Có	Không	1,2:1
15	PAb NTP 23 của thỏ	pAb C-18 của dê	Không	Không	1,1:1
16	PAb NTP 23 của thỏ	pAb SP12 của chuột nhắt	Có	Không	1,3:1
17	PAb NTP 23 của thỏ	pAb H-50 của thỏ	Có	Không	1,1:1
18	PAb S9684 của thỏ	mAb 2E2A6 của chuột nhắt	Có	Không	21,3:1
19	PAb S9684 của thỏ	pAb C-18 của dê	Không	Không	0,7:1
20	PAb S9684 của thỏ	MAb SMI-81 của chuột nhắt	Có	Có	1,2:1
21	MAb SMI-81 của chuột nhắt	pAb S9684 của thỏ	Có	Có	1,1:1
22	MAb SMI-81 của chuột nhắt	pAb N-19 của dê	Có	Có	1,0:1
23	MAb SMI-81 của chuột nhắt	pAb C-18 của dê	Không	Không	0,8:1
24	PAb SP12 của chuột nhắt	pAb C-18 của dê	Không	Không	1,0:1

25	MAb MC-6050 của chuột nhắt	pAb S9684 của thỏ	Có	Có	5,0:1
26	MAb MC-6053 của chuột nhắt	pAb S9684 của thỏ	Có	Có	7,1:1

Ví dụ 10. Phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện endopeptidaza tái hướng đích có hoạt tính enzym chuỗi nhẹ BoNT/A bằng cách sử dụng ELISA kiểu bánh kẹp ELC

Ví dụ sau đây nhằm minh họa cho phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bằng cách phát hiện sản phẩm SNAP-25 phân cắt bằng cách sử dụng kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng đặc hiệu với sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A bằng phân tích ELISA kiểu bánh kẹp ELC.

Để chuẩn bị dịch dung giải từ các tế bào đã được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích có hoạt tính enzym chuỗi nhẹ BoNT/A, cấy một mật độ tế bào thích hợp từ dòng tế bào đã thiết lập vào các lỗ trong đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ chứa 100µL môi trường thích hợp. Ủ tế bào này trong tủ ủ 37°C có cacbon dioxit 5% trong khoảng 24 giờ. Môi trường từ các tế bào này được hút ra khỏi các lỗ này và thay thế bằng môi trường mới chứa 0 (mẫu không được xử lý) hoặc một trong số các liều lượng đã được xác định từ thí nghiệm đáp ứng liều dùng đối với endopeptidaza tái hướng đích đó. Sau 24 giờ ủ, rửa và thu các tế bào này.

Để pha chế dung dịch kháng thể thu giữ α-SNAP-25, kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng trong dịch cổ trướng từ dòng tế bào lai 2E2A6 được tinh sạch bằng cách sử dụng quy trình tinh sạch protein A chuẩn. Để pha chế dung dịch kháng thể phát hiện α-SNAP-25, kháng thể α-SNAP-25 đa dòng S9684 của thỏ (Sigma, St. Louis, MO) được tiếp hợp với chất phản ứng đánh dấu este Ruteni(II)-tris-bipyridin-(4-metysulfonat) NHS (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Phản ứng tiếp hợp, tinh sạch kháng thể α-SNAP-25 được đánh dấu, xác định nồng độ và bảo quản được tiến hành như đã mô tả trong Ví dụ 6.

Để tạo ra giá thể pha rắn chứa kháng thể thu giữ đặc hiệu đối với sản phẩm SNAP-25 phân cắt, khoảng 5µL dung dịch kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng 2E2A6

(20µg/mL trong 1 x PBS) được bổ sung vào từng lỗ trên đĩa liên kết mật độ cao MSD 96 lỗ và dung dịch này được để khô trong không khí trong buồng an toàn sinh học trong khoảng từ 2 đến 3 giờ để làm bay hơi dung dịch. Các lỗ có kháng thể thu giữ liên kết được phong bế và được sử dụng trực tiếp để phát hiện hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích.

Để phát hiện sự có mặt của sản phẩm SNAP-25 phân cắt bằng phân tích ELISA kiểu bánh kẹp ECL, đệm phong bế từ đĩa bảo quản được hút ra khỏi các lỗ và bổ sung 25µL dịch dung giải các tế bào đã được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích vào từng lỗ và các đĩa này được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Các lỗ trong đĩa này được rửa ba lần bằng cách hút dịch dung giải tế bào và lắc rửa mỗi lỗ ba lần bằng 200µL 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Sau khi rửa, 25µL dung dịch kháng thể phát hiện có nồng độ 5µg/mL chứa chất phản ứng phong bế Amersham 2% trong 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat) được bổ sung vào từng lỗ, dán kín đĩa và ủ các đĩa này ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ trong điều kiện có lắc. Sau khi ủ với kháng thể phát hiện, các lỗ này được rửa ba lần bằng 200µL 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Sau khi rửa, 150µL của 1 x đệm đọc (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) được bổ sung vào từng lỗ và đọc các đĩa này bằng các sử dụng thiết bị đọc hình ảnh SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Dữ liệu thu được được phân tích và EC_{50} được tính toán như được mô tả trong Ví dụ 6. Đối với endopeptidaza tái hướng đích opioit, các kết quả này đã chỉ ra rằng khoảng phát hiện trung bình của Noc/A tại EC_{50} là 1,0nM (từ khoảng 0,3nM đến khoảng 2,0nM) với tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận dưới là từ khoảng 15:1 đến khoảng 20:1 và tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận trên là từ khoảng 180:1 đến khoảng 300:1.

Ví dụ 11. Phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bằng cách sử dụng ELISA kiểu bánh kẹp CL

Ví dụ sau đây nhằm minh họa phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bằng cách phát hiện sản phẩm SNAP-25 phân cắt có sử dụng kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng đặc hiệu với SNAP-25 có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A bằng ELISA kiểu bánh kẹp CL.

Dịch dung giải từ các tế bào được xử lý với endopeptidaza tái hướng đích và dung dịch kháng thể thu giữ α-SNAP-25 được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 7.

Để pha chế dung dịch kháng thể phát hiện α-SNAP-25, kháng thể α-SNAP-25 đa dòng S9684 (Sigma, St. Louis, MO) sẽ được tiếp hợp với peroxidaza cây cải ngựa (HRP) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). Phản ứng tiếp hợp này được thực hiện bằng cách bổ sung 500µL kháng thể α-SNAP-25 đa dòng nồng độ 1mg/mL vào lọ chứa peroxidaza khô lạnh được hoạt hóa, trộn các thành phần này, và tiếp đó bổ sung 10µL natri xyanobohydrua. Hỗn hợp phản ứng này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ trong tủ hút. Sau khi dừng phản ứng, các kháng thể đã đánh dấu này sẽ được tinh sạch bằng cách sử dụng quy trình cột ly tâm chuẩn và nồng độ protein sẽ được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm đo màu chuẩn. Việc hấp thụ tiếp hợp kháng thể α-SNAP-25 đa dòng/HRP được đo ở nhiệt độ 4°C tại bước sóng 455 nm bằng cách sử dụng quang phổ kế để xác định nồng độ dưới dạng mol/L. Dung dịch kháng thể phát hiện α-SNAP-25 này được bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi cần sử dụng.

Để tạo ra giá thể pha rắn chứa kháng thể thu giữ α-SNAP-25 đặc hiệu đối với sản phẩm SNAP-25 phân cắt, khoảng 100µL dung dịch kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng 2E2A6 (1mg/mL trong 1 x PBS) được bổ sung vào từng lỗ trên đĩa trắng Greiner 96 lỗ và các đĩa này được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm và tiếp đó lượng dung dịch kháng thể dư sẽ được loại bỏ. Các lỗ có kháng thể thu giữ sẽ được phong bế bằng cách bổ sung 150µL đệm phong bế chứa chất phản ứng phong bế Amersham 2% (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) và huyết thanh dê 10% (VWR, West Chester, PA) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Đệm phong bế này sẽ được loại bỏ và các đĩa này sẽ được thấm khô bằng khăn giấy bằng cách lộn ngược và vỗ nhẹ. Các lỗ có kháng thể thu giữ tiếp đó sẽ được phong bế và được sử dụng trực tiếp để phát hiện hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích.

Để phát hiện sự có mặt của sản phẩm SNAP-25 phân cắt bằng phân tích ELISA kiểu bánh kẹp CL, 50µL dịch dung giải từ các tế bào được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích được bổ sung vào từng lỗ, đĩa này sẽ được dán kín và được ủ trên máy lắc tròn với tốc độ 500 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong thời gian từ 2 đến 4 giờ qua đêm. Rửa các lỗ trong đĩa này ba lần bằng cách hút dịch dung giải tế bào và lắc rửa mỗi lỗ ba lần bằng 200µl 1 x PBS, TWEEN-20® 0,05% (polyoxyetylen (20) sorbitan

monolaureat). Sau khi rửa, 100µL dung dịch kháng thể phát hiện nồng độ 1mg/mL của kháng thể α-SNAP-25 đa dòng/HRP chứa chất phản ứng phong bế Amersham 2% trong 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat) sẽ được bổ sung vào từng lỗ, đĩa này được dán kín và đĩa đã được dán kín này sẽ được ủ trên máy lắc tròn với tốc độ 650 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Sau khi ủ với kháng thể phát hiện, các lỗ được rửa ba lần bằng 200µl 1 x PBS, TWEEN-20® 0,05% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Sau khi rửa, bổ sung 100µl hỗn hợp SuperSignal ELISA Pico tỷ lệ 1:1 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) vào từng lỗ và các đĩa này được đọc bằng cách sử dụng thiết bị đo cường độ quang (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) tại bước sóng 395 nm. Dữ liệu đã thu sẽ được phân tích và EC_{50} sẽ được tính toán như được mô tả trong Ví dụ 6.

Ví dụ 12. Phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bằng cách sử dụng ELISA kiểu bánh kẹp ECL đa thành phần

Ví dụ sau đây nhằm minh họa cho các phương pháp trên cơ sở miễn dịch đa thành phần để phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bằng cách phát hiện sản phẩm SNAP-25 phân cắt có sử dụng kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng đặc hiệu với sản phẩm SNAP-25 phân cắt và kháng thể thứ hai bắt cặp với một protein khác.

Thử nghiệm hiệu lực của endopeptidaza tái hướng đích có thể được tiến hành bằng cách sử dụng ELISA kiểu bánh kẹp ECL đa thành phần. Thử nghiệm như vậy được mô tả trong đơn sáng chế đồng dạng: Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, đơn xin cấp patent Mỹ số 12/403,531, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung và có thể được sử dụng với các dòng tế bào và endopepitaza tái hướng đích và các dòng tế bào tương ứng được bộc lộ theo sáng chế.

Ví dụ 13. Phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bằng cách sử dụng ELISA kiểu bánh kẹp EC đa thành phần

Ví dụ sau đây nhằm minh họa các phương pháp trên cơ sở miễn dịch đa thành phần để phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích bằng cách phát hiện sản phẩm SNAP-25 phân cắt có sử dụng kháng thể α-SNAP-25 đơn dòng đặc hiệu đối với sản phẩm SNAP-25 phân cắt và kháng thể thứ hai bắt cặp với một protein khác.

Thử nghiệm hiệu lực của endopeptidaza tái hướng đích có thể được tiến hành bằng cách sử dụng ELISA kiểu bánh kẹp EC đa thành phần. Thử nghiệm như vậy

được mô tả trong đơn sáng chế đồng dạng: Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays, đơn xin cấp patent Mỹ số 12/403,531, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung và có thể được sử dụng với dòng tế bào và endopepitaza tái hướng đích và các dòng tế bào tương ứng được bộc lộ theo sáng chế.

Ví dụ 14. Phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện các lượng endopeptidaza tái hướng đích ở mức nanomol

Ví dụ sau đây nhằm minh họa cách thực hiện các phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện lượng hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích ở mức nanomol.

1. Phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện endopeptidaza tái hướng đích bằng cách sử dụng ELISA kiểu bánh kẹp ECL

Để tạo ra dịch dung giải từ các tế bào được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích, khoảng từ 50.000 đến 150.000 tế bào từ dòng tế bào đã thiết lập thích hợp để thử nghiệm được cấy lên đĩa nuôi cấy mô poly-D-lysin 96 lỗ chứa 100µL môi trường thích hợp (xem Ví dụ 1 và 2). Tế bào này được ủ trong tủ ủ 37°C có cacbon dioxit 5% trong 24 giờ. Môi trường của các tế bào này được hút ra khỏi từng lỗ và thay thế bằng môi trường mới không chứa endopeptitdaza tái hướng đích (mẫu không được xử lý) hoặc chứa endopeptitdaza tái hướng đích theo sáng chế với liều lượng đáp ứng thích hợp như đã được mô tả. Sau 24 giờ ủ, rửa và thu các tế bào hoặc ủ tiếp 2 ngày, không bổ sung endopeptidaza tái hướng đích trước khi thu. Để thu tế bào, môi trường được hút ra, rửa với 1 x PBS và các tế bào được dung giải bằng cách bổ sung 30µL đệm dung giải chứa HEPES 50mM, NaCl 150mM, $MgCl_2$ 1,5mM, EGTA 1mM, Triton X-100 1% vào từng lỗ và đĩa này được ủ trên máy lắc tròn với tốc độ 500 vòng/phút trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Đĩa này được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C để loại bỏ mảnh tế bào và phần dịch nổi được chuyển vào đĩa 96 lỗ được phủ kháng thể thu giữ để tiến hành bước phát hiện.

Dung dịch kháng thể thu giữ α-SNAP-25, dung dịch kháng thể phát hiện α-SNAP-25 và giá thể pha rắn chứa kháng thể thu giữ đặc hiệu với sản phẩm SNAP-25 phân cắt được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 7.

Để phát hiện sự có mặt của sản phẩm SNAP-25 phân cắt bằng phân tích ELISA kiểu bánh kẹp ECL, đệm phong bế từ đĩa lưu giữ được hút bỏ, bổ sung 25-30µL dịch dung giải từ các tế bào được xử lý với endopeptidaza tái hướng đích vào từng lỗ và ủ

đĩa này ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 2 giờ hoặc 24 giờ. Rửa các lỗ của đĩa này ba lần bằng cách hút dịch dung giải tế bào và lắc rửa mỗi lỗ ba lần bằng 200µL 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Sau khi rửa, bổ sung 25µL dung dịch kháng thể phát hiện α-SNAP-25 với liều lượng 5µg/mL chứa chất phản ứng phong bế Amersham 2% trong 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat) vào từng lỗ, dán kín đĩa và ủ các đĩa dán kín này ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ có lắc. Sau khi ủ kháng thể phát hiện α-SNAP-25, các lỗ này được rửa ba lần bằng 200 µL 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Sau khi rửa, các đĩa được xử lý, phân tích dữ liệu thu được và tính toán EC_{50} như được mô tả trong Ví dụ 6. Kết quả này đã chỉ ra rằng lượng Noc/A trung bình là 1,0nM phát hiện được tại EC_{50} khi sử dụng tế bào vô tính SK-N-DZ dòng #3 (nằm trong khoảng từ khoảng 0,3nM đến khoảng 2,0nM), có tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận trên nằm trong khoảng từ khoảng 20:1 đến khoảng 300:1. Ngoài ra, EC_{50} phát hiện được với lượng Noc/A trung bình là 3,7nM khi sử dụng tế bào vô tính AGN P33 dòng #6 (nằm trong khoảng từ khoảng 2,0nM đến khoảng 5,5nM), có tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận trên nằm trong khoảng từ khoảng 20:1 đến khoảng 500:1. Đối với các tế bào SK12 đặc hiệu với endopeptidaza tái hướng đích chứa phối tử dynorphin A, EC_{50} phát hiện được với lượng Dyn/A trung bình là 8,4nM khi sử dụng các tế bào SK12 (phạm vi từ khoảng 4,5nM đến khoảng 10,0nM), có tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận trên nằm trong khoảng từ khoảng 10:1 đến khoảng 20:1. Ngoài ra, EC_{50} phát hiện được với lượng TVEMP-galanin trung bình là 8,8nM khi sử dụng tế bào vô tính Neuro-2a dòng #7 (nằm trong khoảng từ khoảng 5,0nM đến khoảng 15,5nM) có tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu đối với đường tiệm cận trên nằm trong khoảng từ khoảng 20:1 đến khoảng 200:1. Phương pháp này cũng có thể được thực hiện trong mô hình đa thành phần như được mô tả trong Ví dụ 9.

2. Phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện endopeptidaza tái hướng đích bằng cách sử dụng ELISA kiểu bánh kẹp CL

Dịch dung giải từ các tế bào được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích và dung dịch kháng thể thu giữ α-SNAP-25 được pha chế như được mô tả trong Ví dụ 7. Dung dịch kháng thể phát hiện α-SNAP-25 và giá thể pha rắn chứa kháng thể thu giữ

đặc hiệu đối với sản phẩm SNAP-25 phân cắt được pha chế như được mô tả trong Ví dụ 8.

Để phát hiện sự có mặt của sản phẩm SNAP-25 phân cắt bằng phân tích ELISA kiểu bánh kẹp CL, 100µL dịch dung giải từ các tế bào được xử lý bằng endopeptidaza tái hướng đích được bổ sung vào từng lỗ, đĩa này được dán kín và đĩa đã được dán kín này được ủ trên máy lắc tròn với tốc độ 500 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 2 giờ hoặc 24 giờ. Rửa các lỗ trên đĩa này ba lần bằng cách hút dịch dung giải tế bào và lắc rửa mỗi lỗ ba lần bằng 200µL 1 x PBS, TWEEN-20® 0,05% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Sau khi rửa, 100µL dung dịch kháng thể phát hiện HRP/kháng thể α-SNAP-25 đa dòng 1mg/mL chứa chất phản ứng phong bế Amersham 2% trong 1 x PBS, TWEEN-20® 0,1% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat) được bổ sung vào từng lỗ, dán kín đĩa và đĩa được dán kín này được ủ trên máy lắc tròn với tốc độ 650 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Sau khi ủ với kháng thể phát hiện, rửa các lỗ này ba lần bằng 200µL 1 x PBS, TWEEN-20® 0,05% (polyoxyetylen (20) sorbitan monolaureat). Sau khi rửa, bổ sung 100µL hỗn hợp SuperSignal ELISA Pico tỷ lệ 1:1 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) vào từng lỗ và đọc các đĩa này bằng cách sử dụng thiết bị đo cường độ quang (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) ở bước sóng 395nm. Phân tích dữ liệu thu được và tính toán EC_{50} như được mô tả trong Ví dụ 6. Phương pháp này cũng có thể được thực hiện trong mô hình đa thành phần như được mô tả trong Ví dụ 9.

Ví dụ 15. Phương pháp trên cơ sở miễn dịch để phát hiện các kháng thể trung hòa α-endopeptidase tái hướng đích

Ví dụ sau đây nhằm minh họa cách tiến hành phương pháp trên cơ sở miễn dịch có thể phát hiện sự có mặt của các kháng thể trung hòa α-Noc/A.

Hiện nay, Noc/A được đánh giá về khả năng điều trị các bệnh đau nhức, một số bệnh trong đó là mạn tính. Cùng với việc điều trị lặp lại trong một thời gian dài với Noc/A, bệnh nhân có thể phát triển kháng thể trung hòa α-Noc/A đối với endopeptidaza tái hướng đích dẫn đến sự kháng miễn dịch. Các kháng thể trung hòa α-Noc/A sẽ ức chế hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích này bằng cách ngăn việc hấp thu endopeptidaza tái hướng đích vào tế bào thần kinh và các tế bào đích khác bằng cách liên kết với phối tử đích của chúng và/hoặc vùng chuyển dịch (H_N) của endopeptidaza tái hướng đích đó. Hiện tại chưa có thử nghiệm được thiết lập để xác

định sự có mặt của các kháng thể trung hòa α-Noc/A này trong máu bệnh nhân. Điều này có thể có hiệu quả về thời gian và chi phí nhiều hơn nếu có thể phát triển thử nghiệm trên cơ sở tế bào để phát hiện các kháng thể trung hòa trong bệnh nhân được điều trị bằng endopeptidaza tái hướng đích đó.

Để phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của các kháng thể trung hòa α-Noc/A, phương pháp dựa trên cơ sở miễn dịch để xác định hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích được bộc lộ theo sáng chế có thể được sử dụng. Một cách để xác định lượng sản phẩm SNAP-25 phân cắt có mặt sau khi xử lý bằng các nồng độ khác nhau của Noc/A bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện thẩm tách Western, một cách khác nữa là sử dụng phương pháp phát hiện ELISA dạng bánh kẹp ECL.

Để tạo ra mẫu chứa các kháng thể trung hòa α-Noc/A, mẫu huyết thanh được tách từ máu của khỉ được gây miễn dịch bằng Noc/A và các kháng thể này được tinh sạch ái lực. Thỏ cũng được gây miễn dịch bằng biến thể peptit nociceptin, phối tử hướng đích có mặt trong phân tử Noc/A, huyết thanh của chúng được thu và kháng thể này được tinh sạch ái lực (các kháng thể đa dòng kháng nociceptin).

Để tạo ra dịch dung giải từ các tế bào được xử lý với mẫu chứa Noc/A, dòng tế bào vô tính tế bào vô tính SK-N-DZ dòng #3 và tế bào vô tính AGN P33 dòng #6 được cấy lên các đĩa poly-D-lysin 96 lỗ trong thời gian từ 16 đến 18 giờ. pAb kháng nociceptin ở mức 0-3μg/mL được pha loãng trong RPMI SFM (có chất bổ sung N2, B27 và NGF) chứa Noc/A 1nM và hỗn hợp này được ủ trước ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Tiếp đó, dung dịch này được bổ sung vào các tế bào và ủ trong 24 giờ trước khi tiến hành thử nghiệm ELISA ECL. Kháng thể biến thể kháng nociceptin này phong bế hoàn toàn sự hấp thu Noc/A 1nM tại 1μg/mL (ức chế >90%) trên cả hai dòng tế bào. Kháng thể đa dòng kháng Noc/A của khỉ cũng được thử nghiệm đối với các dòng tế bào này. Các tế bào được cấy trên đĩa poly-D-lysin 96 lỗ với 100.000 tế bào/lỗ trong 24 giờ trong môi trường sinh trưởng RPMI có bổ sung N2, B27 và NGF. Các kháng thể đa dòng kháng Noc/A ở mức từ 0 đến 20μg/mL được pha loãng trong môi trường chứa Noc/A 1nM và phức hợp này được ủ trước ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Tiếp đó hỗn hợp này được bổ sung vào các tế bào và ủ trong 24 giờ trước khi tiến hành thử nghiệm ECL ELISA. Với nồng độ pAb kháng Noc/A lớn hơn, 6-20μg/mL đối với dòng tế bào SK-N-DZ, mức ức chế phát hiện được lên đến 60% và đối với tế bào vô tính AGN P33 dòng #6 là khoảng 30%.

Đó là bởi vì các kháng thể đa dòng kháng Noc/A không đặc hiệu với vị trí liên kết và chứa kháng thể khác liên kết các phần khác của phân tử đó nên chỉ tạo ra sự phong bế một phần tại các nồng độ được thử nghiệm. Có thể cần đến nồng độ cao hơn để có được sự phong bế hoàn toàn.

Để phát hiện sự có mặt của sản phẩm SNAP-25 phân cắt bằng phân tích thẩm tách Western, hút môi trường trong từng lỗ và các tế bào được tạo hỗn dịch trong 50µL đệm nạp mẫu SDS-PAGE và tiếp đó gia nhiệt đến nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút. Phần chia đều từ mỗi mẫu đã thu sẽ được phân tích thẩm tách Western như được mô tả trong Ví dụ 1, ngoại trừ các mẫu đã thu sẽ được phân tách bằng SDS-PAGE sử dụng 12% gel tiêu chuẩn có 26 lỗ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), huyết thanh kháng thể α-SNAP-25_{197} đa dòng của thỏ được sử dụng làm kháng thể thứ cấp (xem Ví dụ 5). Các kết quả này cho biết nồng độ thấp nhất của endopeptidaza tái hướng đích có thể tạo ra băng sản phẩm SNAP-25 phân cắt có thể phát hiện được trong phân tích thẩm tách Western.

Để phát hiện sự có mặt của sản phẩm SNAP-25 phân cắt bằng ELISA kiểu bánh kẹp ECL, loại bỏ môi trường từ từng lỗ và các tế bào được dung giải như được mô tả trong Ví dụ 6. Dung dịch kháng thể thu giữ α-SNAP-25, dung dịch kháng thể phát hiện α-SNAP-25 và giá thể pha rắn α-SNAP-25 được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 8. Dịch nổi được chuyển lên giá thể pha rắn α-SNAP-25 và tiến hành thử nghiệm ELISA kiểu bánh kẹp ECL như đã được cụ thể hóa trong Ví dụ 6. Phân tích dữ liệu thu được và tính toán EC_{50} như được mô tả trong Ví dụ 6, ngoại trừ EC_{50} là mức pha loãng huyết thanh cần để ức chế endopeptidaza tái hướng đích đến mức ½ hoạt tính tối đa của nó và tỷ lệ của tín hiệu cao nhất ($Signal_{Max}$) so với tín hiệu thấp nhất ($Signal_{Min}$) thu được bằng cách chia tín hiệu sản phẩm SNAP-25 phân cắt thu được với mức pha loãng kháng thể cao nhất cho tín hiệu thu được với mức pha loãng kháng thể thấp nhất.

Các kết quả thu được cho thấy rằng sự có mặt của các kháng thể trung hòa α-Noc/A trong huyết thanh của khỉ và sự có mặt của các kháng thể biến thể α-nociceptin từ thỏ có thể phát hiện được. Hoạt tính của phân tử Noc/A được ủ với các kháng thể được tinh sạch ái lực từ động vật miễn dịch bị giảm do mức pha loãng kháng thể giảm. Thử nghiệm tương tự sẽ được tiến hành với các hợp chất Dyn/A và TVEMP-galanin bằng cách sử dụng dòng tế bào đặc hiệu với từng hợp chất được thử nghiệm.

Ví dụ 15. Phát triển thử nghiệm trên cơ sở tế bào đối với endopeptidaza tái hướng đích galanin

Ví dụ sau đây nhằm minh họa cách xác định các dòng tế bào đã thiết lập có khả năng hấp thu endopeptidaza tái hướng đích cần thiết để phát triển thử nghiệm tính hiệu lực trên cơ sở tế bào.

1. Phát triển các dòng tế bào ứng viên từ giống gốc

Để phát triển dòng tế bào, mật độ thích hợp của các tế bào từ dòng tế bào thử nghiệm được cấy vào bình nuôi cấy mô diện tích 162cm^2 chứa 30mL môi trường sinh trưởng thích hợp (xem Bảng 25) và được cho phát triển trong tủ ủ 37°C có cacbon dioxit 5% hoặc 10% cho đến khi các tế bào đạt đến mật độ mong muốn.

Bảng 25. Bảng tóm tắt tất cả các dòng tế bào và các môi trường tương ứng của chúng

Loại tế bào; mô tả; nguồn gốc	**Môi trường đầy đủ (CM) Tất cả đều từ Invitrogen (trừ khi có quy định khác)**	**Môi trường không chứa huyết thanh (SFM) Tất cả đều từ Invitrogen, (trừ khi có quy định khác)**
SiMa (dòng tế bào u nguyên bào thần kinh của người, DSMZ# ACC 164, Braunschweig, Germany) SiMa H1 (dòng tế bào vô tính từ các tế bào SiMa)	RPMI 1640 (90%) Huyết thanh bào thai bò (FBS, 10%) NEAA (0,1mM), HEPES (10mM), Natri Pyruvat (1mM) Penixilin (100U/ml) Streptomyxin (100µg/ml),	RPMI 1640 (90%) NEAA (0,1mM), HEPES (10mM), Natri Pyruvat (1mM) Penixilin (100U/ml) Streptomyxin (100µg/ml) Chất bổ sung N2 (1x) Chất bổ sung B27 (1x)
Neuro-2a (U nguyên bào thần kinh của chuột nhắt: (ATCC#CCl131, Manassas, VA,)	EMEM của Earle (90%) Huyết thanh bào thai bò 10%) NEAA (0,1mM), HEPES (10mM), Natri Pyruvat (1mM), Penixilin (100U/ml), Streptomyxin (100µg/ml)	EMEM (90%) NEAA (0,1mM), HEPES (10mM), Natri Pyruvat (1mM), Penixilin (100U/ml), Streptomyxin (100µg/ml)
PC-12 U tế bào ưa crôm của chuột cống (ATCC # CRL-1721)	RPMI 1640 (90%) FBS được thẩm tách (5%) Huyết thanh ngựa (10%)	Môi trường biệt hóa: RPMI 1640 (90%) HEPES (10mM)

	HEPES (10mM) Natri Pyruvat (1mM) D-glucoza (0,5%,Sigma) Penixilin (100U/ml); Streptomyxin (100µg/ml) Chất bổ sung N2 (1x)	Natri Pyruvat (1mM) D-glucoza (0,5%, Sigma) Penixilin (100U/ml); Streptomyxin (100µg/ml) Chất bổ sung N2 (1x) Albumin huyết thanh bò (0,2% trọng lượng/thể tích) NGF (50ng/ml, Promega)
P19 Tế bào ung thư biểu mô phôi chuột nhắt (ATCC #CRL-1825)	Alpha MEM (90%) Huyết thanh bê (7,5%) FBS (2,5%) Penixilin (100U/ml); Streptomyxin (100µg/ml)	Alpha MEM (90%) FBS (2,5%) Penixilin (100U/ml); Streptomyxin (100µg/ml)
NEAA: Các axit amin không thiết yếu, MEM: Môi trường cần thiết tối thiểu. DMEM: MEM của Dulbecco. EMEM: MEM của Earle. Lưu ý các tế bào PC-12 được biệt hóa trong môi trường biệt hóa và không là SFM.		

2. Sàng lọc các dòng tế bào thương mại nhạy với các hợp chất galanin TVEMP-galanin

Các dòng tế bào thương mại được sàng lọc về độ nhạy của chúng đối với hợp chất TVEMP-galanin được xác định bằng sự phân cắt của SNAP25 sau khi xử lý bằng các hợp chất tương ứng. Các hợp chất TVEMP-galanin khác nhau được sử dụng để sàng lọc và thử nghiệm. Tế bào PC-12, Neuro-2a, SiMa và P19 được cấy lên môi trường không chứa huyết thanh trong 3 ngày hoặc vào CM trong 1 ngày. Các tế bào được biệt hóa và chưa qua thử nghiệm này được xử lý trong 18 giờ với TVEMP-galanin mẻ A ở nồng độ bằng 0 và 75nM. TVEMP-galanin mẻ A thể hiện hoạt tính trong cả hai loại tế bào PC-12 và Neuro-2a như được quan sát thấy bởi sự gia tăng của SNAP25 phân cắt và các tế bào Neuro-2a trong điều kiện biệt hóa nhạy với các hợp chất TVEMP với phối tử galanin hơn là các tế bào chưa qua thử nghiệm. Thứ tự hoạt tính của các tế bào này cho thấy tế bào PC-12 có hoạt tính cao nhất, tiếp đó là Neuro-2a và cuối cùng là tế bào SiMa. Cần phải xác định nếu việc hấp thu này là đặc hiệu đối với các hợp chất tái hướng đích galanin này và do đó điều này rất quan trọng để thử nghiệm các tế bào này với các hợp chất khác không chứa phối tử galanin. Noc/A là

một hợp chất tái hướng đích chứa phối tử biến thể nociceptin và LH_N/A (đối chứng âm) là hợp chất không có miền liên kết. Việc hấp thu LH_N/A này là không đặc hiệu và có hoạt tính thấp hơn đáng kể so với hợp chất TVEMP-galanin này nếu dòng tế bào có sự hấp thụ đặc hiệu với hợp chất được tái hướng đích đó. Trước đây, hợp chất Noc/A này được thể hiện để có khả năng hấp thu đặc hiệu trong các tế bào SiMa và được sử dụng làm đường gốc để thử nghiệm các dòng tế bào. Dòng tế bào ưu tiên có khả năng hấp thu H_N/A và hợp chất Noc/A ở mức thấp và hấp thu hợp chất TVEMP-galanin ở mức cao. Bảng 26 thể hiện các kết quả từ thử nghiệm này.

Bảng 26. Sàng lọc các tế bào PC-12, Neuro-2a và SiMa trong các điều kiện khác nhau, bằng cách sử dụng TVEMP-galanin

		TVEMP-galanin mẻ A	**TVEMP-galanin mẻ B**	**LH_N/A**	**Noc/A**
Nồng độ (mg/mL)		0,168	0,175	1,63	1,00
Giá trị EC_{50} (nM)	**PC-12, chưa qua thử nghiệm**	73,4 ± 10,7	105,6 ± 16,0	>200	72,9 ± 26,9
	SiMa, chưa qua thử nghiệm	138,6 ± 43,9	133,8 ± 24,2	>300	48,3 ± 18,1
	Neuro-2a, chưa qua thử nghiệm	122,4 ± 15,7	116 ± 17,5	>200	>150
	SiMa, biệt hóa qua đêm	>400	>150	>400	16,1 ± 11,9
	Neuro-2a, biệt hóa 4 ngày		34,5 ± 7,5	39,7 ± 5,6	105,9 ± 44,3
	SiMa, biệt hóa 4 ngày	101,8 ± 20,5	65,3 ± 7,8	>150	88,7 ± 23,3
TVEMP các mẻ A và B và các đối chứng LH_N/A và Noc/A thử nghiệm trên các dòng tế bào và các điều kiện sinh trưởng/biệt hóa khác nhau. Biểu đồ tóm tắt thể hiện chi tiết từng thành phần được kiểm tra cộng thêm các giá trị EC_{50}.					

Kết quả cho thấy rằng TVEMP-galanin mẻ A và TVEMP-galanin mẻ B có các đồ thị hoặc giá trị EC_{50} tương đương, hoặc chỉ có hoạt tính nhiều gấp 1-2 lần so với mẫu đối chứng âm trong các dòng tế bào được thử nghiệm. Dữ liệu này ngụ ý rằng các

tế bào chưa qua thử nghiệm không đủ nhạy và các tế bào này sẽ được chuyển nhiễm với plasmit mã hóa các protein thụ thể galanin là thụ thể GalR1 hoặc GalR2.

3. Chuyển nhiễm ổn định các tế bào PC-12, Neuro-2a và SiMa với GalR

Một ngày trước khi chuyển nhiễm, các tế bào được cấy với mật độ 0,5 x 10^6 tế bào/lỗ trên đĩa 6 lỗ được phủ Colagen IV (Cat#354554: BD Biosciences) (SiMa, PC-12) hoặc đĩa 6 lỗ Costar (Cat# 3516: Corning) (Neuro-2a). Các lần chuyển nhiễm được tiến hành bằng cách pha loãng 12µl Lipofectamine™ 2000 (Cat # 52758, Invitrogen) trong 250µl môi trường Opti-MEM® I huyết thanh giảm (Cat# 3195, Invitrogen) sau đó ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút. Trộn 4µg ADN plasmit GalR với 0,4µg vectơ pAdVantage™ (1mg/ml, Cat#E1711, Promega) trong 250µl môi trường Opti-MEM® I huyết thanh giảm trong thời gian 5 phút. Sau 5 phút ủ, Lipofectamine™ 2000 đã được pha loãng và ADN plasmit đã được pha loãng được trộn với nhau và được ủ trong 20 phút nữa ở nhiệt độ trong phòng, để hình thành phức hợp. Trong lúc đó, rửa các tế bào với Opti-MEM® và bổ sung 0,5ml OPTI-MEM® vào từng lỗ. Sau 20 phút ủ, 0,5ml môi trường chứa phức hợp Lipofectamine™ 2000 đã được pha loãng và ADN plasmit đã được pha loãng được bổ sung từ từ vào các lỗ chứa các tế bào trong 0,5ml OPTI-MEM®. Đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 5 giờ, sau đó bổ sung 1ml môi trường đầy đủ. Ngày tiếp theo, môi trường này được thay thế bằng môi trường sinh trưởng trong thời gian 48 giờ. Vào ngày thứ 4, sau khi thu hồi các tế bào sau chuyển nhiễm, môi trường sinh trưởng này được thay thế bằng môi trường sinh trưởng mới chứa Genetixin® (Cat #10131: Invitrogen) ở nồng độ 0,5mg/ml (pha loãng 1:100) và được ủ thêm 3 ngày nữa. Vào ngày thứ 7 sau khi chuyển nhiễm, các tế bào này được chuyển vào bình Colagen IV 75cm (Cat# 35423: BD Biosciences) chứa môi trường sinh trưởng và genetixin (0,5 mg/ml, pha loãng 1:100). Tại bước chuyển này, khoảng 90% tế bào bị chết và sẽ được loại bỏ trong khi thay môi trường mới. Các môi trường sinh trưởng chứa genetixin (0,5mg/ml, pha loãng 1:100) được thay đổi hai ngày một lần cho đến ngày thứ 21.

Để chọn lọc các tế bào ổn định có thể tiếp nhận các hợp chất galanin TVEMP, các thông số được sử dụng để sàng lọc các dòng sản tạo ra tỷ lệ phần trăm phân cắt SNAP25 cao nhất khi xử lý với TVEMP-galanin trong ELISA kiểu bánh kẹp ECL bằng cách sử dụng các đĩa phủ 2E2A6 đơn dòng để thu giữ và kháng thể gắn đầu sulfo SNAP25 đa dòng (Sigma Cat # S9684) để phát hiện. Các giá trị EC_{50} trong Bảng 27

cho thấy TVEMP-galanin mẻ D thể hiện sự hấp thụ cao hơn ít nhất 10 lần so với mẫu đối chứng âm trong các tế bào SiMa và Neuro-2a được chuyển nhiễm với GalR1 và GalR2 và chỉ hấp thu lớn hơn từ 2 đến 4 lần trong các tế bào PC-12 đã được chuyển nhiễm. Do các tế bào PC-12 đã được chuyển nhiễm có độ nhạy và tính đặc hiệu thấp hơn so với các tế bào SiMa và Neuro-2a, nên chúng không được tách dòng. Ngoài ra, do phối tử galanin 1-16 gốc trong các hợp chất TVEMP-Galanin liên kết với thụ thể GALR1 có ái lực cao hơn so với GALR2, nên chỉ các tế bào được chuyển nhiễm với GALR1 mới được tách dòng. Số liệu này cũng cho thấy rằng cả TVEMP-galanin mẻ C và D đều thể hiện sự hấp thu cao hơn gấp từ 9-10 lần so với cả LH_N/A và hợp chất nociceptin tái hướng đích TVEMP-nociceptin trong Neuro-2a GalR1.

Bảng 27. Kiểm tra các quần thể được chuyển nhiễm ổn định nhưng không tách dòng của SiMa, Neuro-2a và PC12 được chuyển nhiễm với thụ thể GalR1 hoặc GalR2

		TVEMP-galanin C	**TVEMP-galanin D**	**LH_N/A**	**TVEMP-nociceptin**
Nồng độ (mg/mL)		1,260	0,303	1,46	1,00
Giá trị EC_{50} (nM)	**SiMa GalR1**		36,2 ± 8,6	>300	
	SiMa GalR2		26,6 ± 6,7	>300	
	PC-12 GalR1		64,1 ± 19,5	202,7	
	PC-12 GalR2		>150	>300	
	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

Các quần thể được chọn lọc không tách dòng không phải là quần thể tế bào tốt để sử dụng theo cách thông thường do chúng chứa hỗn hợp của các tế bào biểu hiện các mức khác nhau của thụ thể và các quần thể này có thể thay đổi theo thời gian. Để thu được các dòng tế bào ổn định từ các tế bào đơn, cách tiếp cận tách dòng pha loãng được bắt đầu. Vào ngày thứ 21, tế bào đã được chuyển nhiễm được trypsin hóa, tách bằng kim và đếm. Các dòng tế bào đã được chuyển nhiễm còn lại được đông khô để sử dụng sau. Các tế bào này được pha loãng tuần tự đến 10 tế bào/ml trong môi trường sinh trưởng chứa genetixin (0,5mg/ml, pha loãng 1:100). Cấy lên đĩa 2 x 96 lỗ phủ Colagen IV (SiMa, PC-12) hoặc đĩa Costa 2 x 96 lỗ (Neuro-2a) một lượng 100µl/lỗ để

đạt mật độ 1 tế bào/lỗ. Các đĩa này được đưa vào tủ ủ và để yên trong 2 tuần để tạo khuẩn lạc. Sau 2 tuần nuôi cấy (ngày thứ 35), kiểm tra cẩn thận các lỗ để tìm các khuẩn lạc đơn hình thành ở đáy lỗ (toàn bộ lỗ đã được kiểm tra kỹ lưỡng xem có nhiều khuẩn lạc hay không). Nếu xác định trong một lỗ có một đám các tế bào, thì toàn bộ lỗ này được xem xét cẩn thận để chắc chắn là tồn tại một và chỉ môt đám tế bào này. Hình ảnh của đám riêng biệt như vậy được chụp lại. Nếu có thắc mắc bất kỳ về các đám bổ sung thì không lựa chọn lỗ đó. Vào ngày thứ 36, các dòng được chọn lọc này được tách ra khỏi TrypLE và bổ sung 0,5ml môi trường đầy đủ chứa genetixin (0,5mg/ml, pha loãng 1:100) vào để dừng phản ứng trypsin. Toàn bộ thể tích này được chuyển lên các đĩa 6 lỗ và pha loãng tiếp với 3,0ml môi trường đầy đủ bổ sung chứa genetixin (0,5mg/ml, pha loãng 1:100). Các dòng này được để cho phát triển đến khi độ bao phủ bề mặt là 90%, tiếp đó được trypsin hóa tiếp và được chuyển vào bình nuôi cấy Colagen IV hoặc Costar 75cm có 10,0ml môi trường đầy đủ chứa genetixin (0,5mg/ml, pha loãng 1:100). Ngay khi tế bào độ bao phủ bề mặt là 90% lần nữa, thì tế bào này được sử dụng cho vào ba lọ đông lạnh để bảo quản đông lạnh hoặc được sử dụng để sàng lọc trong thử nghiệm ELISA với các hợp chất tái hướng đích galanin.

Hợp chất TVEMP-galanin mẻ C tham chiếu được sử dụng để thử nghiệm các dòng này sử dụng hai người thực hiện các thử nghiệm độc lập. Các dòng SiMa GalR1 phát triển chậm và không sẵn có để kiểm tra trong giai đoạn này. May mắn là, các dòng Neuro-2a phát triển nhanh hơn và nhanh chóng đạt đến lượng 8 trong số 12 dòng có sẵn để thử nghiệm. Các tế bào vô tính Neuro-2a GalR1 được thử nghiệm với mức liều dùng đầy đủ đối với các hợp chất TVEMP-galanin (từ 0 đến 30nM) và các kết quả của chín trong số các dòng này được thể hiện dưới đây. Bốn dòng còn lại phát triển rất chậm và không được thử nghiệm. Các tế bào gốc được chọn lọc nhưng không tách dòng được cấy cùng với các dòng này để làm điểm chuẩn. Bảng 28 thể hiện hoạt tính của mỗi dòng trong số tám dòng cùng với các tế bào Neuro-2a GalR1 không tách dòng được chọn lọc khi được thử nghiệm bằng hợp chất TVEMP-galanin. Ngoài tám dòng được thử nghiệm, chỉ có các dòng #4, 7 và 12 thể hiện khả năng hấp thu tốt hợp chất TVEMP-galanin với các giá trị EC_{50} có thể chấp nhận được. Neuro-2a GalR1 các dòng # 1, 3 và 10 không hấp thu hợp chất TVEMP-galanin, trong khi các dòng # 5, 11 và 13 cùng với quần thể không tách dòng tạo ra các giá trị EC_{50} rất cao và không có thử nghiệm bào được thực hiện với các tế bào này.

Bảng 28. Kết quả sàng lọc các dòng có nguồn gốc từ tế bào Neuro-2a GalR1 đơn với TVEMP-galanin mẻ C

		EC50 ± sai số chuẩn (nM)	
Đĩa	**Loại tế bào**	**Trình tự kiểm soát 1**	**Trình tự kiểm soát 2**
1	N2A không tách dòng	82,1±9,6	92,0±10,8
1	N2A GALR1 dòng #1	>300	>300
1	N2A GALR1 dòng #3	>300	>300
1	N2A GALR1 dòng #4	39,7±3,4	39,4±6,6
2	N2A không tách dòng	211,2±167,7	116,0±26,8
2	N2A GALR1 dòng #5	202,6±82,9	113,0±18,1
2	N2A GALR1 dòng #7	23,1±3,3	15,5±1,8
2	N2A GALR1 dòng #10	>300	>300
3	N2A GALR1 dòng #7	20,3 ± 1,6	38,0±6,3
3	N2A GALR1 dòng #11	270,0±243	247,0±101
3	N2A GALR1 dòng #12	43,2±5,2	57,5±14,3
3	N2A GALR1 dòng #13	144,1±143	184,7±15,6

4. Đặc trưng của sự biểu hiện GalR1 trong các dòng tế bào vô tính

Việc sàng lọc các dòng cho thấy rằng chỉ các dòng # 4, 7 và 12 là nhạy hơn so với các tế bào không tách dòng. ARN thông tin (mARN) được chiết từ ba dòng này cũng như các tế bào Neuro-2a không tách dòng được chuyển nhiễm ổn định và tế bào Neuro-2a gốc không được chuyển nhiễm để xác định đặc trưng bằng RT-PCR bằng cách sử dụng các điều kiện RT-PCR được mô tả trong Ví dụ 5 và các đoạn mồi được mô tả trong Bảng 29.

Bảng 29. Các đoạn mồi GALR1 và GALR2 đặc hiệu

Tên	**Trình tự**	**SEQ ID NO:**
GALR1 mồi xuôi	5' ' CCCCATCATGTCATCCACCT 3'	150
GALR1 mồi ngược	5' ATGGGGTTCACCGAGGAGTT 3'	151
GALR2 mồi xuôi	5' CATCGTGGCGGTGCTTTT 3'	152
GALR2 mồi ngược	5' AGCGGGAAGCGACCAAAC 3'	153

Kết quả thể hiện trong Bảng 30 cho thấy rằng các tế bào không tách dòng được chuyển nhiễm và các dòng có lượng mARN GALR1 lớn hơn nhiều so với các tế bào

gốc. Khi sàng lọc tế bào TVEMP-Galanin, dòng #7 thể hiện là nhạy nhất với TVEMP-galanin. Dòng #7 này cũng có lượng GALR1 mARN cao nhất theo Bảng 30. Các giá trị CT đối với Neuro-2a GalR1 dòng 7 (Neuro-2a #7) là thấp nhất, sau đó đến dòng 4 và tiếp đó là dòng 12. Các thí nghiệm với tế bào không tách dòng tại thời điểm này tạo ra CT gần với dòng 12, tuy nhiên, các tế bào này chứa một quần thể tế bào thay đổi liên tục có các nồng độ thụ thể GalR1 khác nhau và do đó không được xem là quần thể tốt để sử dụng tiếp. Trong ba dòng có EC_{50} thấp, Neuro-2a GalR1 dòng #12 (Neuro-2a # 12) sinh trưởng nhanh nhất, tiếp đó là Neuro-2a dòng #7 và cuối cùng là Neuro-2a dòng #4. Ngoài tốc độ sinh trưởng chậm của nó, Neuro-2a dòng # 4 không được thử nghiệm tiếp do độ nhạy của Neuro-2a dòng #7 tốt hơn nhiều so với dòng #4.

Bảng 30. Điểm khác biệt trong GALR1 mARN giữa các tế bào Neuro-2a tách dòng được chuyển nhiễm so với tế bào gốc và không tách dòng được chuyển nhiễm

Dòng tế bào	Gốc	Không tách dòng	Dòng 4	Dòng 7	Dòng 12
CT trung bình	32,0	21,7	20,8	19,3	21,6
Số lần thay đổi mARN	1,0	1269,5	2418,7	6793,8	1332,6

5. So sánh độ nhạy và tính đặc hiệu của Neuro-2a dòng #7 và #12 với các hợp chất TVEMP-galanin

Hai dòng được thử nghiệm song song với nhau khi nỗ lực tìm ra độ nhạy và tính chọn lọc lớn nhất của hai dòng này, sao cho dữ liệu có thể được lựa chọn với độ tin tưởng cao từ dòng thực hiện tốt nhất. Bảng 31 thể hiện các kết quả của hai dòng này khi được xử lý bằng TVEMP-galanin mẻ C và LH_N/A về độ nhạy và tính chọn lọc tương ứng. Cả hai dòng này đều có thể hiện các tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu cao. Neuro-2a dòng #7 có EC_{50} là 5,5nM trong khi EC_{50} đối với Neuro-2a dòng #12 là 68,4nM. Neuro-2a dòng #12 này có thể được thử nghiệm với khoảng liều dùng nằm trong khoảng từ 0 đến 300nM, trong khi Neuro-2a dòng #7 có thể được kiểm tra với khoảng liều dùng nằm trong khoảng từ 0 đến 30nM để tạo ra trạng thái bình ổn ở nồng độ cao nhất được sử dụng. Cả hai dòng thể hiện sự phân tách tốt giữa LH_N/A và TVEMP-galanin mẻ C, Neuro-2a dòng #12 thể hiện một chút sự hấp thu không chọn lọc ở nồng độ cao, trong khi Neuro-2a dòng #7 lại không thể hiện. Như được quan sát từ kết quả trong bảng, khoảng để thử nghiệm đối với tế bào Neuro-2a dòng #7 là thấp hơn 10 lần so với các tế bào Neuro-2a dòng #12 dẫn đến lượng hợp chất được sử dụng

cho Neuro-2a dòng # 7 thấp hơn 10 lần so với Neuro-2a dòng #12. Neuro-2a dòng #7 có tính chọn lọc cao gấp 8 lần so với Neuro-2a dòng #12 khi LH_N/A được sử dụng để so sánh. Tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu là trên 100 đối với cả hai dòng, tuy nhiên, tỷ lệ 10 có thể là đủ để phát triển thử nghiệm hiệu lực dựa trên tế bào. Giá trị EC_{50} đối với Neuro-2a dòng #7 là 5,5nM thấp hơn khoảng 12 lần so với giá trị đó của Neuro-2a dòng #12, EC_{50} của nó là 68,4 nM. Khoảng liều dùng để thử nghiệm thấp, tính chọn lọc cao gấp 24 lần so với LH_N/A, tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu cao, độ nhạy tốt dẫn đến EC_{50} thấp và lượng protein cần thiết để cho mỗi thử nghiệm thấp, tất cả hàm ý rằng Neuro-2a dòng #7 cần phải được tách dòng để thực hiện tiếp thử nghiệm tính hiệu lực trên cơ sở tế bào để sử dụng để xác định các tỷ lệ hiệu lực đối với các hợp chất TVEMP-galanin.

Bảng 31. So sánh đặc tính của Neuro-2a dòng #7 và #12.

	Neuro-2a dòng #7	**Neuro-2a dòng #12**
Khoảng	0-30nM	0-300nM
Độ nhạy	24-lần	3-lần
Tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu	190	547
Tỷ lệ phần trăm tín hiệu LH_N/A cực đại trên tín hiệu TVEMP-Gal cực đại	4,3%	37,6%
EC_{50}	5,5nM	68,4nM
Protein cần thiết	~ 1µg	~ 10µg
Neuro-2a dòng # 7 và #12 được xử lý bằng TVEMP-galanin mẻ C và LH_N/A trong 16 giờ trong CM. Hoạt tính phát hiện được bằng ECL-ELISA.		

Ví dụ 16. Tạo các dòng tế bào vô tính biểu hiện quá mức thụ thể KOR-1 đối với sự hấp thu endopeptidaza tái hướng đích Dynorphin A

Ví dụ sau đây nhằm minh họa cách xác định đặc tính và so sánh giữa một số dòng tế bào vô tính có nguồn gốc từ một dòng tế bào đã thiết lập được chuyển nhiễm với thụ thể đích và tiếp đó được tách dòng tiếp của dòng tế bào này. Ví dụ cụ thể này chỉ nhằm nhận dạng và mô tả đặc điểm của các dòng tế bào vô tính được chuyển nhiễm với hKOR-1 đã được mô tả trong Ví dụ 3, Bảng 9.

Bốn dòng AGN P33-KOR (dòng số 8, 9, 10 và 12 Bảng 9 trong Ví dụ 3) được chọn lọc và thử nghiệm bằng Dyn/A với đáp ứng liều dùng đầy đủ từ 0 đến 150nM. Đồng thời, hai dòng SiMa-KOR (dòng số 12 và 16 Bảng 9 trong Ví dụ 3) được chọn lọc và thử nghiệm bằng Dyn/A với đáp ứng liều dùng đầy đủ từ 0 nằm 150nM. Trong thí nghiệm này, GN P33-KOR dòng 8, 9 và 12 tạo ra sự hấp thu rất thấp và do đó được loại bỏ; GN P33-KOR dòng 10 biểu hiện sự hấp thu tốt và có EC_{50} thu được là 30,3nM. Hai dòng SiMa-KOR được thử nghiệm biểu hiện sự hấp thu tốt và EC_{50} là 26,6nM thu được đối với dòng 16 và EC_{50} là 11,8nM thu được đối với dòng 12. Ba dòng này được thử nghiệm về độ nhạy và tính chọn lọc bằng cách so sánh với mức hấp thu của hợp chất Dyn/A đích dựa trên mẫu đối chứng âm LH_N/A mà thiếu phối tử đích và đối chứng Noc/A. Việc so sánh ba dòng này và các tế bào gốc SiMa bằng cách sử dụng đáp ứng liều dùng đầy đủ từ 0 đến 150nM được tóm lược trong Bảng 32.

Bảng 32

Dòng tế bào	**EC_{50} Dyn/A (nM)**	**EC_{50} LHN/A (nM)**	**EC_{50} Noc/A (nM)**
SiMa gốc	> 100	> 100	5,4
AGN P33-KOR dòng 10	9,7	> 150	9,4
SiMa-KOR dòng 16	10,6	> 100	1,6
SiMa-KOR dòng 12	4,65	>150	19,7

Có sự tăng cường hấp thu Dyn/A đáng kể trong các dòng được chuyển nhiễm KOR-1 được xử lý bằng Dyn/A trong khi các tế bào SiMa gốc cho thấy sự hấp thu tối thiểu hợp chất này (hấp thu tương đương với mẫu đối chứng âm LH_N/A). Có một số Noc/A trong các dòng tế bào này kể cả các tế bào SiMa gốc. Điều này không bất ngờ do quan sát được sự hấp thu Noc/A trong các tế bào SiMa trong khi tiến hành thử nghiệm đối với hợp chất tái hướng đích này. Hơn nữa, sự hấp thu Noc/A là tốt nhất trong dòng tế bào AGN P33 mà thu được một cách đặc hiệu đối với endopeptidaza tái hướng đích này. Sự khác biệt giữa việc hấp thu Noc/A và hấp thu hợp chất Dyn/A là cao hơn trong các tế bào SiMa-KOR vô tính dòng 12 (SK12). Trong tất cả các đồ thị, hoạt tính của mẫu đối chứng âm, LHN/A, là tối thiểu, cho thấy rằng việc thiếu vùng liên kết mà không có sự hấp thu đặc hiệu trong các dòng tế bào này và các tế bào SK12 có giá trị thấp nhất cho thấy rằng sự hấp thu của hợp chất Dyn/A có tính đặc

hiệu cao. Theo các kết quả này, dòng SK12 được lựa chọn để tối ưu hóa và xác định đặc tính tiếp.

Các nghiên cứu để tối ưu hóa được thực hiện với các tế bào SK12 để phát triển một thử nghiệm mạnh, nhạy và đặc hiệu. Một vài thông số được thử nghiệm bao gồm môi trường nuôi cấy và mật độ nuôi cấy, môi trường xử lý và thời gian xử lý. Dữ liệu tóm tắt thu được trong quá trình tối ưu hóa được trình bày trong Bảng 33.

Bảng 33

Môi trường được sử dụng			**Tế bào/lỗ**				
Cấy	**Xử lý**	**Thời gian xử lý**	**25000**	**50000**	**75000**	**100000**	**150000**
Đầy đủ	Đầy đủ	6 giờ + o/n	51,3	76	13,4	9,2	n/a
Đầy đủ	Đầy đủ	16 giờ	21,3	19,0	4,96	4,64	n/a
Đầy đủ	Đầy đủ	16 giờ	n/a	n/a	n/a	2,1	15,3
Không chứa huyết thanh	Không chứa huyết thanh	16 giờ	n/a	n/a	n/a	9,0	12,1
Đầy đủ	Không chứa huyết thanh	16 giờ	n/a	10,3	5,4	8,97	8,38
Đầy đủ	Đầy đủ	16 giờ	n/a	7,7	4,86	13,72	11,26
Không chứa huyết thanh	Không chứa huyết thanh	16 giờ	n/a	11,2	8,5	8,4	9,2

Bảng B cho thấy tế bào được cấy với mật độ 100.000 tế bào/lỗ trong CM và được xử lý bằng các hợp chất trong CM thể hiện các giá trị EC_{50} biến đổi nhiều hơn từ thử nghiệm này đến thử nghiệm tiếp theo (4,6; 1,2 và 13,72nM), trong khi các tế bào được cấy ở mật độ 100.000 tế bào/lỗ trong SFM và xử lý bằng hợp chất được pha loãng trong SFM tạo ra đường cong tốt nhất và các giá trị EC_{50} phù hợp (9,0 và 8,4 nM). Tiếp đó, tế bào được cấy ở mật độ 100.000 tế bào/lỗ trong SFM và được xử lý bằng hợp chất cũng trong SFM.

SK12 được cấy trên đĩa PDL với mật độ 100.000 tế bào/lỗ trong SFM trong 24 giờ, tiếp đó xử lý trong SFM trong 16 giờ thu được giá trị EC_{50} ít nhất là 8,4 ±1,1nM và có tỷ lệ tín hiệu - tín hiệu nhiễu là 12. Cả hai giá trị này là chấp nhận được để sử dụng tế bào này trong CBPA trong tương lai.

Xác định đặc tính của các tế bào SK12 bằng thử nghiệm liên kết bão hòa

Thử nghiệm liên kết bão hòa được sử dụng ở đây đã được mô tả chi tiết trong Ví dụ 5. Các nghiên cứu liên kết bão hòa được tiến hành bằng cách sử dụng chất đối kháng ^{3}H-diprenorphin của KOR-1 để đánh giá liên kết. Tổng số liên kết, liên kết đặc hiệu và liên kết không đặc hiệu được xác định trong một số thử nghiệm. Đường cong ^{3}H-diprenorphin liên kết bão hòa với thụ thể được tạo ra từ hai thử nghiệm độc lập. Đường cong này cho thấy khoảng 25% là liên kết không đặc hiệu và 75% là liên kết đặc hiệu của phân tử đó với thụ thể. Ái lực của phân tử này với thụ thể là khoảng 6,5 nM. Giá trị Bmax cho thấy rằng trên các tế bào SK12 có 23 fmol thụ thể KOR-1/tế bào.

Trừ khi có quy định khác, tất cả các số liệu thể hiện số lượng các thành phần, tính chất như trọng lượng phân tử, các điều kiện phản ứng, v.v. được sử dụng theo sáng chế và yêu cầu bảo hộ, cần được hiểu rằng còn được thay đổi trong tất cả các trường hợp bằng thuật ngữ "khoảng". Do đó, trừ khi được nêu với nghĩa ngược lại, các thông số bằng số chỉ ra trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ kèm theo là gần đúng, giá trị này có thể phụ thuộc nhiều vào các tính chất mong muốn được tìm kiếm thu được theo sáng chế. Ngay tại mức thấp nhất và không làm giới hạn việc áp dụng nguyên lý tương đương đối với phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ, mỗi thông số dạng số ít nhất được hiểu theo số của những chữ số có ý nghĩa được báo cáo và bằng cách áp dụng các phương pháp làm tròn số thông thường. Mặc dù các khoảng trị số và các thông số nêu lên phạm vi rộng theo sáng chế, là những giá trị xấp xỉ, nhưng số liệu được nêu trong các ví dụ cụ thể được báo cáo là chính xác nhất có thể. Tuy nhiên, một giá trị số bất kỳ, vẫn còn có những sai số nhất định do độ lệch chuẩn phát hiện được trong các phép đo thử nghiệm tương ứng của chúng.

Các thuật ngữ ở dạng số ít và các thuật ngữ tương tự được sử dụng trong ngữ cảnh theo sáng chế (đặc biệt là trong ngữ cảnh của các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây) có thể được hiểu là bao hàm cả dạng số ít và dạng số nhiều, trừ khi có quy định khác. Việc trích dẫn các khoảng giá trị trong bản mô tả chỉ dùng làm phương pháp giản lược để đề cập một cách riêng biệt đến mỗi giá trị riêng biệt nằm trong khoảng này. Trừ khi có quy định khác, mỗi giá trị riêng biệt được đưa vào bản mô tả này như thể nó được trích dẫn riêng trong bản mô tả. Tất cả các phương pháp được mô tả ở đây có thể thực hiện theo thứ tự thích hợp bất kỳ trừ khi có quy định khác. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ

và tất cả các ví dụ hoặc ngôn từ, ví dụ (ví dụ, "như") theo sáng chế chỉ nhằm làm rõ thêm về sáng chế chứ không nhằm hạn chế phạm vi theo sáng chế được yêu cầu bảo hộ khác. Không có từ ngữ theo sáng chế được hiểu là chỉ ra dấu hiệu không được bảo hộ bất kỳ mà cần thiết để thực hiện sáng chế này.

Các nhóm của các dấu hiệu hoặc phương án được bộc lộ ở đây không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Mỗi thành phần trong nhóm này có thể được viện dẫn và được yêu cầu bảo hộ riêng rẽ hoặc ở dạng kết hợp bất kỳ với các thành phần khác của nhóm hoặc các dấu hiệu khác được tìm thấy ở đây. Cũng dự đoán là một hoặc nhiều thành phần trong một nhóm có thể đưa vào hoặc loại bỏ khỏi nhóm với lý do để tạo thuận lợi và/hoặc đáp ứng tiêu chuẩn bảo hộ. Khi xuất hiện việc đưa vào hoặc loại bỏ bất kỳ như vậy, phần mô tả được coi như là chứa nhóm như được thay đổi đó, vì vậy, phần mô tả bằng văn bản này đáp ứng tất cả các nhóm Markush được sử dụng như trong yêu cầu bảo hộ đính kèm.

Các phương án nhất định theo sáng chế được mô tả ở đây bao gồm phương thức tốt nhất đã được biết bởi các tác giả nhằm thực hiện sáng chế. Tất nhiên, các cải biến về các phương án được mô tả ở đây sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này khi đọc phần mô tả nêu trên. Tác giả sáng chế mong đợi rằng người có hiểu biết trung bình sử dụng những cải biến như vậy khi thích hợp và các tác giả có ý để sáng chế được thực hiện theo cách khác ngoài những cách được mô tả cụ thể ở đây. Do đó, sáng chế còn bao gồm tất cả các cải tiến và các phương án tương đương với đối tượng được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo bản mô tả theo luật định. Tất nhiên, những dạng kết hợp bất kỳ của các dấu hiệu được mô tả ở trên trong các dạng cải biến có thể có của nó đều thuộc phạm vi của sáng chế trừ khi có quy định khác.

Các phương án cụ thể được bộc lộ ở đây có thể bị giới hạn thêm trong yêu cầu bảo hộ bằng cách sử dụng các từ ngữ như bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm. Khi được sử dụng trong các điểm yêu cầu bảo hộ, dù là khi được nộp hay được bổ sung đối với mỗi lần sửa đổi, thuật ngữ chuyển tiếp "gồm có" không bao gồm dấu hiệu, bước bất kỳ hoặc thành phần bất kỳ không nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ đó. Thuật ngữ chuyển tiếp "về cơ bản gồm có" giới hạn phạm vi của yêu cầu bảo hộ ở các vật liệu hoặc các bước cụ thể và điều đó không ảnh hưởng cốt yếu đến (các) đặc điểm mới và

cơ bản. Các phương án của sáng chế được yêu cầu bảo hộ như vậy thì vốn hoặc rõ ràng được mô tả và được thực hiện ở đây.

Hơn nữa, sáng chế này có viện dẫn đến các bằng sáng chế và các công bố đã được in. Mỗi tài tài liệu tham khảo và các công bố đã được in được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Tóm lại, cần hiểu là các phương án theo sáng chế được mô tả ở đây nhằm minh họa nguyên tắc của sáng chế. Các cải biến khác có thể được thực hiện trong phạm vi của sáng chế. Vì vậy, bằng cách ví dụ, nhưng không làm hạn chế phạm vi của sáng chế, các dạng thay thế theo sáng chế có thể được sử dụng theo những hướng dẫn được bộc lộ ở đây. Theo đó, sáng chế không bị giới hạn ở những phương án được trình bày và mô tả cụ thể ở trên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát hiện hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a. xử lý tế bào từ dòng tế bào đã được thiết lập bằng mẫu chứa endopeptidaza tái hướng đích, trong đó tế bào từ dòng tế bào đã được thiết lập này mẫn cảm với hoạt tính endopeptidaza tái hướng đích của endopeptidaza tái hướng đích;

b. phân lập từ tế bào đã xử lý thành phần SNAP-25 (protein liên kết synaptosom có kích thước 25 kDa) chứa sản phẩm SNAP-25 phân cắt có đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A (độc tố botulinum typ huyết thanh A);

c. cho thành phần SNAP-25 này tiếp xúc với kháng thể α-SNAP-25 được liên kết với giá thể pha rắn,

trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop chứa đầu carboxyl tại gốc P_1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt; và

d. phát hiện sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể chứa kháng thể α-SNAP-25 và sản phẩm SNAP-25 phân cắt;

trong đó việc phát hiện phức kháng nguyên - kháng thể chỉ ra hoạt tính của endopeptidaza tái hướng đích;

trong đó kháng thể α-SNAP-25 này liên kết với eptiop chứa đầu carboxyl tại gốc P_1 từ liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm SNAP-25 phân cắt;

trong đó kháng thể α-SNAP-25 có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được mã hóa bằng trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 hoặc SEQ ID NO: 81 hoặc trình tự axit nucleic mà có mức độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 hoặc SEQ ID NO: 81;

và trong đó kháng thể α-SNAP-25 này có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được mã hóa bằng trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 hoặc SEQ ID NO: 91 hoặc trình tự axit nucleic có mức độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 hoặc SEQ ID NO: 91.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng thể α-SNAP-25 có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80 và SEQ ID NO: 82; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 và SEQ ID NO: 92.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó sản phẩm SNAP-25 phân cắt là $SNAP\text{-}25_{197}$.

4. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó sự có mặt của phức kháng nguyên-kháng thể phát hiện được bằng cách sử dụng ELISA kiểu bánh kẹp.

5. Kháng thể α-SNAP-25 liên kết với epitop chứa đầu carboxyl tại gốc P_1 từ liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A từ sản phẩm phân cắt SNAP-25; trong đó kháng thể α-SNAP-25 có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được mã hóa bằng trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 hoặc SEQ ID NO: 81 hoặc trình tự axit nucleic mà có mức độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 hoặc SEQ ID NO: 81;

và trong đó kháng thể α-SNAP-25 có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được mã hóa bằng trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 hoặc SEQ ID NO: 91 hoặc trình tự axit nucleic mà có mức độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 hoặc SEQ ID NO: 91.

6. Kháng thể theo điểm 5, trong đó kháng thể α-SNAP-25 có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80 và SEQ ID NO: 82; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 và SEQ ID NO: 92.

7. Kháng thể theo điểm 5 hoặc 6, trong đó sản phẩm SNAP-25 phân cắt là $SNAP\text{-}25_{197}$.

8. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó kháng thể α-SNAP-25 là kháng thể được tạo ra từ tế bào lai 1D3B8, kháng thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 72 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 84.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể α-SNAP-25 là kháng thể được tạo ra từ tế bào lai 1D3B8, kháng thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 72 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 84.

10. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó kháng thể α-SNAP-25 là kháng thể được tạo ra bằng tế bào lai 2E2A6, kháng thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 88.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể α-SNAP-25 là kháng thể được tạo ra bằng tế bào lai 2E2A6, kháng thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 88.

12. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó kháng thể α-SNAP-25 là kháng thể được tạo ra bằng tế bào lai 3C1A5, kháng thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 78 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 90.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể α-SNAP-25 là kháng thể được tạo ra bằng tế bào lai 3C1A5, kháng thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 78 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 90.

14. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó kháng thể α-SNAP-25 là kháng thể được tạo ra bằng tế bào lai 3C3E2, kháng thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 80 hoặc SEQ ID NO: 82 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 92.

15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể α-SNAP-25 là kháng thể được tạo ra bằng tế bào lai 3C3E2, kháng thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 80 hoặc SEQ ID NO: 82 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 92.

FIG. 1A.

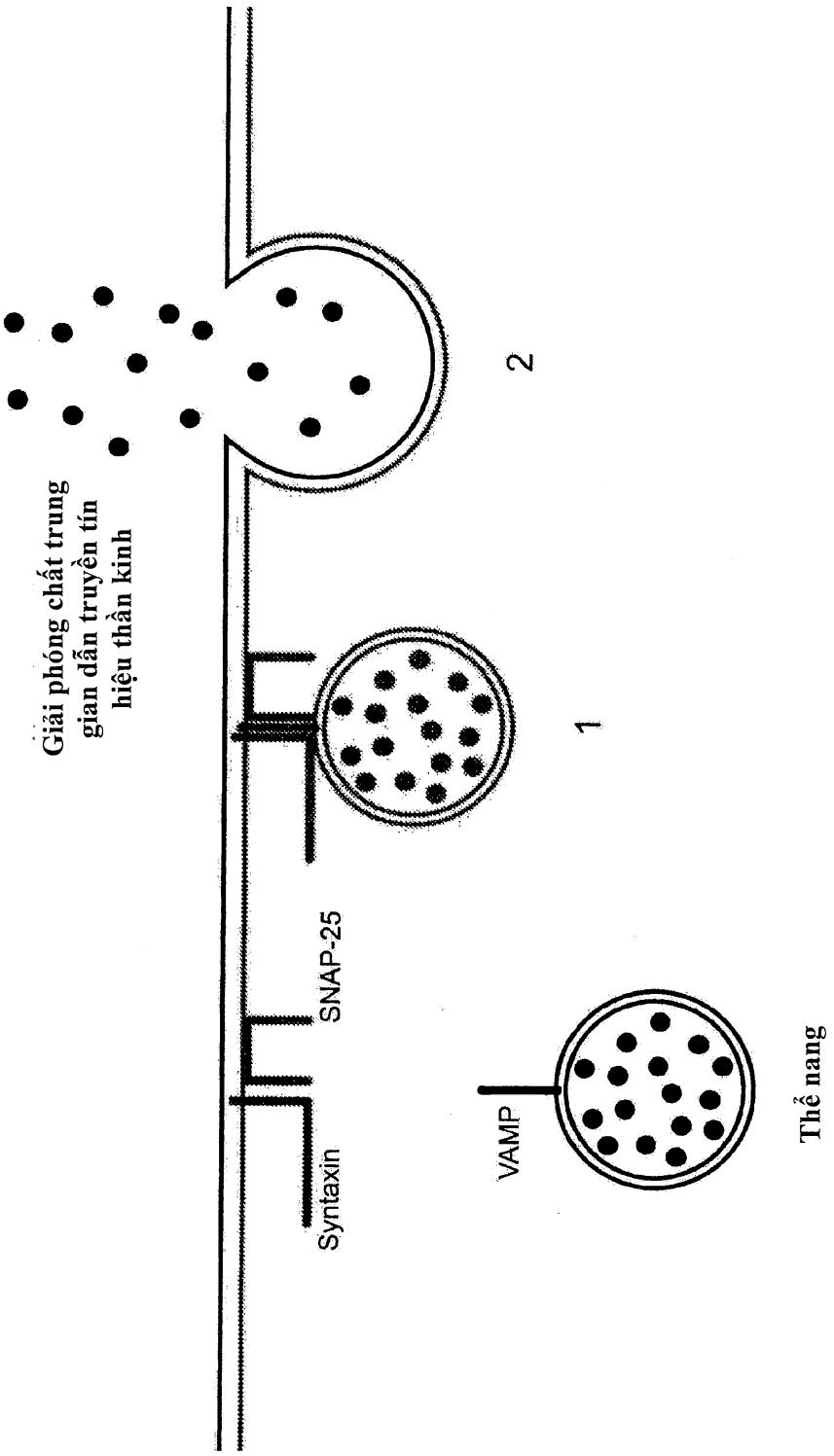

Giải phóng chất trung gian dẫn truyền tín hiệu thần kinh
2
1
SNAP-25
Syntaxin
VAMP
Thể nang

FIG. 1B.

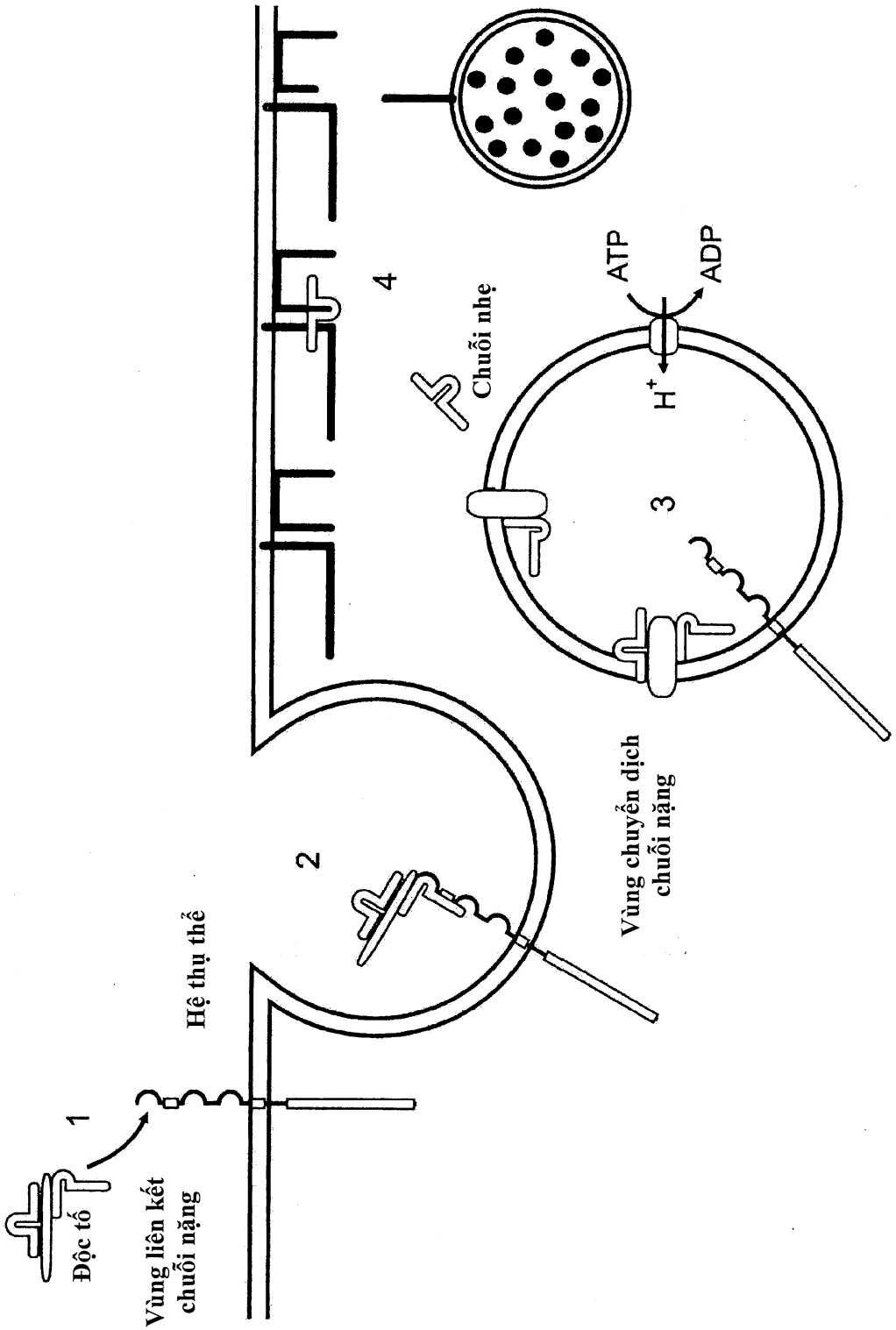

1
Độc tố
Vùng liên kết chuỗi nặng
Hệ thụ thể
2
Vùng chuyển dịch chuỗi nặng
4
Chuỗi nhẹ
ATP
ADP
H+
3

FIG. 2.

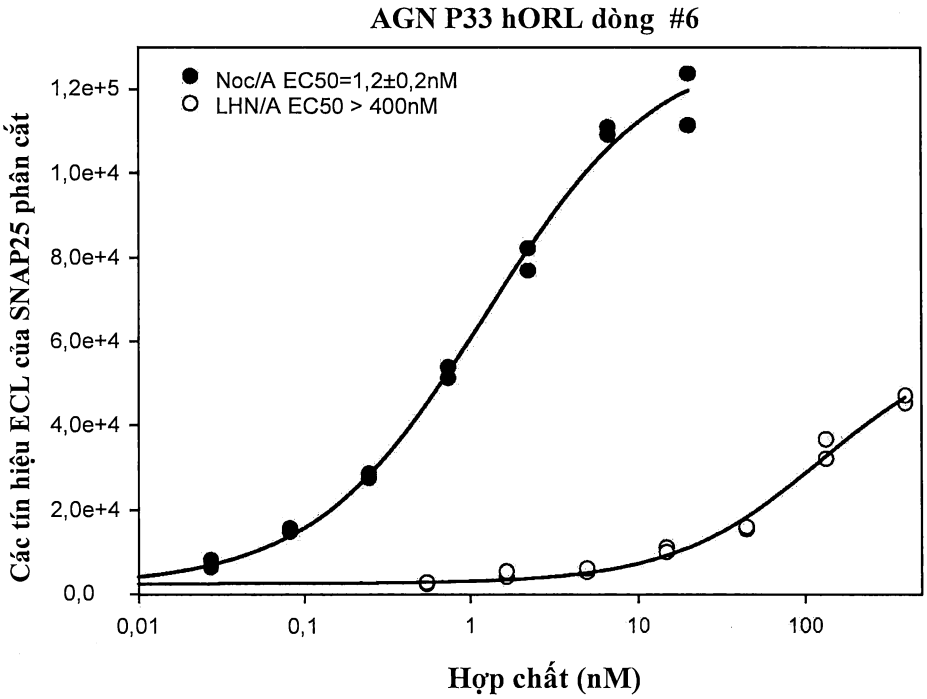

AGN P33 hORL dòng #6
Noc/A EC50=1,2±0,2nM
LHN/A EC50 > 400nM
Các tín hiệu ECL của SNAP25 phân cắt
1,2e+5
1,0e+4
8,0e+4
6,0e+4
4,0e+4
2,0e+4
0,0
0,01
0,1
1
10
100
Hợp chất (nM)

FIG. 3.

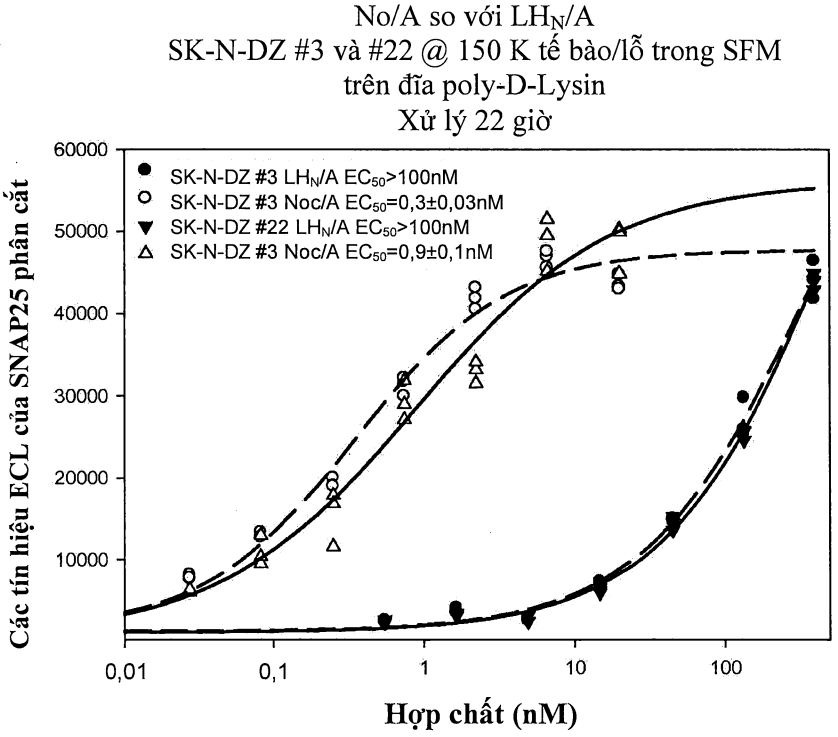

No/A so với LHN/A
SK-N-DZ #3 và #22 @ 150 K tế bào/lỗ trong SFM
trên đĩa poly-D-Lysin
Xử lý 22 giờ
SK-N-DZ #3 LHN/A EC50>100nM
SK-N-DZ #3 Noc/A EC50=0,3±0,03nM
SK-N-DZ #22 LHN/A EC50>100nM
SK-N-DZ #3 Noc/A EC50=0,9±0,1nM
Các tín hiệu ECL của SNAP25 phân cắt
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0,01
0,1
1
10
100
Hợp chất (nM)

FIG. 4.

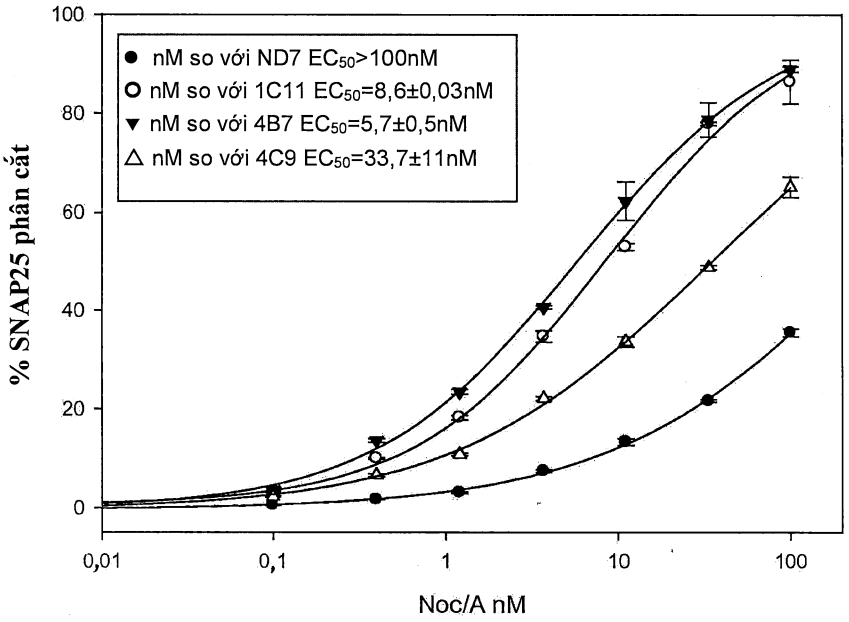

100
80
60
40
20
0
% SNAP25 phân cắt
● nM so với ND7 EC50>100nM
○ nM so với 1C11 EC50=8,6±0,03nM
▼ nM so với 4B7 EC50=5,7±0,5nM
△ nM so với 4C9 EC50=33,7±11nM
0,01
0,1
1
10
100
Noc/A nM

FIG. 5.

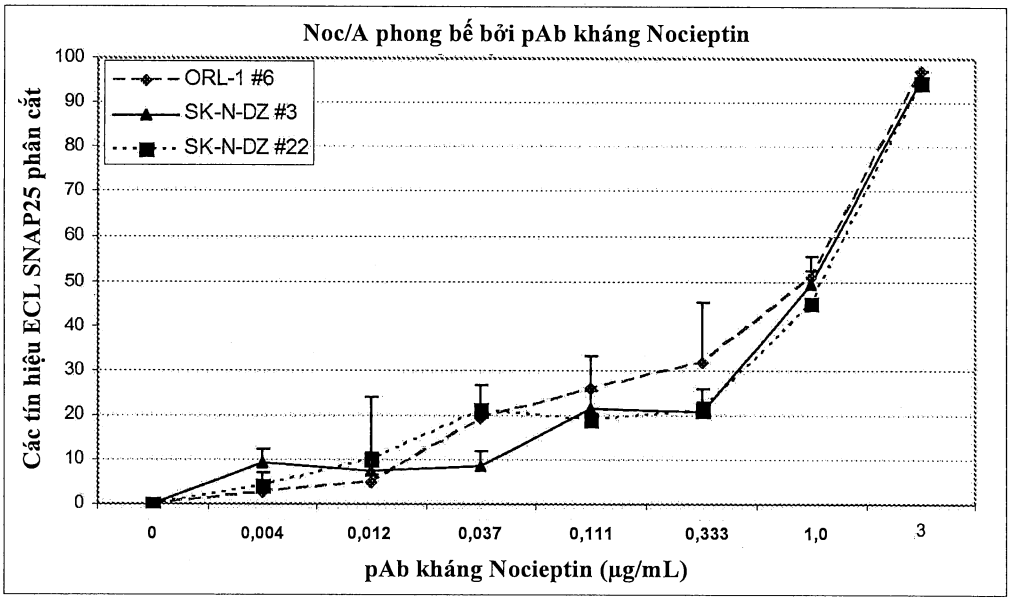

Noc/A phong bế bởi pAb kháng Nocieptin
Các tín hiệu ECL SNAP25 phân cắt
ORL-1 #6
SK-N-DZ #3
SK-N-DZ #22
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0,004
0,012
0,037
0,111
0,333
1,0
3
pAb kháng Nocieptin (µg/mL)

FIG. 6.

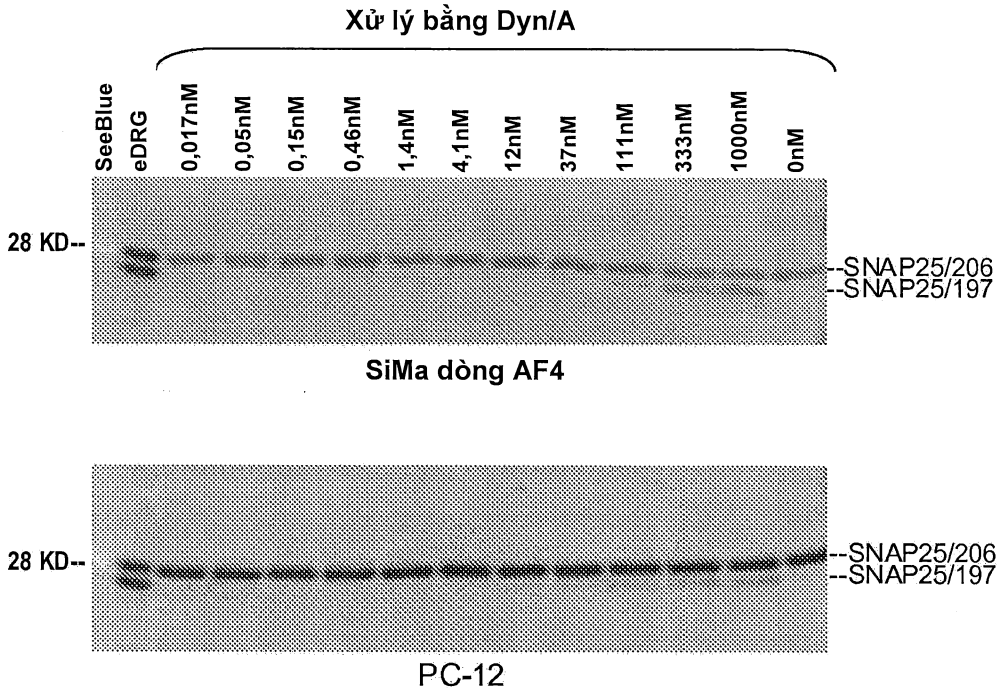

Xử lý bằng Dyn/A
SeeBlue
eDRG
0,017nM
0,05nM
0,15nM
0,46nM
1,4nM
4,1nM
12nM
37nM
111nM
333nM
1000nM
0nM
28 KD--
--SNAP25/206
--SNAP25/197
SiMa dòng AF4
28 KD--
--SNAP25/206
--SNAP25/197
PC-12

FIG. 7A.

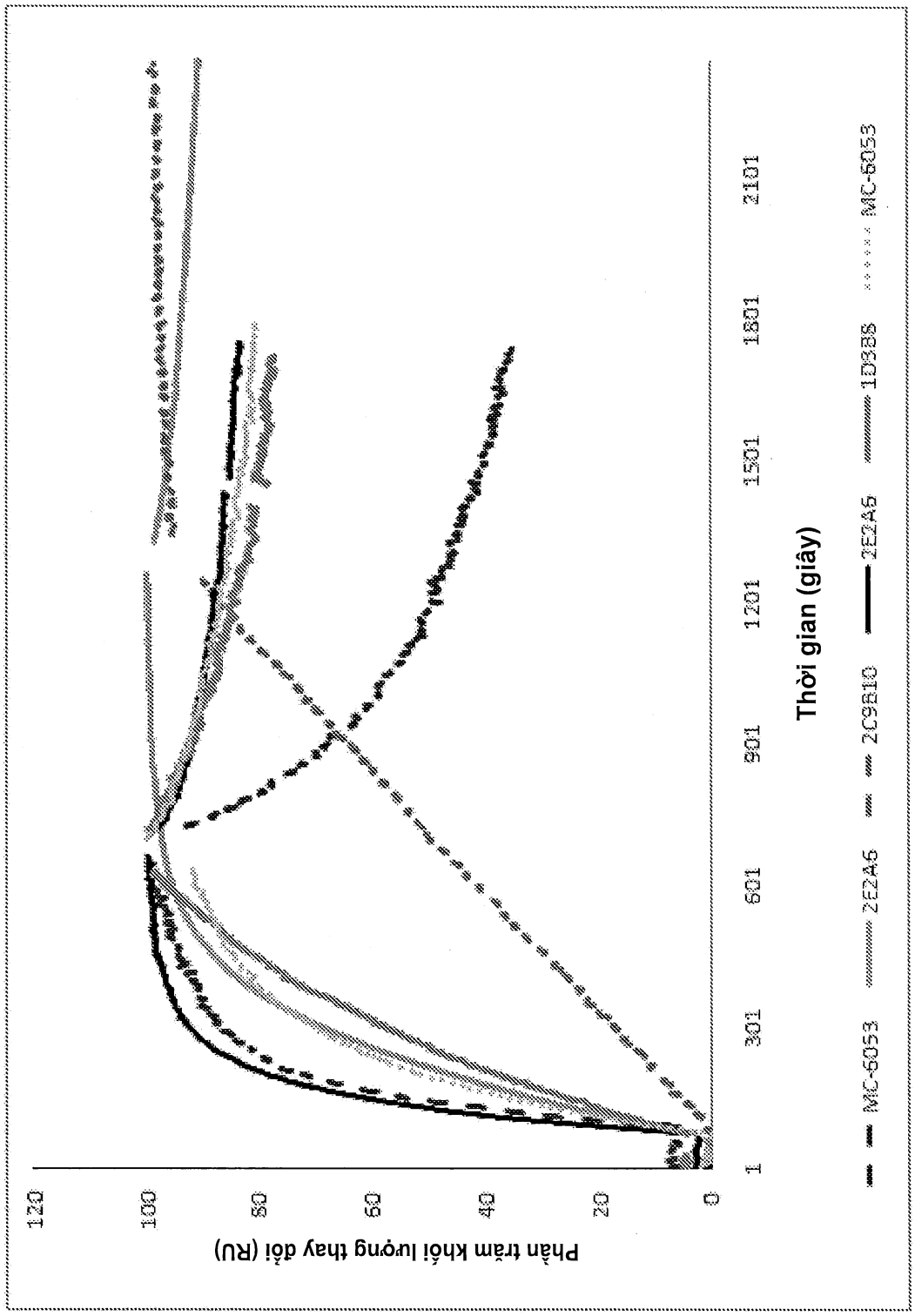
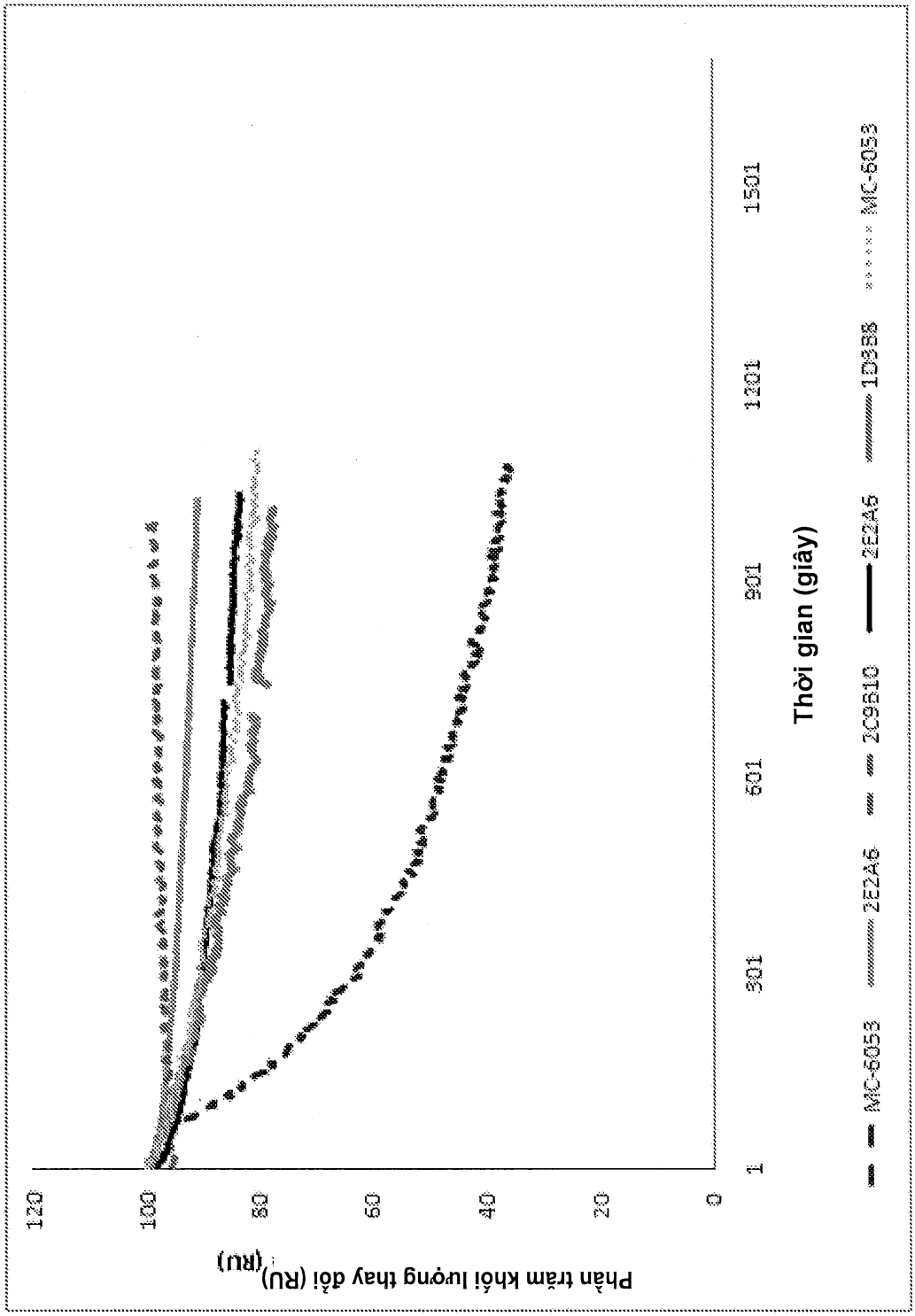

Phần trăm khối lượng thay đổi (RU)
120
100
80
60
40
20
0
1
301
601
901
1201
1501
1801
2101
Thời gian (giây)
MC-6053
2E2A6
2C9B10
1E2A6
1D3B8
MC-6053

FIG. 7B.


Phần trăm khối lượng thay đổi (RU)
120
100
80
60
40
20
0
1
301
601
901
1101
1501
Thời gian (giây)
MC-6053
2E2A6
2C9B10
2E2A6
1D3B8
MC-6053

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Wang, Joanne
Zhu, Hong
Hodges, D. Dianne
Fernandez-Salas, Ester

<120> PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN HOẠT TÍNH ENDOPEPTIDAZA TÁI HƯỚNG ĐÍCH VÀ KHÁNG THỂ ALPHA-SNAP-25 DÙNG TRONG PHƯƠNG PHÁP NÀY

<130> 18496 (BOT)

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

<160> 153

<170> FastSEQ cho Windows phiên bản 4.0

<210> 1
<211> 903
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Endopeptidaza tái hướng đích

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

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

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

<210> 2
<211> 908
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Endopeptidaza tái hướng đích

```
<400> 2
Met Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro
 1               5                  10                  15
Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln
            20                  25                  30
Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile
        35                  40                  45
Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro
    50                  55                  60
Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr
```

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

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

<210> 3

<211> 906
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Endopeptidaza tái hướng đích

<400> 3
Ile Ser Glu Phe Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr
 1   5   10   15
Lys Asp Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn
            20   25   30
Ala Gly Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile
        35   40   45
Trp Val Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp
    50   55   60
Leu Asn Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp
65   70   75   80
Ser Thr Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly
                85   90   95
Val Thr Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met
            100   105   110
Leu Leu Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr
        115   120   125
Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile
    130   135   140
Gln Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile
145   150   155   160
Gly Pro Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His
                165   170   175
Glu Val Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile
            180   185   190
Arg Phe Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val
        195   200   205
Asp Thr Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala
    210   215   220
Val Thr Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly
225   230   235   240
Ile Ala Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr
                245   250   255
Tyr Glu Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe
            260   265   270
Gly Gly His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe
        275   280   285
Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn
    290   295   300
Lys Ala Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys
305   310   315   320
Asn Val Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys
                325   330   335
Phe Ser Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr
            340   345   350
Glu Ile Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn
        355   360   365

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

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

<210> 4
<211> 919
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Endopeptidaza tái hướng đích

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

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

<400> 5

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

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


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

<400> 6
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1               5                  10                  15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20                  25                  30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35                  40                  45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50                  55                  60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65                  70                  75                  80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85                  90                  95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100                 105                 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115                 120                 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130                 135                 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145                 150                 155                 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205


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

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

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

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

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

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

<400> 9

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

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

<400> 10

```
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1               5                  10                  15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20                  25                  30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
```

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

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

<400> 11

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

195 200 205

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

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

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

<400> 13
Met Ala Asp Glu Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Thr Asp Met Gln Ala
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Gly Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65 70 75 80
Leu Gly Asn Leu Cys Gly Leu Cys Pro Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys

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


<210> 14
<211> 204
<212> PRT
<213> Danio rerio

<400> 14
Met Ala Glu Asp Ser Asp Met Arg Asn Glu Leu Ala Asp Met Gln Gln
 1               5                  10                  15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20                  25                  30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35                  40                  45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50                  55                  60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn Leu Asn Asp
65                  70                  75                  80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys Asn Lys Met Lys
                85                  90                  95
Ser Gly Ala Ser Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala
            100                 105                 110
Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser
        115                 120                 125
Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met
    130                 135                 140
Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu Arg His
145                 150                 155                 160
Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile
                165                 170                 175
Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu
            180                 185                 190
Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200


<210> 15
<211> 203
<212> PRT
```

<213> Danio rerio

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

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

<400> 16
Met Glu Asn Ser Val Glu Asn Ser Met Asp Pro Arg Ser Glu Gln Glu
 1   5   10   15
Glu Met Gln Arg Cys Ala Asp Gln Ile Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser
            20   25   30
Thr Arg Arg Met Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile
        35   40   45
Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile
    50   55   60
Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys
65   70   75   80
Asn Leu Ser Asp Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys
                85   90   95
Asn Lys Leu Lys Asn Phe Glu Ala Gly Gly Ala Tyr Lys Lys Val Trp
            100   105   110
Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Met
        115   120   125
Asp Asp Arg Glu Gln Met Ala Met Ser Gly Gly Tyr Ile Arg Arg Ile

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

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

<400> 17

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

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

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

<400> 20

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

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

<400> 21

```
Met Ala Lys Asp Ile Lys Pro Lys Pro Ala Asn Gly Arg Asp Ser Pro
 1               5                  10                  15
Thr Asp Leu Gln Glu Ile Gln Leu Gln Met Asn Ala Ile Thr Asp Asp
```

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

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

<400> 22

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

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

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

<400> 23

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

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

<400> 24

```
Met Ser Gly Asp Asp Asp Ile Pro Glu Gly Leu Glu Ala Ile Asn Leu
 1               5                  10                  15
Lys Met Asn Ala Thr Thr Asp Asp Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
```

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


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

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

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

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

<400> 26

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

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

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

<400> 27

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

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

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

<400> 28

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

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

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

<400> 29

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

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


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

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

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

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

<400> 31

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

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

<210> 32
<211> 5
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại P1

<400> 32
Asp Glu Ala Asn Gln
 1   5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1
      của liên kết phân tách vị trí phân cắt BoNT/A

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

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại P1
      của liên kết phân tách tại vị trí phân cắt BoNT/A

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

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1
      của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt của BoNT/A

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

<210> 36
<211> 9

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1
của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt BoNT/A

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

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại P1

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

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1
của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt 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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1
của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt 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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do được carboxyl hóa tại gốc P1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt BoNT/A

<221> Vị trí
<222> (13)...(13)
<223> Glutamin được carboxyl hóa

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1

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

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1
      của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt BoNT/A

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

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1
      của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt BoNT/A

<400> 43

Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1
của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt BoNT/A

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

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1
của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt BoNT/A

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

<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự do tại gốc P1
của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt 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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên SNAP-25 có đầu carboxyl tự đo được carboxyl hóa

tại gốc P1 của liên kết có thể cắt dễ dàng tại vị trí phân cắt BoNT/A

<221> SITE
<222> (13)...(13)
<223> Lysin được carboxyl hóa

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên 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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng nguyên 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> Trình tự nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit 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> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc biểu hiện pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC.

<400> 53

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgtatc 240
catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 360
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 420
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 660
tcgctattac catggtgatg 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
tccgcgggcc accatggagg gcccggttac cggtaccgga tccagatatc tgggcggccg 1020
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatggtgat gttaacggcc acaagttctc 1140
tgtcagtgga gagggtgaag gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gacttttca agagtgccat 1320
gcccgaaggt tatgtacagg aaaggaccat cttcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380
acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac ccttgttaat agaatcgagt taaaaggtat 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagacccg 1560
ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620
tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaat ctgccctttc 1680
gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagtttgtaa cagctgctgg 1740
gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga ggcggaggtg gacctttgt 1800
taataaacaa tttaattata aagatcctgt aaatggtgtt gatattgctt atataaaaat 1860
tccaaatgca ggacaaatgc aaccagtaaa agcttttaaa attcataata aaatatgggt 1920
tattccagaa agagatacat ttacaaatcc tgaagaagga gatttaaatc caccaccaga 1980
agcaaaacaa gttccagttt catattatga ttcaacatat ttaagtacag ataatgaaaa 2040
agataattat ttaaagggag ttacaaaatt atttgagaga atttattcaa ctgatcttgg 2100
aagaatgttg ttaacatcaa tagtaagggg aataccattt tggggtggaa gtacaataga 2160
tacagaatta aaagttattg 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 gcaaatttgc tacagatcca gcagtaacat tagcacatga 2460
acttatacat gctggacata gattatatgg aatagcaatt aatccaaata gggtttttaa 2520
agtaaatact aatgcctatt atgaaatgag tgggttagaa gtaagctttg aggaacttag 2580
aacatttggg ggacatgatg caaagtttat agatagttta caggaaaacg aatttcgtct 2640
atattattat aataagttta aagatatagc aagtacactt aataaagcta aatcaatagt 2700
aggtactact gcttcattac agtatatgaa aaatgttttt aaagagaaat atctcctatc 2760
tgaagataca tctggaaaat tttcggtaga taaattaaaa tttgataagt tatacaaaat 2820
gttaacagag atttacacag aggataattt tgttaagttt tttaaagtac ttaacagaaa 2880
aacatatttg aattttgata aagccgtatt taagataaat atagtaccta aggtaaatta 2940
cacaatatat gatggattta atttaagaaa tacaaattta gcagcaaact ttaatggtca 3000
aaatacagaa attaataata tgaattttac taaactaaaa aattttactg gattgtttga 3060
attttataag ttgctatgtg taagagggat aatcacttcg aaatgaacgc gttggcccta 3120
ttctatagtg tcacctaaat gctagagctc gctgatcagc ctcgactgtg ccttctagtt 3180
gccagccatc tgttgtttgc ccctcccccg tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc 3240

```
ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 3300
ctattctggg gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca 3360
ggcatgctgg ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc agctggggct 3420
ctagggggta tccccacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta 3480
cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc gctttcttcc 3540
cttccttttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg ggcatcccctt 3600
tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg 3660
gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 3720
cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggtct 3780
attcttttga tttataaggg attttgggga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 3840
tttaacaaaa atttaacgcg aattaattct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtggaaa 3900
gtccccaggc tccccaggca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa 3960
ccaggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 4020
attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccat cccgccccta actccgccca 4080
gttccgccca ttctccgccc catggctgac taatttttt tatttatgca gaggccgagg 4140
ccgcctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttttgga ggcctaggct 4200
tttgcaaaaa gctcccggga gcttgtatat ccattttcgg atctgatcaa gagacaggat 4260
gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg 4320
tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg 4380
tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg 4440
ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc 4500
cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg 4560
aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca 4620
tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc 4680
aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg 4740
atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg 4800
cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata 4860
tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 4920
accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat 4980
gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcatcgcct 5040
tctatcgcct tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca 5100
agcgacgccc aacctgccat cacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt 5160
gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat 5220
gctggagttc ttcgcccacc ccaacttgtt tattgcagct tataatggtt acaaataaag 5280
caatagcatc acaaatttca caaataaagc attttttttca ctgcattcta gttgtggttt 5340
gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataccg tcgacctcta gctagagctt 5400
ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 5460
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact 5520
cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 5580
gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc 5640
ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 5700
ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 5760
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 5820
taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 5880
cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 5940
tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 6000
gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 6060
gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 6120
tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 6180
gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta 6240
cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 6300
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 6360
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 6420
ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggtcatgag 6480
```

```
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat 6540
ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 6600
tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 6660
aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc 6720
acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 6780
aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag 6840
agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt 6900
ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 6960
agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 7020
tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 7080
tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 7140
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 7200
taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg 7260
aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc 7320
caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag 7380
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7440
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 7500
tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 7560
acctgacgtc                                                       7570
```

<210> 54
<211> 682
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ GFP-BoNT/A.

<400> 54

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

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

```
    610                 615                 620
Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn
625                 630                 635                 640
Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn
                645                 650                 655
Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu
            660                 665                 670
Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys
        675                 680
```

<210> 55
<211> 6259
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc biểu hiện pQBI-25/GFP.

<400> 55

```
gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgtatc 240
catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 360
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 420
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 660
tcgctattac catggtgatg 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
tccgcgggcc accatggagg gcccggttac cggtaccgga tccagatatc tgggcggccg 1020
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatggtgat gttaacggcc acaagttctc 1140
tgtcagtgga gagggtgaag gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gacttttca agagtgccat 1320
gcccgaaggt tatgtacagg aaaggaccat cttcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380
acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac ccttgttaat agaatcgagt taaaaggtat 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagacccg 1560
ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620
tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaat ctgccctttc 1680
gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagtttgtaa cagctgctgg 1740
gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga ggcggaggtg gatgaacgcg 1800
ttggccctat tctatagtgt cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc 1860
cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctcccccgt gccttccttg accctggaag 1920
gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcatcgcat tgtctgagta 1980
ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caaggggggag gattgggaag 2040
```

acaatagcag gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca 2100
gctggggctc taggggtat ccccacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg 2160
tggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgccc gctcctttcg 2220
ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg ccggctttcc ccgtcaagct ctaaatcggg 2280
gcatcccttt agggttccga tttagtgctt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt 2340
agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt 2400
tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta 2460
tctcggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttggggat ttcggcctat tggttaaaaa 2520
atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attaattctg tggaatgtgt gtcagttagg 2580
gtgtggaaag tccccaggct ccccaggcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 2640
agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 2700
tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc ccgccctaa 2760
ctccgcccag ttccgcccat tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 2820
aggccgaggc cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 2880
gcctaggctt ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatatc cattttcgga tctgatcaag 2940
agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3000
ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3060
atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc 3120
tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3180
cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3240
tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag 3300
tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgct tgatccggct acctgcccat 3360
tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 3420
tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3480
ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct 3540
tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg 3600
gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg tgatattgct gaagagcttg 3660
gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc 3720
gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 3780
gaccgaccaa gcgacgccca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 3840
tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg 3900
ggatctcatg ctggagttct tcgcccaccc caacttgttt attgcagctt ataatggtta 3960
caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca ttttttttcac tgcattctag 4020
ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt cgacctctag 4080
ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac 4140
aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaatgagt 4200
gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc 4260
gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg 4320
ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt 4380
atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 4440
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 4500
gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag 4560
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt 4620
gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg 4680
aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg 4740
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg 4800
taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 4860
tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtggtg 4920
gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt 4980
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg 5040
tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 5100
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt 5160
ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt 5220
taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 5280

```
tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt 5340
cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgctg caatgatacc 5400
gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 5460
cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg 5520
ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg ccattgctac 5580
aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 5640
atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc 5700
tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact 5760
gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 5820
aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 5880
acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 5940
ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac 6000
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 6060
aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact 6120
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 6180
atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 6240
aaaagtgcca cctgacgtc                                            6259
```

<210> 56
<211> 245
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin 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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng đệm linh động đệm G

<400> 57
Gly Gly Gly Gly
 1

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng đệm linh động đệm G

<400> 58
Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng đệm linh động đệm A

<400> 59
Ala Ala Ala Ala
 1

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng đệm linh động đệm A

<400> 60
Ala Ala Ala Ala Val
 1   5

<210> 61
<211> 3359
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 61
gtcgaggtgc tcatagtgga gccctggctc ccgggcggac ggagccgcac ggtagtagat 60
gggggtgtgg ccgtggcccc cgactctgct cggcggggcc gttcctgctt tgccatccgt 120
gtgggacttc cacgacagtg gaggcacgag agctgggccc catatgctgc ttgcccagct 180
tgggaaagag gaggctgctg caaaggaccg atcggcggct tcgggctgcc ggctcactcg 240
gctgctgcgt ctggtctggc gtctgctgag aagatcctct tctaccctgc tctgcacctg 300
tgctcgactg ccagccggct gagggcgggg gtctccacgg tggtcccagc tcccaaggag 360
gttgcagaag taccgtacag agtggatttg cagggcagtg gcatggagcc cctcttcccc 420
gcgccgttct gggaggttat ctacggcagc caccttcagg gcaacctgtc cctcctgagc 480
cccaaccaca gtctgctgcc cccgcatctg ctgctcaatg ccagccacgg cgccttcctg 540
cccctcgggc tcaaggtcac catcgtgggg ctctacctgg ccgtgtgtgt cggagggctc 600
ctggggaact gccttgtcat gtacgtcatc ctcaggcaca ccaaaatgaa gacagccacc 660
aatatttaca tctttaacct ggccctggcc gacactctgg tcctgctgac gctgcccttc 720
cagggcacgg acatcctcct gggcttctgg ccgtttggga atgcgctgtg caagacagtc 780
attgccattg actactacaa catgttcacc agcaccttca ccctaactgc catgagtgtg 840
gatcgctatg tagccatctg ccaccccatc cgtgccctcg acgtccgcac gtccagcaaa 900
gcccaggctg tcaatgtggc catctgggcc ctggcctctg ttgtcggtgt tcccgttgcc 960
atcatgggct cggcacaggt cgaggatgaa gagatcgagt gcctggtgga gatccctacc 1020
cctcaggatt actggggccc ggtgtttgcc atctgcatct tcctcttctc cttcatcgtc 1080
cccgtgctcg tcatctctgt ctgctacagc ctcatgatcc ggcggctccg tggagtccgc 1140
ctgctctcgg gctcccgaga gaaggaccgg aacctgcggc gcatcactcg gctggtgctg 1200
gtggtagtgg ctgtgttcgt gggctgctgg acgcctgtcc aggtcttcgt gctggcccaa 1260
gggctggggg ttcagccgag cagcgagact gccgtggcca ttctgcgctt ctgcacggcc 1320
ctgggctacg tcaacagctg cctcaacccc atcctctacg ccttcctgga tgagaacttc 1380
aaggcctgct tccgcaagtt ctgctgtgca tctgccctgc gccgggacgt gcaggtgtct 1440
gaccgcgtgc gcagcattgc caaggacgtg gccctggcct gcaagacctc tgagacggta 1500
ccgcggcccg catgactagg cgtggacctg cccatggtgc ctgtcagccc gcagagccca 1560
tctacgccca acacagagct cacacaggtc actgctctct aggcggacac accctgggcc 1620
ctgagcatcc agagcctggg atgggctttt ccctgtgggc cagggatgct cggtcccaga 1680
ggaggaccta gtgacatcat gggacaggtc aaagcattag ggccacctcc atggccccag 1740
acagactaaa gctgccctcc tggtgcaggg ccgaggggac acaaggacct acctggaagc 1800
agctgacatg ctggtggacg gccgtgactg gagcccgtgc ccctccctcc ccgtgcttca 1860
tgtgactctt ggcctctctg ctgctgcgtt ggcagaaccc tgggtgggca ggcacccgga 1920
ggaggagcag cagctgtgtc atcctgtgcc ccccatgtgc tgtgtgctgt ttgcatggca 1980
gggctccagc tgccttcagc cctgtgacgt ctcctcaggg cagctggaca ggcttggcac 2040
tgcccgggaa gtgcagcagg cagcttttct ttggggtggg acttgccctg agcttggagc 2100
tgccacctgg aggacttgcc tgttccgact ccacctgtgc agccggggcc accccaggag 2160
aaagtgtcca ggtgggggct ggcagtccct ggctgcagac cccgagctgg ccctgggcca 2220
gccgcacctc tgaaggtttt ctgtgtgctg cacggtgcag gcctcatccc tgactgcagc 2280
ttgactctgg gcccaacccc catttccctt caggagacca gcgagaggcc ctggcccatt 2340
ccctccagcg gtgcaatgaa ctatcatgct gtggaccgtc aacccagccc tgcttctcag 2400
tgtggggcag gtgtctcagg acgaaggcgc cgcgtgacca catgggcagc tctgttcaca 2460

aagtggaggc ctcgttttcc tggtcttgac tgctctgttt gggtgggaga agattctctg 2520
ggggtcccca catcctccca aggctccct cacagcctct cctttgcttg aagccagagg 2580
tcagtggccg tgctgtgttg cgggggaagc tgtgtggaag gagaagctgg tggccacagc 2640
agagtcctgc tctggggacg cctgcttcat ttacaagcct caagatggct ctgtgtaggg 2700
cctgagcttg ctgcccaacg ggaggatggc ttcacagcag agccagcatg aggggtgggg 2760
cctggcaggg cttgcttgag ccaaactgca aaggctgtgg tggctgtgag gacactgcgg 2820
gggttggggg gggggcgtct gtacctcagg ggatgccccg ctgtggtcac ccagagaatc 2880
acccttcctg gtctacagat ggaagctgca ggttggtgac tttgcaaatg cacttcctac 2940
agatgaacta ttaaaagacc tgcaacattg aaaaaactca ttttttccac caaaaccttg 3000
gccaggtaac ctaccttagg cacctgcaaa gaacaggaag tgatggctgt ctcgcaacag 3060
agcctgggct gctcctcctg ctctggggag tctaggccgt ggggactgtt ctggggaggc 3120
tcatgctgtc tccatgacgt ctgtggcagg agtccctgag gacgggagct gcctagctac 3180
agttttcttg ccaaggcgag gtgttttgtg aatctgtgct gatgtaatgt gcaccttcac 3240
gtatttatgc atgtggcaag cgttacttcc tgtgcacgta gccagccctg ggtctgtctc 3300
tggggtaatg aaaaaggacc ctaataaaca cctgctcact ggctgggtat tcttcgtaa 3359

<210> 62
<211> 1134
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 62
ttgcagggca gtggcatgga gcccctcttc cccgcgccgt tctgggaggt tatctacggc 60
agccaccttc agggcaacct gtcctcctg agccccaacc acagtctgct gcccccgcat 120
ctgctgctca atgccagcca cggcgccttc ctgcccctcg ggctcaaggt caccatcgtg 180
gggctctacc tggccgtgtg tgtcggaggg ctcctgggga actgccttgt catgcacacc 240
aaaatgaaga cagccaccaa tatttacatc tttaacctgg ccctggccga cactctggtc 300
ctgctgacgc tgcccttcca gggcacggac atcctcctgg gcttctggcc gtttgggaat 360
gcgctgtgca agacagtcat tgccattgac tactacaaca tgttcaccag caccttcacc 420
ctaactgcca tgagtgtgga tcgctatgta gccatctgcc accccatccg tgccctcgac 480
gtccgcacgt ccagcaaagc ccaggctgtc aatgtggcca tctgggccct ggcctctgtt 540
gtcggtgttc ccgttgccat catgggctcg gcacaggtcg aggatgaaga gatcgagtgc 600
ctggtggaga tccctacccc tcaggattac tggggcccgg tgtttgccat ctgcatcttc 660
ctcttctcct tcatcgtccc cgtgctcgtc atctctgtct gctacagcct catgatccgg 720
cggctccgtg gagtccgcct gctctcgggc tcccgagaga aggaccggaa cctgcggcgc 780
atcactcggc tggtgctggt ggtagtggct gtgttcgtgg gctgctggac gcctgtccag 840
gtcttcgtgc tggcccaagg gctgggggtt cagccgagca gcgagactgc cgtggccatt 900
ctgcgcttct gcacggccct gggctacgtc aacagctgcc tcaaccccat cctctacgcc 960
ttcctggatg agaacttcaa ggcctgcttc cgcaagttct gctgtgcatc tgccctgcgc 1020
cgggacgtgc aggtgtctga ccgcgtgcgc agcattgcca aggacgtggc cctggcctgc 1080
aagacctctg agacggtacc gcggcccgca tgactaggcg tggacctgcc catg 1134

<210> 63
<211> 1774
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 63
ccgaggagcc tgcggctgct cctggctcac agcgctccgg gcgaggagag cgggcggacg 60
ccgggggctg ggccggtgcg ggcggcgagg caggcggacg aggcgcagag acagcggggc 120
ggccggggcg cggcagccgg cggcgtcggg gccgcggcct ctgccttgcc gctcccctcg 180
cgtcggatcc ccgcgcccag ggcgcacggt ggagagggac gcggcggagc cggccggcag 240
ccatggaacc ggcccccctcc gccggcgccg agctgcagcc cccgctcttc gccaacgcct 300
cggacgccta ccctagcgcc tgccccagcg ctggcgccaa tgcgtcgggg ccgccaggcg 360

cgcggagcgc ctcgtccctc gccctggcaa tcgccatcac cgcgctctac tcggccgtgt 420
gcgccgtggg gctgctgggc aacgtgcttg tcatgttcgg catcgtccgg tacactaaga 480
tgaagacggc caccaacatc tacatcttca acctggcctt agccgatgcg ctggccacca 540
gcacgctgcc tttccagagt gccaagtacc tgatggagac gtggcccttc ggcgagctgc 600
tctgcaaggc tgtgctctcc atcgactact acaatatgtt caccagcatc ttcacgctca 660
ccatgatgag tgttgaccgc tacatcgctg tctgccaccc tgtcaaggcc ctggacttcc 720
gcacgcctgc caaggccaag ctgatcaaca tctgtatctg ggtcctggcc tcaggcgttg 780
gcgtgcccat catggtcatg gctgtgaccc gtccccggga cggggcagtg gtgtgcatgc 840
tccagttccc cagccccagc tggtactggg acacggtgac caagatctgc gtgttcctct 900
tcgccttcgt ggtgcccatc ctcatcatca ccgtgtgcta tggcctcatg ctgctgcgcc 960
tgcgcagtgt gcgcctgctg tcgggctcca aggagaagga ccgcagcctg cggcgcatca 1020
cgcgcatggt gctggtggtt gtgggcgcct tcgtggtgtg ttgggcgccc atccacatct 1080
tcgtcatcgt ctggacgctg gtggacatcg accggcgcga cccgctggtg gtggctgcgc 1140
tgcacctgtg catcgcgctg ggctacgcca atagcagcct caaccccgtg ctctacgctt 1200
tcctcgacga gaacttcaag cgctgcttcc gccagctctg ccgcaagccc tgcggccgcc 1260
cagaccccag cagcttcagc cgcgcccgcg aagccacggc ccgcgagcgt gtcaccgcct 1320
gcaccccgtc cgatggtccc ggcggtggcg ctgccgcctg accaggccat ccggccccca 1380
gagcgccccc ccctagtgac ccggaggcca catgagtccc agtgggaggc gcgagccatg 1440
atgtggagtg gggcagtaga aggtcggagg cttgggaccg ccagatgggg cctctgtttc 1500
ggagacggga ccgggccgct agatgggcat ggggtgggcc tctggtttgg ggcgaggcag 1560
aggacagatc aatggcgcag tgcctctggt ctgggtgccc cgtccacggc tctaggtggg 1620
gcgggaaagc cagtgactcc aggagaggag cgggacctgt ggctctacaa ctgagtcctt 1680
aaacagggca tctccaggaa ggcggggctt caaccttgag acagcttcgg tttctaactt 1740
ggagccggac tttcggagtt gggggtccgg gccc 1774

<210> 64
<211> 1773
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 64
ccgaggagcc tgcgctgctc ctggctcaca gcgctccggg cgaggagagc gggcggaccg 60
gggggctggg ccggtgcggg cggcgaggca ggcggacgag gcgcagagac agcggggcgg 120
ccggggcgcg gcacgcggcg ggtcggggcc ggcctctgcc ttgccgctcc cctcgcgtcg 180
gatccccgcg cccaggcagc cggtggagag ggacgcggcg gacgccggca gccatggaac 240
cggccccctc cgccggcgcc gagctgcagc ccccgctctt cgccaacgcc tcggacgcct 300
accctagcgc cttccccagc gctggcgcca atgcgtcggg gccgccaggc gcgcggagcg 360
cctcgtccct cgccctggca atcgccatca ccgcgctcta ctcggccgtg tgcgccgtgg 420
ggctgctggg caacgtgctt gtcatgttcg gcatcgtccg gtacactaag atgaagacgg 480
ccaccaacat ctacatcttc aacctggcct tagccgatgc gctggccacc agcacgctgc 540
ctttccagag tgccaagtac ctgatggaga cgtggcccct cggcgagctg ctctgcaagg 600
ctgtgctctc catcgactac tacaatatgt tcaccagcat cttcacgctc accatgatga 660
gtgttgaccg ctacatcgct gtctgccacc ctgtcaaggc cctggacttc cgcacgcctg 720
ccaaggccaa gctgatcaac atctgtatct gggtcctggc ctcaggcgtt ggcgtgccca 780
tcatggtcat ggctgtgacc cgtccccggg acggggcagt ggtgtgcatg ctccagttcc 840
ccagccccag ctggtactgg gacacggtga ccaagatctg cgtgttcctc ttcgccttcg 900
tggtgcccat cctcatcatc accgtgtgct atggcctcat gctgctgcgc ctgcgcagtg 960
tgcgcctgct gtcgggctcc aaggagaagg accgcagcct gcggcgcatc acgcgcatgg 1020
tgctggtggt tgtgggcgcc ttcgtggtgt gttgggcgcc catccacatc ttcgtcatcg 1080
tctggacgct ggtggacatc gaccggcgcg acccgctggt ggtggctgcg ctgcacctgt 1140
gcatcgcgct gggctacgcc aatagcagcc tcaaccccgt gctctacgct ttcctcgacg 1200
agaacttcaa gcgctgcttc cgccagctct gccgcaagcc ctgcggccgc ccagacccca 1260
gcagcttcag ccgcgcccgc gaagccacgg cccgcgagcg tgtcaccgcc tgcaccccgt 1320
ccgatggtcc cggcggtggc gctgccgcct gaccaggcca tccggcccca agacgccccc 1380

ccctagttgt acccggaggc cacatgagtc ccagtgggag gcgcgagcca tgatgtggag 1440
tggggccagt agataggtcg gagggctttg ggaccgccag atggggcctc tgtttcggag 1500
acgggaccgg gccgctagat gggcatgggg tgggcctctg gtttggggcg aggcagagga 1560
cagatcaatg gcgcagtgcc tctggtctgg gtgcccccgt ccacggctct aggtggggcg 1620
ggaaagccag tgactccagg agaggagcgg gacctgtggc tctacaactg agtccttaaa 1680
cagggcatct ccaggaaggc ggggcttcaa ccttgagaca gcttcggttt ctaacttgga 1740
gccggacttt cggagttggg gggtccgggg ccc 1773

<210> 65
<211> 1154
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 65
atggactccc cgatccagat cttccgcggg gagccgggcc ctacctgcgc cccgagcgcc 60
tgcctgcccc ccaacagcag cgcctggttt cccggctggg ccgagcccga cagcaacggc 120
agcgccggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc catcccggtc 180
atcatcacgg cggtctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tggtgggcaa ctcgctggtc 240
atgttcgtga tcatccgata cacaaagatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300
ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac ggtctacttg 360
atgaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480
tgccaccccg tgaaggcttt ggacttccgc acacccttga aggcaaagat catcaatatc 540
tgcatctggc tgctgtcgtc atctgttggc atctctgcaa tagtccttgg aggcaccaaa 600
gtcagggaag acgtcgatgt cattgagtgc tccttgcagt tcccagatga tgactactcc 660
tggtgggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcatctttg ccttcgtgat ccctgtcctc 720
atcatcatcg tctgctacac cctgatgatc ctgcgtctca agagcgtccg gctcctttct 780
ggctcccgag agaaagatcg caacctgcgt aggatcacca gactggtcct ggtggtggtg 840
gcagtcttcg tcgtctgctg gactcccatt cacatattca tcctggtgga ggctctgggg 900
agcacctccc acagcacagc tgctctctcc 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> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 66
atggaatccc cgattcagat cttccgcggg gagccgggcc ctacctgcgc cccgagcgcc 60
tgcctgcccc ccaacagcag cgcctggttt cccggctggg ccgagcccga cagcaacggc 120
agcgccggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc catcccggtc 180
atcatcacgg cggtctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tggtgggcaa ctcgctggtc 240
atgttcgtga tcatccgata cacaaagatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300
ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac ggtctacttg 360
atgaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480
tgccaccccg tgaaggcttt ggacttccgc acacccttga aggcaaagat catcaatatc 540
tgcatctggc tgctgtcgtc atctgttggc atctctgcaa tagtccttgg aggcaccaaa 600
gtcagggaag acgtcgatgt cattgagtgc tccttgcagt tcccagatga tgactactcc 660
tggtgggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcatctttg ccttcgtgat ccctgtcctc 720
atcatcatcg tctgctacac cctgatgatc ctgcgtctca agagcgtccg gctcctttct 780

ggctcccgag agaaagatcg caacctgcgt aggatcacca gactggtcct ggtggtggtg 840
gcagtcttcg tcgtctgctg gactcccatt cacatattca tcctggtgga ggctctgggg 900
agcacctccc acagcacagc tgctctctcc 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> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 67
cctgtaaaga aaatgatgag ggctaaatcc atcagcacca aagctgggaa gccctccagg 60
ttcatttgga agaaaatact cctctgagct caaaggaagt gtgatctgtc acaatattgt 120
atgcctgcac taagtttgca tcctgaaaac tcactggaag ataggaaagc aagcatgaaa 180
aagcagccgg gtcagacagg cttctggatt cagtgtgtgg acatgacttt gcctgcatga 240
attgcccctt tctcctacaa acaagagaat tcggtcaagt ggatgtggca gaactgggct 300
gctctgagat gatagaaaag ggctcctgct tttcctgtaa ttgcagcccc ttgttcttgt 360
ggttgctaca tgcaataaat gtaattctat gagaaggacc agcccttaca tcccatcaaa 420
atgtttcctg gaaacctgga gcacagaact ctgatatcct ctcacactgt ggcaggagaa 480
gcagcacaag gcacaatgct gaaatagcat ggtccaggat gtgtttgcac agaagagtgc 540
ccagtgaaga gacctactcc ttggatcgct ttgcgcaaaa tccacccctt ttcctcctc 600
cctcccttcc agcctccgaa tcccgcatgg cccacgctcc cctcctgcag cggtgcgggg 660
cagccaggac tggtttctgt aagaaacagc aggagctgtg gcagcggcga aaggaagcgg 720
ctgaggcgct tggaacccga aaagtctcgg tgctcctggc tacctcgcac agcggtgccc 780
gcccggccgt cagtaccatg gacagcagcg ctgccccac gaacgccagc aattgcactg 840
atgccttggc gtactcaagt tgctccccag cacccagccc cggttcctgg gtcaacttgt 900
cccacttaga tggcaacctg tccgacccat gcggtccgaa ccgcaccgac ctgggcggga 960
gagacagcct gtgccctccg accggcagtc cctccatgat cacggccatc acgatcatgg 1020
ccctctactc catcgtgtgc gtggtggggc tcttcggaaa cttcctggtc atgtatgtga 1080
ttgtcagata caccaagatg aagactgcca ccaacatcta cattttcaac cttgctctgg 1140
cagatgcctt agccaccagt accctgccct tccagagtgt gaattaccta atgggaacat 1200
ggccatttgg aaccatcctt tgcaagatag tgatctccat agattactat aacatgttca 1260
ccagcatatt caccctctgc accatgagtg ttgatcgata cattgcagtc tgccaccctg 1320
tcaaggcctt agatttccgt actccccgaa atgccaaaat tatcaatgtc tgcaactgga 1380
tcctctcttc agccattggt cttcctgtaa tgttcatggc tacaacaaaa tacaggcaag 1440
gttccataga ttgtacacta acattctctc atccaacctg gtactgggaa aacctgctga 1500
agatctgtgt tttcatcttc gccttcatta tgccagtgct catcattacc gtgtgctatg 1560
gactgatgat cttgcgcctc aagagtgtcc gcatgctctc tggctccaaa gaaaaggaca 1620
ggaatcttcg aaggatcacc aggatggtgc tggtggtggt ggctgtgttc atcgtctgct 1680
ggactcccat tcacatttac gtcatcatta aagccttggt tacaatccca gaaactacgt 1740
tccagactgt ttcttggcac ttctgcattg ctctaggtta cacaaacagc tgcctcaacc 1800
cagtccttta tgcatttctg gatgaaaact tcaaacgatg cttcagagag ttctgtatcc 1860
caacctcttc caacattgag caacaaaact ccactcgaat tcgtcagaac actagagacc 1920
acccctccac ggccaataca gtggatagaa ctaatcatca gctagaaaat ctggaagcag 1980
aaactgctcc gttgccctaa cagggtctca tgccattccg accttcacca agcttagaag 2040
ccaccatgta tgtggaagca ggttgcttca agaatgtgta ggaggctcta attctctagg 2100
aaagtgcctg cttttaggtc atccaacctc tttcctctct ggccactctg ctctgcacat 2160
tagagggaca gccaaaagta agtggagcat ttggaaggaa aggaatatac cacaccgagg 2220
agtccagttt gtgcaagaca cccagtggaa ccaaaaccca tcgtggtatg tgaattgaag 2280
tcatcataaa aggtgaccct tctgtctgta agattttatt ttcaagcaaa tatttatgac 2340
ctcaacaaag aagaaccatc ttttgttaag ttcaccgtag taacacataa agtaaatgct 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 taatctgaaa cacagtcatg 2640
tgtcagctgt agaaaggttg attctcatgc actgcaaata cttccaaaga gtcatcatgg 2700
gggatttttc attcttaggc tttcagtggt ttgttcct 2738

<210> 68
<211> 2053
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 68
catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
gctgtctttc cttccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacccgtcac tgacccccca 180
gcccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg gaaagcaccc 300
gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctcgatcgtg tcgaagaagg catgaaccat atcaaccaag 420
acatgaagga ggctgagaaa aatttaaaag atttagggaa atgctgtggc cttttcatat 480
gtccttgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtggt ggccagccag cctgctcgtg tagtggacga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggctt catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aaatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaagtggt taagtgtgcc 840
cacccgtgtt ctcctccaaa tgctgtcggg caagatagct ccttcatgct tttctcatgg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtcc acccccattg tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttggtctct 1020
ttctttccaa aggttgtaca tagtggtcat ttggtggctc taactccttg atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcggtggc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtcc tttgagtgtc aggctctgaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttcctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcatg attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgcactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380
atttttagat tcctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact tttttcctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tccttttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatatgtt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 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 gctagtttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc 2053

<210> 69
<211> 2053
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 69
catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
gctgtctttc cttccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacccgtcac tgaccccca 180
gcccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg gaaagcaccc 300
gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctggaacgca ttgaggaagg gatggaccaa atcaataagg 420
acatgaaaga agcagaaaag aatttgacgg acctaggaaa attctgcggg ctttgtgtgt 480
gtccctgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtggt ggccagccag cctgctcgtg tagtggacga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggctt catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aaatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaagtggt taagtgtgcc 840
cacccgtgtt ctcctccaaa tgctgtcggg caagatagct ccttcatgct tttctcatgg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtcc acccccattg tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttggtctct 1020
ttctttccaa aggttgtaca tagtggtcat ttggtggctc taactccttg atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcggtggc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtcc tttgagtgtc aggctctgaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttcctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcatg attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgcactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380
atttttagat tcctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact tttttcctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tccttttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatatgtt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 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 gctagtttaa 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> ADN
<213> Mus musculus

<400> 71

```
caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaagg cttctggcta catcttcact gaccatgctc ttcactgggt gaggcagaag 120
cctgaacagg gcctggaatg gattgggtat atttttcccg gaaatggtaa tattgagtac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag tactgcctac 240
atgcagctca acagcctgac atctggagat tctgcaatgt atttctgtaa aaagatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 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> ADN
<213> Mus musculus

<400> 73
caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
tcctgcaagg cttctggtta caccttcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagaag 120
cctggacagg gcctagaatg gattggatat ctttttcccg gaaatggtaa ttttgaatat 180
aatgagaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
atgcacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaagatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 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> ADN
<213> Mus musculus

<400> 75
caggttcagc tgcagcagtc cgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaggg cttctggcta caccttcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagcag 120
cctggccagg gcctggaatg gatcggatat atttttcccg gaaatggaaa tattgaatac 180
aatgacaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccgg cactgcctac 240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300
tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 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> ADN
<213> Mus musculus

<400> 77
caggtcaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagaag 120
cctggacagg gcctagaatg gattggatat ctttttcccg gaaatggtaa ttttgagtac 180
aatgaaaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgtctac 240
atgtacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 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
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
            20   25   30
Ser Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35   40   45
Gly Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
    50   55   60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65   70   75   80
Met Tyr Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85   90   95

```
Lys Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110


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

<400> 79
caggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca                           336


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

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


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

<400> 81
caggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaatgggg 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> ADN
<213> Mus musculus

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

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

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

100 105 110
Arg

<210> 85
<211> 324
<212> ADN
<213> Mus musculus

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

<210> 86
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 87
<211> 339
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 87
gatgttttg atgacccaaac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcttcc 60
atctcttgc aagtccagtca gagcctctta tatactaatg gaaaaaccta tttgacttgg 120
ttattccag aggccaggcca gtctccaaaa cgcctaatct atctggtgtc tgaattggac 180
tctggagtc cctgacaggtt cagtggcagt ggttcaggga cagatttcac actggaaatc 240
accagagtg gaggctgagga tttgggagtt tattactgct tgcagagtgc acattttcca 300
ttcacgttc ggctcgggcac caagctggaa atcaaacgg 339

<210> 88

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

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

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

<400> 89
gatgttgtga tgacccaaac tccactcact ctgtcggtga ccattggaca accagcgttc 60
atctcttgca agtccagtca gagcctcttt aacactaatg gcaaaaccta tttgacttgg 120
ttaattcaga ggccaggcca gtctccacag cgcctgatct atctggtgtc caaattggac 180
tctggcgtcc cggacaggtt cagtggcagt ggctcaggga 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> ADN
<213> Mus musculus

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

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

<400> 92

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

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

<400> 93

```
Thr Phe Thr Asp His Ser Ile His
 1               5
```

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

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

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

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

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

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

<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 98
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 99
<211> 17

<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 100
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 100
Lys Arg Met Gly Tyr
 1   5

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

<400> 101
Lys Lys Met Asp Tyr
 1   5

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

<400> 102
Ala Arg Met Asp Tyr
 1   5

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

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

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

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

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

<210> 106
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 110
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 115
<211> 9

<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

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

<400> 118
Asp His Ser Ile His
 1   5

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

<400> 119
Asn Tyr Val Ile His
 1   5

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

<400> 120

Asp His Ala Leu His
1 5

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

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

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

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

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

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

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

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

<400> 125
Ser Asn Gly Asn Thr
1 5

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

<400> 126
Glu Asn Ile Tyr Ser
 1   5

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

<400> 127
Thr Ser Gly Tyr Ser
 1   5

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

<400> 128
Gln Asp Ile Lys Ser
 1   5

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

<400> 129
Gln Asn Ile Gly Asn
 1   5

<210> 130
<211> 911
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Endopeptidaza tái hướng đích

<400> 130
Ile Ser Glu Phe Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr
 1   5   10   15
Lys Asp Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn
            20   25   30
Ala Gly Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile

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

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

900 905 910

<210> 131
<211> 904
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Endopeptidaza tái hướng đích

<400> 131
Met Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro
1 5 10 15
Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln
20 25 30
Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile
35 40 45
Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro
50 55 60
Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys
85 90 95
Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr
100 105 110
Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr
115 120 125
Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp
130 135 140
Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser
145 150 155 160
Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu
165 170 175
Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser
180 185 190
Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn
195 200 205
Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu
210 215 220
Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile
225 230 235 240
Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met
245 250 255
Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His
260 265 270
Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr
275 280 285
Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys
290 295 300
Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe
305 310 315 320
Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val
325 330 335

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

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

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

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

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

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

115 120

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

<400> 134
Ala Arg Met Gly Tyr
1 5

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

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

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

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

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

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

<400> 137

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

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


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

<400> 138
Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Cys Pro
 1               5                  10                  15
Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
            20                  25                  30
Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
        35                  40                  45
Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
    50                  55                  60
Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
65                  70                  75                  80
Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
                85                  90                  95
Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
            100                 105                 110
Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
        115                 120                 125
Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
    130                 135                 140
Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp
145                 150                 155                 160
Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu
                165                 170                 175
Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro
            180                 185                 190
Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly
        195                 200                 205
Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu
    210                 215                 220
Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala
```

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

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

<400> 139
Met Asn Val Ser Gly Cys Pro Gly Ala Gly Asn Ala Ser Gln Ala Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Trp His Pro Glu Ala Val Ile Val Pro Leu Leu Phe
20 25 30
Ala Leu Ile Phe Leu Val Gly Thr Val Gly Asn Thr Leu Val Leu Ala
35 40 45
Val Leu Leu Arg Gly Gly Gln Ala Val Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile
50 55 60
Leu Asn Leu Gly Val Ala Asp Leu Cys Phe Ile Leu Cys Cys Val Pro
65 70 75 80
Phe Gln Ala Thr Ile Tyr Thr Leu Asp Gly Trp Val Phe Gly Ser Leu
85 90 95
Leu Cys Lys Ala Val His Phe Leu Ile Phe Leu Thr Met His Ala Ser
100 105 110
Ser Phe Thr Leu Ala Ala Val Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Arg
115 120 125
Tyr Pro Leu His Ser Arg Glu Leu Arg Thr Pro Arg Asn Ala Leu Ala
130 135 140
Ala Ile Gly Leu Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Phe Ser Gly Pro Tyr
145 150 155 160
Leu Ser Tyr Tyr Arg Gln Ser Gln Leu Ala Asn Leu Thr Val Cys His
165 170 175
Pro Ala Trp Ser Ala Pro Arg Arg Arg Ala Met Asp Ile Cys Thr Phe
180 185 190
Val Phe Ser Tyr Leu Leu Pro Val Leu Val Leu Gly Leu Thr Tyr Ala
195 200 205
Arg Thr Leu Arg Tyr Leu Trp Arg Ala Val Asp Pro Val Ala Ala Gly
210 215 220
Ser Gly Ala Arg Arg Ala Lys Arg Lys Val Thr Arg Met Ile Leu Ile
225 230 235 240
Val Ala Ala Leu Phe Cys Leu Cys Trp Met Pro His His Ala Leu Ile

```
                245                 250                 255
Leu Cys Val Trp Phe Gly Gln Phe Pro Leu Thr Arg Ala Thr Tyr Ala
            260                 265                 270
Leu Arg Ile Leu Ser His Leu Val Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Val Asn
        275                 280                 285
Pro Ile Val Tyr Ala Leu Val Ser Lys His Phe Arg Lys Gly Phe Arg
    290                 295                 300
Thr Ile Cys Ala Gly Leu Leu Gly Arg Ala Pro Gly Arg Ala Ser Gly
305                 310                 315                 320
Arg Val Cys Ala Ala Ala Arg Gly Thr His Ser Gly Ser Val Leu Glu
                325                 330                 335
Arg Glu Ser Ser Asp Leu Leu His Met Ser Glu Ala Ala Gly Ala Leu
            340                 345                 350
Arg Pro Cys Pro Gly Ala Ser Gln Pro Cys Ile Leu Glu Pro Cys Pro
        355                 360                 365
Gly Pro Ser Trp Gln Gly Pro Lys Ala Gly Asp Ser Ile Leu Thr Val
    370                 375                 380
Asp Val Ala
385
```

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

<400> 140

```
Met Ala Asp Ala Gln Asn Ile Ser Leu Asp Ser Pro Gly Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Ala Val Ala Val Pro Val Val Phe Ala Leu Ile Phe Leu Leu Gly Thr
            20                  25                  30
Val Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala Val Leu Leu Gln Pro Gly Pro Ser
        35                  40                  45
Ala Trp Gln Glu Pro Gly Ser Thr Thr Asp Leu Phe Ile Leu Asn Leu
    50                  55                  60
Ala Val Ala Asp Leu Cys Phe Ile Leu Cys Cys Val Pro Phe Gln Ala
65                  70                  75                  80
Thr Ile Tyr Thr Leu Asp Ala Trp Leu Phe Gly Ala Leu Val Cys Lys
                85                  90                  95
Ala Val His Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Met Tyr Ala Ser Ser Phe Thr
            100                 105                 110
Leu Ala Ala Val Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Arg His Pro Leu
        115                 120                 125
Arg Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Arg Asn Ala Arg Ala Ala Val Gly
    130                 135                 140
Leu Val Trp Leu Leu Ala Ala Leu Phe Ser Ala Pro Tyr Leu Ser Tyr
145                 150                 155                 160
Tyr Gly Thr Val Arg Tyr Gly Ala Leu Glu Leu Cys Val Pro Ala Trp
                165                 170                 175
Glu Asp Ala Arg Arg Arg Ala Leu Asp Val Ala Thr Phe Ala Ala Gly
            180                 185                 190
Tyr Leu Leu Pro Val Ala Val Val Ser Leu Ala Tyr Gly Arg Thr Leu
        195                 200                 205
Arg Phe Leu Trp Ala Ala Val Gly Pro Ala Gly Ala Ala Ala 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> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 141
atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gccccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt gctggcgcgc 180
agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct 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
gcgctgtcca ttgccatggc ctcgcccgtg gcctaccacc agggcctctt ccacccgcgc 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 tggtgtttgg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgct gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaca gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga   1050

<210> 142
<211> 1050
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 142
atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gccccccgcc 60

ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt gctggcgcgc 180
agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct 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
gcgctgtcca ttgccatggc ctcgcccgtg gcctaccacc agggcctctt ccacccgcgc 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 tggtgtttgg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgct gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc 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> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 143
atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctgtccgga gccccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg cgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt gctggcgcgc 180
agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct 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
gcgctgtcca ttgccatggc ctcgcccgtg gcctaccacc agggcctctt ccacccgcgc 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 tggtgtttgg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgct gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc 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> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 144
atgaacgtct cgggctgccc aggggccggg aacgcgagcc aggcgggcgg cgggggaggc 60
tggcaccccg aggcggtcat cgtgcccctg ctcttcgcgc tcatcttcct cgtgggcacc 120
gtgggcaaca cgctggtgct ggcggtgctg ctgcgcggcg gccaggcggt cagcactacc 180

aacctgttca tccttaacct gggcgtggcc gacctgtgtt tcatcctgtg ctgcgtgccc 240
ttccaggcca ccatctacac cctggacggc tgggtgttcg gctcgctgct gtgcaaggcg 300
gtgcacttcc tcatcttcct caccatgcac gccagcagct tcacgctggc cgccgtctcc 360
ctggacaggt atctggccat ccgctacccg ctgcactccc gcgagctgcg cacgcctcga 420
aacgcgctgg cagccatcgg gctcatctgg gggctgtcgc tgctcttctc cgggccctac 480
ctgagctact accgccagtc gcagctggcc aacctgaccg tgtgccatcc cgcgtggagc 540
gcccctcgcc gccgcgccat ggacatctgc accttcgtct tcagctacct gcttcctgtg 600
ctggttctcg gcctgaccta cgcgcgcacc ttgcgctacc tctggcgcgc cgtcgacccg 660
gtggccgcgg gctcgggtgc ccggcgcgcc aagcgcaagg tgacacgcat gatcctcatc 720
gtggccgcgc tcttctgcct ctgctggatg ccccaccacg cgctcatcct ctgcgtgtgg 780
ttcggccagt tcccgctcac gcgcgccact tatgcgcttc gcatcctctc gcacctggtc 840
tcctacgcca actcctgcgt caaccccatc gtttacgcgc tggtctccaa gcacttccgc 900
aaaggcttcc gcacgatctg cgcgggcctg ctgggccgtg ccccaggccg agcctcgggc 960
cgtgtgtgcg ctgccgcgcg gggcacccac agtggcagcg tgttggagcg cgagtccagc 1020
gacctgttgc acatgagcga ggcggcgggg gcccttcgtc cctgccccgg cgcttcccag 1080
ccatgcatcc tcgagccctg tcctggcccg tcctggcagg gcccaaaggc aggcgacagc 1140
atcctgacgg ttgatgtggc ctga 1164

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

<400> 145
atggctgatg cccagaacat ttcactggac agcccaggga gtgtgggggc cgtggcagtg 60
cctgtggtct ttgccctaat cttcctgctg ggcacagtgg gcaatgggct ggtgctggca 120
gtgctcctgc agcctggccc gagtgcctgg caggagcctg gcagcaccac ggacctgttc 180
atcctcaacc tggcggtggc tgacctctgc ttcatcctgt gctgcgtgcc cttccaggcc 240
accatctaca cgctggatgc ctggctcttt ggggccctcg tctgcaaggc cgtgcacctg 300
ctcatctacc tcaccatgta cgccagcagc tttacgctgg ctgctgtctc cgtggacagg 360
tacctggccg tgcggcaccc gctgcgctcg cgcgccctgc gcacgccgcg taacgcccgc 420
gccgcagtgg ggctggtgtg gctgctggcg gcgctcttct cggcgcccta cctcagctac 480
tacggcaccg tgcgctacgg cgcgctggag ctctgcgtgc ccgcctggga ggacgcgcgc 540
cgccgcgccc tggacgtggc caccttcgct gccggctacc tgctgcccgt ggctgtggtg 600
agcctggcct acgggcgcac gctgcgcttc ctgtgggccg ccgtgggtcc cgcgggcgcg 660
gcggcggccg aggcgcggcg gagggcgacg ggccgcgcgg ggcgcgccat gctggcggtg 720
gccgcgctct acgcgctctg ctggggtccg caccacgcgc tcatcctgtg cttctggtac 780
ggccgcttcg ccttcagccc ggccacctac gcctgccgcc tggcctcaca ctgcctggcc 840
tacgccaact cctgcctcaa cccgctcgtc tacgcgctcg cctcgcgcca cttccgcgcg 900
cgcttccgcc gcctgtggcc gtgcggccgc cgacgccgcc accgtgcccg ccgcgccttg 960
cgtcgcgtcc gccccgcgtc ctcgggccca cccggctgcc ccggagacgc ccggcctagc 1020
gggaggctgc tggctggtgg cggccagggc ccggagccca gggagggacc cgtccacggc 1080
ggagaggctg cccgaggacc ggaataa 1107

<210> 146
<211> 889
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mảnh LHn/A

<221> BIẾN THỂ
<222> (453)...(455)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<400> 146

```
Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
 1               5                  10                  15
Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
            20                  25                  30
Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
        35                  40                  45
Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu 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
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> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mảnh LHn/A

<400> 147
atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagacccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
tatatcaaaa tcccgaatgc gggtcaaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
aaaatttggg tgatcccgga gcgcgatacg ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
ccaccgcctg aggctaaaca ggtcccggtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
gacaatgaaa aggacaacta cctgaaaggt gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
acagatctcg gtcgcatgtt gctgacttct attgtgcgcg gcattccgtt ttggggtggt 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
gatgggagct accggtccga agagcttaac ctcgtaatca ttggcccgag cgcggatatt 480
atccaattcg aatgtaaatc ttttgggcat gaagtcctga atctgacgcg gaatggctat 540
ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
gaagttgata cgaaccctct tttaggcgcg ggaaaattcg cgacggaccc agcggtgacc 660
ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgtatg gaatcgccat taacccgaac 720
cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgtat tacgagatgt cgggcttaga agtgtccttt 780
gaagaactgc gcacgtttgg cggtcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaac 840
gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaaa 960
tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggtc 1080
ttgaatcgga aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggta ttatcaccag caaaaccaaa 1320
tccttgggcg gtggtggcga aaacctgtac ttccagggcg gtggcggtgg tgataagggc 1380
tataacaagg ccttcaatga tttatgcatc aaggtgaaca actgggactt gtttttctct 1440
ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag aggaaattac ttccgatacc 1500
aacatcgaag cagcggaaga gaatattagt ctagatctta ttcaacaata ttacctgacc 1560
tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcatc 1620
ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgctttccta atggaaagaa atatgaattg 1680
gacaaataca ccatgttcca ctatctccgc gcgcaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
attgctctga ccaattcggt aaacgaagcc cttttaaatc cttcgcgtgt gtacaccttt 1800
ttctcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gtttttggga 1860
tgggtggaac aactggtata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920
aaaattgccg atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgcactgaa cattggtaac 1980
atgctgtata aagatgattt tgtgggcgcc ctgatctttt caggcgctgt tatcctgctg 2040

gaatttatcc cggaaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgcgctggt gtcctatatc 2100
gcaaacaaag ttttgactgt ccagacgatc gacaacgcgc tcagtaaacg taacgaaaaa 2160
tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaaa cacccagatt 2220
gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280
attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caacttcaac 2340
atcgacgact tatcttcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat taatattaac 2400
aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacggtgtg 2460
aaacgtctgg aagacttcga tgcaagcctt aaagatgccc ttctgaagta tatttacgat 2520
aatcgcggaa ctcttattgg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580
agtacagaca tccctttttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgcct gctgtccacg 2640
caccatcacc atcaccacta a 2661

<210> 148
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi xuôi oligonucleotit ORL-1

<400> 148
cactcggctg gtgctggtgg 20

<210> 149
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi ngược oligonucleotit ORL-1

<400> 149
aatggccacg gcagtctcgc 20

<210> 150
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi xuôi oligonucleotit thụ thể Galanin 1

<400> 150
ccccatcatg tcatccacct 20

<210> 151
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi ngược oligonucleotit thụ thể Galanin 1

<400> 151
atggggttca ccgaggagtt 20

<210> 152
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi xuôi oligonucleotit thụ thể Galanin 2

<400> 152
catcgtggcg gtgctttt 18

<210> 153
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi ngược oligonucleotit thụ thể Galanin 2

<400> 153
agcgggaagc gaccaaac 18