

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02804802.4

C12N 15/12

C07K 14/47 C07K 16/18

C12N 1/15 C12N 1/19

C12N 1/21 C12N 5/10

C12Q 1/04 A01K 67/027

A61K 39/395 A61K 45/00

A61M 1/34 A61M 1/36

[43] 公开日 2004 年 4 月 21 日

[11] 公开号 CN 1491281A

[22] 申请日 2002.2.4 [21] 申请号 02804802.4

[30] 优先权

[32] 2001. 2. 9 [33] JP [31] 34217/2001

[86] 国际申请 PCT/JP02/00885 2002.2.4

[87] 国际公布 WO02/064787 日 2002.8.22

[85] 进入国家阶段日期 2003.8.11

[71] 申请人 洛克莫基因株式会社

地址 日本东京市

[72] 发明人 中岛利博

[74] 专利代理机构 北京金信联合知识产权代理有限公司

代理人 张金海

A61P 25/02 C12Q 1/04

G01N 33/15 G01N 33/531

G01N 33/563

权利要求书 8 页 说明书 40 页 序列表 10 页
附图 9 页

[54] 发明名称 神经调节素及其应用

[57] 摘要

为详细说明引起艾萨克综合症的物质并建立有效的诊断和治疗方法，对从艾萨克综合症者获得的血清应用一种免疫筛选方法。从神经细胞得到的 cDNA 库中分离得到一特定的 cDNA，其核苷酸序列已阐明并通过对它的克隆获得一新的蛋白质，即神经调节素(neurotonin)。该氨基酸序列已经确定的新型蛋白质被认为是艾萨克综合症的关键物质，并可应用于外周神经损伤的研究和临床治疗中。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1、具有下述特性的外周神经细胞蛋白质，下面称为“神经调节素(neurotoxin)”，其中该蛋白质
 - a) 在艾萨克综合症患者或其它具有外周神经损伤的患者的外周神经细胞中找到；
 - b) 与在患者血液中找到的一种抗体反应；
 - c) 兔免疫引起类似于艾萨克综合症症状群的症状；及
 - d) 按 SDS-PAGE 法测定，其分子量约为 66kDa。
- 2、编码神经调节素的 cDNA。
- 3、编码神经调节素或包括如图 1 或 2 所示的所有核苷酸序列的 DNA。
- 4、编码神经调节素的核酸分子，包括至少一个与如图 1 或 2 所示的整个或部分核苷酸序列基本一致的核苷酸序列，或包括与任何该序列基本同源或与任何该序列杂交的序列。
- 5、编码鼠神经调节素的鼠 cDNA。
- 6、编码鼠神经调节素或包括如图 3 或 4 所示的全部核苷酸序列的 DNA。
- 7、编码鼠神经调节素的核酸分子，包括至少一个与如图 3 或 4 所示的整个或部分核苷酸序列基本一致的核苷酸序列，或包括与任

何该序列基本同源或与任何该序列杂交的编码鼠神经调节素的序列。

8、如权利要求 2 或 5 所述的 cDNA 或如权利要求 3、4、6 或 7 所述的核酸分子的反义 RNA 或反义 DNA。

9、识别并裂解如权利要求 2 或 5 所述的 cDNA、如权利要求 3、4、6 或 7 所述的核酸分子或从其一部分转录获得的 RNA 的核酶。

10、包含如权利要求 2-8 中任一项所述的核酸分子的表达载体、克隆载体或粘粒。

11、保持如权利要求 10 所述的载体或粘粒的转化体。

12、包含如权利要求 2-8 中任一项所述的核酸分子的原核细胞、真核细胞或变异细胞。

13、具有如图 5 或 6 所示的氨基酸序列的神经调节素。

14、在下面的 a)或 b)项中定义的具有与患者血液中含有的抗体结合的活性的蛋白质：

a) 多肽，例如具有如图 5 或 6 所示的氨基酸序列的多肽、具有在如图 5 或 6 所示的氨基酸序列中缺失、替代或添加和/或插入至少一个氨基酸的氨基酸序列的多肽、包括构成神经调节素的抗原性部分的氨基酸序列的合成多肽、其功能等效变异体、或进一步包括前述氨基酸序列的融合多肽；和

b) 与具有如权利要求 2-4 中任一项所述的核苷酸序列的 DNA 杂交的 DNA 编码的蛋白质。

15、在下面的 a)或 b)项中定义的能与存在于外周神经细胞中的“14-3-3”蛋白结合的蛋白质:

a) 多肽, 例如具有如图 5 或 6 所示的氨基酸序列的多肽、具有在如图 5 或 6 所示的氨基酸序列中缺失、替代或添加和/或插入至少一个氨基酸的氨基酸序列的多肽、包括构成神经调节素的抗原性部分的氨基酸序列的合成多肽、其功能等效变异体、或进一步包括前述氨基酸序列的融合多肽; 和

b) 与具有如权利要求 2-4 中任一项所述的核苷酸序列的 DNA 杂交的 DNA 编码的蛋白质。

16、如权利要求 13-15 中任一项所述的蛋白质的免疫活性有效域或具有该域的片段。

17、多肽, 例如具有如图 7 或 8 所示的氨基酸序列的多肽、具有在如图 7 或 8 所示的氨基酸序列中缺失、替代或添加和/或插入至少一个氨基酸的氨基酸序列的多肽、包括构成神经调节素的抗原性部分的氨基酸序列的合成多肽、其功能等效变异体、或进一步包括前述氨基酸序列的融合多肽。

18、包含如权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质, 用于检验识别该蛋白的抗体的免疫分析的试剂。

19、用于如权利要求 18 所述的免疫分析，评价艾萨克综合症或其它外周神经损伤的诊断或治疗效果的试剂。

20、包含与如权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质反应的抗体，用于检验该蛋白的免疫分析的试剂。

21、用于如权利要求 20 所述的免疫分析，评价艾萨克综合症或其它外周神经损伤的诊断或治疗效果的试剂。

22、如权利要求 21 所述的免疫分析试剂，其中被分析的如权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质存在于外周神经细胞中。

23、神经调节素的检测方法，通过分析存在于受检者体液中并与如权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质反应的抗体。

24、筛选与如权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质结合的配体的方法，包括以下步骤：

a) 使配体的候选化合物与如权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质接触；及

b) 选择具有与蛋白质的结合活性的候选化合物。

25、根据抗配体与通过按权利要求 24 所述的方法使用如权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质作为抗配体获得的配体的亲和力检验该蛋白的方法。

26、可抑制如权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质与配体的

结合的化合物的筛选方法，包括下述步骤：

a) 在候选化合物存在的情况下使如权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质与配体接触；及

b) 选择具有抑制该蛋白质与该配体结合的活性的候选化合物。

27、可通过权利要求 26 中所述的筛选方法获得的化合物。

28、包含可通过权利要求 26 中所述的筛选方法获得的化合物的神经调节素抑制剂。

29、治疗外周神经损伤的药物，包含可通过权利要求 26 中所述的筛选方法获得的化合物。

30、与权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质结合的抗体。

31、如权利要求 30 所述的抗体，其中该抗体为单克隆抗体。

32、抗引起外周神经损伤的抗体的单克隆抗体。

33、通过设定如权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质或编码该蛋白的基因的表达作为标记检测或分离表达该蛋白质的细胞的方法。

34、如权利要求 33 所述的方法，其中该细胞为外周神经细胞。

35、检测或分离表达如权利要求 13-17 中任一项所述的蛋白质的细胞的试剂，包含如权利要求 30-32 中任一项所述的抗体。

36、检测如权利要求 2-7 所述的 DNA 或其转录 RNA 的试剂，包含具有可与该 DNA 或其部分、或该 RNA 杂交的核苷酸序列的核酸分子。

37、非人类转基因脊椎动物，其中如权利要求 3 或 6 所述的 DNA 的表达经过改变或诱导了此种改变。

38、如权利要求 37 所述的动物，为外周神经损伤模型动物。

39、如权利要求 37 所述的非人类基因敲除脊椎动物，其中如权利要求 3 或 6 所述的内源 DNA 的表达受到抑制。

40、如权利要求 37 所述的非人类脊椎动物，其中另一基因被敲除。

41、从如权利要求 37-40 中任一项所述的非人类脊椎动物获得的细胞。

42、提高或降低如权利要求 3 或 6 所述的 DNA 的内源启动子的活性的化合物的筛选方法，包括下述步骤：

a) 在所测试的化合物存在的情况下检测与权利要求 3 或 6 所述的 DNA 的内源启动子下游结合的基因的表达；及

b) 选择增加或降低该表达的化合物。

43、提高或降低如权利要求 3 或 6 所述的 DNA 的内源启动子的活性的化合物的筛选方法，包括下述步骤：

a) 将所测试的化合物应用于如权利要求 37-40 所述的非人类脊椎动物或从该脊椎动物获得的细胞；及

b) 选择增加或降低敲入的基因的表达的化合物。

44、用神经调节素免疫以用于研究艾萨克综合症或其它外周神经损伤和筛选具有改善艾萨克综合症或其它外周神经损伤的作用的物质的动物。

45、用神经调节素免疫以用于筛选改善受抑制的 VGKC 功能、神经末端的信号传导异常或疼痛性肌肉痉挛的蛋白质或非蛋白类物质的兔。

46、用于通过应用神经调节素、其相关蛋白或其它的引起外周神经损伤的抗体作为标记检测与单克隆抗体的特异性结合的诊断标志，并进而测定从受试者取得的样本中的神经调节素、其相关蛋白或引起外周神经损伤的抗体的水平以诊断艾萨克综合症或其它外周神经损伤。

47、为诊断艾萨克综合症或其它外周神经损伤提供数据的检验方法，其中测定从受试者取得的样本中的神经调节素或引起外周神经损伤的抗体的水平。

48、用于消除由于神经调节素或引起外周神经损伤的抗体的存在造成的麻木以进行治疗的血液过滤材料，其中通过血液透析使血液中的神经调节素抗体或引起外周神经损伤的抗体与固定在该过滤

材料上的单克隆抗体结合，因而减少身体内的神经调节素抗体或引起外周神经损伤的抗体。

49、用于在人体或其它动物中刺激对艾萨克综合症或其它外周神经损伤的免疫反应的疫苗组合物，包含至少一种如权利要求 13-17 中任一项所述的多肽，加上可接受的药用载体和对多肽的免疫反应的刺激，或者包含具有插入到细胞中的如权利要求 2-8 中任一项所述的核酸分子的病毒细胞(virus cell)或宿主细胞和对由插入的核酸分子编码的多肽的免疫反应的刺激。

50、包含如权利要求 31 或 32 所述的单克隆抗体的细胞培养介质，用于通过从具有外周神经损伤的患者分离的外周神经和肌肉系统细胞的孵育中去除引起外周神经损伤的抗体在体外繁殖成为外周神经的细胞，因而导致病因抗体与该单克隆抗体特异性结合。

神经调节素及其应用

技术领域

本发明涉及神经调节素(neurotonin)及其应用。更具体地说,本发明涉及神经调节素、编码该神经调节素的 cDNA、相关核酸分子、对该神经调节素等的单克隆抗体及其应用。

背景技术

运动神经的神经肌肉接头中神经兴奋传导的缺失导致外周神经损伤,且常引起肌病。由于这种原因,已知有各种的疾病情形,例如,感觉迟钝、运动失常、自主神经损伤等。疾病的原因也是各种各样,在许多病例中详细病因不为人所知。艾萨克综合症被认为是一种引起神经末端的 VGKC(电压门控钾通道)异常和神经末端乙酰胆碱的连续性释放的神经病和肌病,也被认为是连续性肌纤维活动的综合症。存在一些临床观察的症状,例如,在肌肉收缩如肢体肌强直后引起的松弛困难、疼痛性肌肉痉挛(dolorous muscular convulsion)和有限手指外展(limited finger abduction)、步行困难、多汗等。虽然这些症状的机理还不清楚,但观察到胸腺瘤并发症的出现和血液包含免疫复合物的病例。因此,也可以假设出现了自身免疫性疾病。

在现实情况中,还没有一种特异性的和有效的治疗包括艾萨克综合症的外周神经损伤的方法,当前的治疗局限于对症治疗,例如,有一种治疗方法使用血浆交换、给予维生素 B₁₂等。因为现实的老龄社会即将到来,急需一种有效地进行除外周神经损伤外,作为糖尿病的并发症的外周多神经症(peripheral multiple neurosis)、肌肉的全疼痛性麻痹(whole painfull

numbness)等的治疗。

本发明的发明人掌握了以下事实，即从艾萨克综合症患者分离得到的一种 cDNA 编码一种特定的特异性蛋白质且该蛋白质在患者的血液中增加。作为深入研究的结果，本发明的发明人鉴定了该 cDNA 和该蛋白质并确定它们是与该疾病状态有关的因素，还确定了它们的序列结构并因此完成了涉及应用该核酸分子和蛋白质进行诊断和治疗的本发明。按照本发明的 DNA 分子和蛋白质提供了各种有助于涉及到外周神经损伤的基础研究和临床应用的物质和方法。

发明目的

在神经调节素或其 cDNA 编码的结构和功能的基础上，本发明的目的是提供一种核酸分子、一种对神经调节素的单克隆抗体、临床检测化学制剂、一种治疗方法、一种新型的载体及通过应用它们得到的一种结合了抗神经调节素抗体的血液过滤材料、一种培养介质、转基因动物、用于筛选的动物等。

发明内容

本发明提供了一种具有下述特性的外周神经细胞蛋白质(下面称为“神经调节素”)，

其中该蛋白质

a) 在艾萨克综合症患者或其它具有外周神经损伤的患者的外周神经细胞中找到；

b) 与在患者血液中找到的一种抗体反应；

- c) 兔免疫引起类似于艾萨克综合症症状群的症状; 及
- d) 按 SDS-PAGE 法测定, 其分子量约为 66kDa。

按照本发明的 DNA 为编码神经调节素的 cDNA。

此外, 按照本发明的 DNA 为编码神经调节素的 DNA 或包括如图 1 或
5 2 所示的所有核苷酸序列的 DNA。

本发明还包含编码神经调节素的核酸分子, 包括至少一个与如图 1 或
2 所示的整个或部分核苷酸序列基本一致的核苷酸序列, 或包括与任何该
序列基本同源或与任何该序列杂交的序列。

按照本发明的 DNA 还包括编码鼠神经调节素的 DNA 或包含如图 3 或
10 4 所示的全部核苷酸序列的 DNA。另外, 编码鼠神经调节素的鼠 cDNA 也
属于本发明的范围。

此外, 本发明还包含编码鼠神经调节素的核酸分子, 包括至少一个与
如图 3 或 4 所示的整个或部分核苷酸序列基本一致的核苷酸序列, 或包括
与任何该序列基本同源或与任何该序列杂交的编码鼠神经调节素的序列。

15 本发明还进一步包括该 cDNA 或任何该核酸分子的反义 RNA 或反义
DNA, 或者识别并裂解所说的 cDNA、所说的核酸分子或从其一部分转录
获得的 RNA 的核酶。

按照本发明的表达载体、克隆载体或粘粒包含该 cDNA 或任何所说的
核酸分子。

20 按照本发明的转化体保持该载体或粘粒。

按照本发明的原核细胞、真核细胞或变异细胞包含任何以上所述的核

酸分子。

按照本发明的神经调节素具有如图 5 或 6 所示的氨基酸序列。

按照本发明的蛋白质具有与患者血液中的抗体结合的活性和下面的 a)或 b)项的特征。

5 a) 多肽，例如具有如图 5 或 6 所示的氨基酸序列的多肽、具有在如图 5 或 6 所示的氨基酸序列中缺失、替代或添加和/或插入至少一个氨基酸的氨基酸序列的多肽、包括构成神经调节素的抗原性部分的氨基酸序列的合成多肽、其功能等效变异性、或进一步包括前述氨基酸序列的融合多肽；
和

10 b) 与具有任何如图 1-4 所示的核苷酸序列的 DNA 杂交的 DNA 编码的蛋白质。

另外，按照本发明的蛋白质能与存在于外周神经细胞中的“14-3-3”蛋白结合并具有下面的 a)或 b)项的特征：

15 a) 多肽，例如具有如图 5 或 6 所示的氨基酸序列的多肽、具有在如图 5 或 6 所示的氨基酸序列中缺失、替代或添加和/或插入至少一个氨基酸的氨基酸序列的多肽、包括构成神经调节素的抗原性部分的氨基酸序列的合成多肽、其功能等效变异性、或进一步包括前述氨基酸序列的融合多肽；
和

20 b) 与具有任何如图 1-4 所示的核苷酸序列的 DNA 杂交的 DNA 编码的蛋白质。

本发明进一步包括蛋白质的免疫活性域或具有该域的片段。

按照本发明的多肽还包括具有如图 7 或 8 所示的氨基酸序列的多肽、具有在如图 7 或 8 所示的氨基酸序列中缺失、替代或添加和/或插入至少一个氨基酸的氨基酸序列的多肽、包括构成神经调节素的抗原性部分的氨基酸序列的合成多肽、其功能等效变异体或进一步包括前述氨基酸序列的融合多肽。

按照本发明的包含任何前述的用于免疫分析的蛋白质的试剂用来检验识别该蛋白的抗体。

另外，所说的用于免疫分析的试剂被用来评价艾萨克综合症或其它外周神经损伤的诊断或治疗效果。

按照本发明的包含与任何前述的用于免疫分析的蛋白质反应的抗体的试剂用于分析该蛋白。

另外，该用于免疫分析的试剂被用来评价艾萨克综合症或其它外周神经损伤的诊断或治疗效果。

而且在该用于免疫分析的试剂中，任何被分析的蛋白质存在于外周神经细胞中。

本发明提供一种分析存在于受检者体液中并与任何该蛋白质反应的抗体的神经调节素的检测方法。

按照本发明的筛选与任何该蛋白质结合的配体的方法，包括以下步骤：

- a) 使配体的候选化合物与上述的蛋白质接触；及
- b) 选择具有与该蛋白质的结合活性的候选化合物。

本发明提供一种根据抗配体与通过该筛选方法使用该蛋白质作为抗配

体获得的配体的亲和力测定任何该蛋白的检验方法。

按照本发明的筛选可抑制任何该蛋白质与配体结合的化合物的方法，包括下述步骤：

- a) 在候选化合物存在的情况下使该蛋白质与配体接触；及
- 5 b) 选择具有抑制该蛋白质与该配体结合的活性的候选化合物。

按照本发明的化合物还包括可通过该筛选方法获得的化合物。

按照本发明的神经调节素抑制剂包含可通过该筛选方法获得的化合物。

按照本发明的治疗外周神经损伤的药物包含可通过该筛选方法获得的化合物。

按照本发明的抗体为能够与任何该蛋白质结合的抗体。

该抗体包括单克隆抗体。按照本发明的另一单克隆抗体为抗引起外周神经损伤的抗体的单克隆抗体。

按照本发明的方法包括通过设定该蛋白质或编码该蛋白的基因的表达作为标记检测或分离表达前述蛋白质的细胞的方法。该方法包括这种情况，即其中该细胞为外周神经细胞。

按照本发明的检测或分离表达任何该蛋白质的细胞的试剂，包含上述的抗体。

按照本发明的试剂包括含有具有可与该DNA或其部分、或其转录RNA的杂交的核苷酸序列，并检测该DNA或该RNA的试剂。

按照本发明的非人类转基因脊椎动物是其中该 DNA 的表达经过改变或诱导了此种改变的非人类转基因脊椎动物。

该动物是例如外周神经损伤模型动物。

按照本发明的非人类基因敲除脊椎动物是其中该内源 DNA 的表达受到抑制的非人类脊椎动物。

该非人类基因敲除脊椎动物还包括其中另一基因被敲除的非人类脊椎动物。

按照本发明的细胞包括任何从前述的非人类脊椎动物获得的细胞。

按照本发明的筛选方法还包括筛选提高或降低如图 1-4 所示的 DNA 的内源启动子的活性的化合物的方法，包括下述步骤：

a) 在所测试的化合物存在的情况下检测如图 1-4 所示的与 DNA 的内源启动子下游结合的基因的表达；及

b) 选择增加或降低该表达的化合物。

另外，按照本发明的筛选方法包括筛选提高或降低如图 1-4 所示的 DNA 的内源启动子的活性的化合物的方法，包括下述步骤：

a) 将所测试的化合物应用于非人类脊椎动物或从该动物获得的细胞；及

b) 选择增加或降低敲入的基因的表达的化合物。

按照本发明用神经调节素免疫的动物是用于研究艾萨克综合症或其它外周神经损伤和筛选具有改善艾萨克综合症或其它外周神经损伤的作用的物质的用神经调节素免疫的动物。

按照本发明，免用神经调节素免疫以用于筛选改善受抑制的 VGKC 功能、神经末端的信号传导异常或疼痛性肌肉痉挛的蛋白质或非蛋白类物质。

5 本发明提供用于通过应用神经调节素、其相关蛋白或其它的引起外周神经损伤的抗体作为标记检测与单克隆抗体的特异性结合的诊断标志，并进而测定从受试者取得的样本中的神经调节素、其相关蛋白或引起外周神经损伤的抗体的水平以诊断艾萨克综合症或其它外周神经损伤。

本发明提供为诊断艾萨克综合症或其它外周神经损伤提供数据的检验方法，其中测定从受试者取得的样本中的神经调节素或引起外周神经损伤的抗体的水平。

10 本发明提供用于消除由于神经调节素或引起外周神经损伤的抗体的存在造成的麻木以进行治疗的血液过滤材料，其中通过血液透析使血液中的神经调节素抗体或引起外周神经损伤的抗体与固定在该过滤材料上的单克隆抗体结合，因而减少身体内的神经调节素抗体或引起外周神经损伤的抗体。

15 本发明提供用于在人体或其它动物中刺激对艾萨克综合症或其它外周神经损伤的免疫反应的疫苗组合物，该组合物用于刺激对与可接受的药用载体一起包含在组合物中的至少一种上述的多肽的免疫反应，或者刺激对被插入到包含在该组合物中的病毒细胞(virus cell)或宿主细胞中的核酸分子编码的多肽的免疫反应。

20 本发明提供包含如权利要求 31 或 32 所述的单克隆抗体的细胞培养介质，用于通过从具有外周神经损伤的患者分离的外周神经和肌肉系统细胞的孵育去除引起外周神经损伤的抗体在体外繁殖成为外周神经的细胞，因而导致病因抗体与该单克隆抗体特异性结合。

附图简要说明

图 1 为人神经调节素编码 cDNA (短) 的核苷酸序列。

图 2 为人神经调节素编码 cDNA (长) 的核苷酸序列。

图 3 为鼠神经调节素编码 cDNA (短) 的核苷酸序列。

5 图 4 为鼠神经调节素编码 cDNA (长) 的核苷酸序列。

图 5 为人神经调节素 (短) 的氨基酸序列。

图 6 为人神经调节素 (长) 的氨基酸序列。

图 7 为鼠神经调节素 (短) 的氨基酸序列。

图 8 为鼠神经调节素 (长) 的氨基酸序列。

10 图 9 为通过蛋白质印迹法检测神经调节素和估算其分子量的照片, 也显示了大鼠 (PC-12) 和 NB-1 神经细胞 (左侧) 的结果。66KDa 相应于神经调节素 (长), 而 44KDa 相应于神经调节素 (短)。

15 图 10 为通过用人神经调节素免疫兔诱发外周神经损伤的照片。A 表示保持自然睡姿的正常兔, B 表示经过免疫诱发的外周神经损伤的兔, 其有一后肢麻痹并表现出步行困难。

图 11 为通过以神经调节素免疫引起兔肌肉组织异常的照片。A 表示正常兔的肌肉组织, 而 B 表示具有外周神经损伤的兔的肌肉组织。所示的为放大 100 倍的 HE 染色获得的结果。

20 图 12 为使用人神经调节素检测人血清中升高的抗神经调节素抗体的结果的图片。辣根过氧化物酶偶联-抗人免疫球蛋白 M (anti-human IgM-HRP)

被用作二级抗体。A表示具有外周神经损伤的患者M的血清，B表示具有外周神经损伤的患者A的血清，而C表示正常人的血清。

本发明的详细说明

本发明提供了一种具有下述特性的外周神经细胞蛋白质，

5 其中该蛋白质

a) 在艾萨克综合症患者或其它具有外周神经损伤的患者的外周神经细胞中找到；

b) 与在患者血液中找到的一种抗体反应；

c) 兔免疫引起类似于艾萨克综合症症状群的症状；及

10 d) 按 SDS-PAGE 法测定，其分子量约为 66kDa。

本发明将按照编码神经调节素的 cDNA、相关核酸分子、神经调节素、神经调节素的生理功能、关联蛋白、药用材料及在动物体的应用的顺序进行详细说明。

15 在本说明书中，“外周神经损伤”表示除艾萨克综合症外的外周神经的异常。在本文中，如果必要该术语在广义上包括艾萨克综合症。

“VGKC”是电压门控钾通道的缩写，其意指电压依赖性钾通道。

在“神经调节素和其关联蛋白”和“神经调节素或其关联蛋白”中，“其关联蛋白”也包括抗神经调节素的抗体。

编码神经调节素的 cDNA

编码神经调节素的 cDNA 可通过使用艾萨克综合症患者的血清应用免疫筛选方法于相当于人类基因组的 cDNA 库而制备, 更具体地说, 该从如 NB-1 细胞的神经细胞获得的 cDNA 库通过用常规方法分离 mRNAs 和用已知的技术将该 mRNAs 整合入 λ 载体等, 并在该 mRNA 混合物上进行反转录而创建。该包含抗神经调节素抗体的血清被应用于该 cDNA 库以确定包含表达神经调节素的 cDNA 的克隆。

在本发明的发明人使用艾萨克综合症患者的血清以获得编码如上所述的新型蛋白质的 cDNA 而完成该免疫筛选的过程中, 发现了具有不同链长度的两种类型的 cDNA。长的编码该蛋白质的 cDNA 将被称作“长 cDNA”而首先得到的短的编码 386 个氨基酸的蛋白质的 cDNA 将被称作“短 cDNA”。

图 1 和图 2 显示了编码该神经调节素的 cDNA 的“短 cDNA”和“长 cDNA”的核苷酸序列。

按照本发明的 DNA 编码神经调节素或包括如图 1 或 2 所示的整个核苷酸序列。该 DNA 包括剪接之前的携带遗传信息的基因组结构基因的 DNA 和含有起始密码子和终止密码子的 DNA。

另外, 编码神经调节素的核酸分子, 包括至少一个与如图 1 或 2 所示的整个或部分核苷酸序列基本一致的核苷酸序列, 或包括与任何该序列基本同源或能与任何该序列杂交的序列, 也属于本发明的核酸。按照本发明的核酸分子可以是单链或双链 DNA、cDNA 或 RNA。

该“基本同源序列”包括具有大约 50%或以上, 如 60%或以上的序列

同一性的序列、功能等效的等位基因变异序列、及通过替换、增加和/或缺失至少一个核苷酸修饰的相关序列，相似地，“功能等效”意指相似于显示神经调节素相同功能的多肽。

能与图 1 和图 2 所示的序列杂交的核酸分子，或上述定义的基本同源序列或功能等效序列也包含在本发明的范围之内。在此所用的“杂交”被定义为在非严紧(non-stringent)条件($6 \times \text{SSC}$, 1%SDS, 10%Dextran, 100g/ml 鲑精 DNA, 室温)下被结合及在低严紧条件($2 \times \text{SSC}$, 室温, 优选 $2 \times \text{SSC}$, 30°C)或高严紧条件, 例如, $2 \times \text{SSC}$, 65°C 下被洗脱的序列。SSC 为标准柠檬酸缓冲液(Standard Saline Citrate)的缩写, 意指 0.15M NaCl 和 0.015M 柠檬酸钠, pH 7.2。

通过应用已知的遗传工程技术方法, 也可能创建包括至少一个编码抗神经调节素抗体的多肽的核苷酸序列和从如图 1 或 2 所示的神经调节素编码序列整合了编码至少一个抗原决定簇的域的核酸分子。这样的核酸分子也包括在本发明中。

为检测编码神经调节素的结构基因及从其中获得的 DNA、从其中获得的 cDNA 或包含至少一个与整个或部分如图 1 或 2 所示的核苷酸序列基本一致的核苷酸序列的 DNA, 根据应用 DNA 链或 RNA 链杂交的原理, 优选使用与任何上述序列基本同源或功能等效的序列、或能与任何该序列和从该 DNA 转录的 RNA 杂交的序列、含有这些核酸分子的试剂。此外, 这些核酸分子也可被用作寻找 PCR 引物或同源序列部分的杂交探针。

一般, 该探针可用放射性同位素标记, 更优选为非放射性同位素如荧光染料或化学发光通过 5'端标记方法、切口平移方法、随机引物方法等标

记。用于检测该 DNA 或其转录 RNA 的试剂优选被用作原位杂交、DNA 印迹杂交、RNA 印迹杂交、噬菌斑杂交、群体杂交等的探针。

这样的探针也优选通过核酸水平上的杂交用来从基因组库或 cDNA 库中寻找目标克隆。

5 神经调节素

按照本发明的神经调节素为具有如图 5 或 6 所示的氨基酸序列的蛋白质，或由 cDNA、与该 cDNA 或能与任何上述的核苷酸序列杂交的 DNA 一致的基因编码的蛋白质。该神经调节素具有这样的活性，即与在上述患者的血液中含有的抗体结合，更进一步，可与外周神经细胞中的“14-3-3”
10 蛋白偶联。

该神经调节素可通过对艾萨克综合症患者或其它具有外周神经损伤的患者的血清进行免疫筛选获得，或者，如果已获得该 cDNA，该神经调节素也可采用已知的重组 DNA 技术通过转录和翻译该 cDNA 而制备。

另外，按照本发明的蛋白质包括具有这样的化学结构的多肽，即具有
15 如图 5 或 6 所示的氨基酸序列的多肽、具有在如图 5 或 6 所示的氨基酸序列中缺失、替换或添加和/或插入至少一个氨基酸的氨基酸序列的多肽、包含构成神经调节素的抗原性部分的氨基酸序列的合成多肽、其功能等效变异的多肽和进一步包括它们的氨基酸序列的融合多肽，这些多肽也被包括在本发明中。此外，按照本发明的蛋白质除生物来源的蛋白质外，可通过
20 部分或全部的人工合成或通过从生物来源获得的蛋白质的修饰获得。按照本发明生物来源的蛋白质还包括根据重组 DNA 技术制得的蛋白质。

在此使用的“多肽”同时包括具有全长度序列的蛋白质和具有与该蛋白质相比较短序列的多肽。因此，神经调节素的免疫活性域或具有该域的片段也包括在本发明中。“免疫活性”意指该域包含相对于指向该蛋白质的抗体的抗原决定部位并具有抗原性。因此，包含这样的域的片段保持了抗原性。相似地，包含构成神经调节素的抗原性部分的氨基酸序列的合成多肽也被包括在按照本发明的蛋白质中。

上面所用的关于多肽的氨基酸序列的术语“功能等效”是指氨基酸序列经过缺失、替换、增加和/或插入至少一个氨基酸的修饰，或通过由例如磷酸化或脱磷酸作用、葡糖基化、脱葡糖基作用等化学修饰氨基酸残基的侧基另外获得氨基酸序列，且不管氨基酸序列的改变而保持与神经调节素的作用或活性基本相同的情况。这样的功能等效变体在某些情况下作为自然生物变异产生或者也可通过采用已知的技术制造。例如，功能等效的重组多肽可采用已知的技术如在特定位点的诱变、非特定位点的诱变、酶切和/或氨基酸的连接等产生。

该蛋白质，即神经调节素和其关联蛋白可被用于分析识别和结合到该蛋白质上的抗体。为达到这一目的，用于免疫分析的试剂包括任何上述的蛋白质，且可通过抗原-抗体的反应和测定与该反应有关的任何实体检测样本中的抗体。对于检测实体，适当地使用已知的检测手段如除各种包括荧光或化学发光的光谱法外的免疫-抗体方法、采用放射性的方法等是可能的。

因为这样的用于免疫分析的试剂用来检测和分析特定的作为疾病标志的抗体与神经调节素或其关联蛋白的复合，它也可被用于诊断。更具体地说，使用该试剂诊断艾萨克综合症或其它外周神经损伤，或者通过测定从

受试者获得的样本中特定的抗神经调节素抗体或造成外周神经损伤的抗体的水平评价治疗效果也是可能的。

5 在另一实施方式中，为检测产生抗体的融合细胞，即在下面描述单克隆抗体的生产中有效地从大量的融合细胞中检测产生特定目标抗体的融合细胞，可能使用该试剂。例如，蛋白质如作为抗原的神经调节素被固定到固相载体上而因此与其结合的融合细胞上清液中的抗体被检测到。

10 能够与神经调节素或其关联蛋白结合的物质或具有可与其结合的配基的化合物可用作控制神经调节素的功能的物质，包括抗体和可被用于分析的物质。此外，也可能使用对抗神经调节素抗体的产生有抑制作用的化合物、可能影响抗神经调节素抗体的活性的化合物或能阻止抗体与神经调节素的偶联的化合物。这些化合物可能在艾萨克综合症或其它外周神经损伤中显示某些药理学作用。

优选，选择这样的物质的筛选方法包括下述步骤：

- 15 a) 使配体的候选化合物与神经调节素或其关联蛋白接触的步骤；及
- b) 选择具有与该蛋白质的结合活性的候选化合物的步骤。

为分析该蛋白质，它可通过其与能用该蛋白质作为抗配体的筛选方法获得的配体的特异性结合进行测定。

另外，优选筛选抑制所说的蛋白质与其配体的结合的化合物的方法应包含下述步骤：

- 20 a) 在候选化合物存在的情况下使神经调节素或其关联蛋白与该配体

接触的步骤；及

b) 选择具有抑制该蛋白质与其配体的结合活性的候选化合物的步骤。

该配体或可通过该筛选方法获得的化合物可作为神经调节素或其关联蛋白的抑制剂。因此，通过使用神经调节素或其关联蛋白的结合，由筛选
5 获得的化合物可被用作治疗外周神经损伤，包括艾萨克综合症的药物。

cDNA 编码鼠神经调节素

通过杂交克隆从鼠 cDNA 库分离编码鼠神经调节素的 cDNA 是可能的。为达到这一目的，也可能使用全长度序列的神经调节素 cDNA 作为探针，因而筛选包含阳性克隆的空斑。

10 图 3 和图 4 显示被分离和测序的编码鼠神经调节素的 cDNA 的核苷酸序列。

按照本发明的 DNA 包括编码鼠神经调节素的 DNA 或包含全部如图 3 或 4 所示的核苷酸序列的 DNA。另外，本发明还包括编码鼠神经调节素、含有至少一个与全部或部分如图 3 或 4 所示的核苷酸序列基本相同的核苷酸序列、与任何该序列基本同源或包含能与任何该序列杂交的序列的核酸
15 分子。按照本发明的核酸可能为单链或双链 DNA、cDNA 或 RNA。

“基本同源”序列包括具有大约 50%或以上，如 60%或以上的序列同一性的序列、功能等效的等位基因变异序列、及通过替换、增加和/或缺失至少一个核苷酸修饰的其相关序列，“功能等效”意指具有编码显示与神经
20 调节素相同功能的多肽的序列。

能与图 1 和图 2 所示的序列杂交的核酸分子，或上述定义的基本同源序列或功能等效序列也包含在本发明的范围之内。在此所用的“杂交”定义如上。

5 相似地，通过应用已知的遗传工程技术方法，也可能创建包括至少一个编码抗神经调节素抗体的多肽的核苷酸序列和从如图 3 或 4 所示的神经调节素编码序列整合了编码至少一个抗原决定簇的域的核酸分子。

上述的编码人神经调节素 DNA 或核酸分子的性质、应用等精确地应用于编码鼠神经调节素和其关联蛋白的核酸。

鼠神经调节素

10 按照本发明的鼠神经调节素为具有如图 7 或 8 所示的氨基酸序列的多肽。除鼠神经调节素之外，本发明的多肽进一步包括具有以下形式的多肽，即具有在如图 7 或 8 所示的氨基酸序列中缺失、替换或添加和/或插入至少一个氨基酸的氨基酸序列的多肽、包含构成神经调节素的抗原性部分的氨基酸序列的合成多肽、它们的功能等效变体或进一步包含它们的氨基酸
15 序列的融合多肽。在此使用的“多肽”和“功能等效”定义如上。

上述的编码人神经调节素的性质、应用等精确地应用于鼠神经调节素和其关联蛋白。

神经调节素和神经调节素基因的生理功能

20 人类基因组包含具有关于本发明人通过应用存在于艾萨克综合症患者的血清中的相关抗体的免疫筛选方法新发现的神经调节素蛋白的氨基酸序

列的信息的结构基因，其定位、表达生理和控制功能的详细情况还不清楚。至于是否艾萨克综合症或其它外周神经损伤由神经调节素的过度表达导致或由异位表达衍生引起的问题还需要进一步的阐明，还需要分析神经调节素及其抗体与外周神经损伤之间的关系。

- 5 人神经调节素还是一种能在人类以外的动物免疫诱发艾萨克综合症症状的蛋白质，可能使用任何产生免疫反应的动物，如灵长类、绵羊、兔、大鼠、小鼠等。

10 例如，在兔的情况中，带 GST 的融合蛋白通过使用含 511 个氨基酸残基的全长神经调节素制得，然后以该融合蛋白作为抗原对兔进行免疫。在接种后约六个月，观察到与艾萨克综合症症状类似的外周神经损伤的诱发，例如，后肢麻痹。在以神经调节素免疫的兔的肌肉中，肌细胞的大小出现与正常肌肉组织不同的不均匀，且观察到神经变性。

15 在艾萨克综合症患者中，神经调节素基因的表达被加强了以至于对编码的神经调节素的抗体的血液水平因而上升。该基因表达的原因、神经调节素的生理功能及与艾萨克综合症的疾病状态的关系还不清楚。由于抗神经调节素抗体的产生也增加，在自身免疫性疾病后果的基础上也很可能引起外周神经损伤。综合这些观察或实验的结果，该新发现和鉴定的神经调节素是一种与艾萨克综合症或其它外周神经损伤紧密联系的蛋白质，这一点已得到确认。

20 鼠神经调节素的 cDNA 与相应的人 cDNA 的核苷酸序列具有 85% 或以上的同源性。在得自鼠神经调节素 cDNA 的氨基酸序列水平中，未发现其它的在同源性上的因素且其功能也还不清楚。鼠神经调节素基因也以与人

神经调节素基因相同的方式发挥作用。可以设想，如果用人神经调节素免疫鼠，类似于艾萨克综合症的外周神经损伤，如出现麻痹的后肢，被诱发。

参照基因的表达，增加或降低该 DNA 的内源启动子的活性的化合物可通过包括下述步骤的方法筛选：

- 5 a) 在所测试的化合物存在的情况下检测与 DNA 的内源启动子下游区域结合的基因的表达；及
- b) 选择增加或降低该表达的化合物。

人神经调节素 cDNA 的核苷酸序列被转换成相应的氨基酸序列以进行模体研究，结果，很清楚，主模体缺乏但在 C 端侧出现脂类修饰的位点。
10 基于通过使用神经调节素的 C 端侧的部分进行免疫兔后肢出现麻痹和更多的存在于出现麻痹的患者的血清中的对神经调节素的抗体被发现是对神经调节素的 C 端区域的抗体的事实，该神经调节素是一膜蛋白且至少其 C 端部分在膜中起作用。

从本发明人的研究中，已经证明神经调节素的 C 端部分被结合到
15 “14-3-3 蛋白”上。该“14-3-3 蛋白”出现在细胞中，且可识别具有磷酸化的丝氨酸残基的蛋白质，而且其作为信号传导的各种调质的作用已得到确认。因此，能与代替神经调节素的或与神经调节素竞争的“14-3-3 蛋白”结合或相互反应的蛋白质或非蛋白质物质可在“14-3-3 蛋白”上产生类似于对神经调节素的效应。很可能这样的蛋白质或非蛋白质物质可在艾萨克综合
20 症或其它外周神经损伤中显示某些药理学作用。

据报道，在某些有艾萨克综合症或其它外周神经损伤的患者的血清中

检测到 VGKC 的抗体。VGKC 的功能性异常被认为与这些疾病情况有关，另外，从本发明人的研究中可以清楚地看出，各种抗神经调节素的抗体也出现于这些患者的血清中，特别是，大量的患者具有抗神经调节素的 C 端区域的抗体。相似地，这些抗体也被确认涉及到与神经调节素的生理功能相关的症状。基于这种理由，可与这些抗体结合的抗体、能对该抗体的产生发挥抑制作用的化合物、可影响该抗体作用的化合物、能阻止该抗体与神经调节素结合的化合物等可能在艾萨克综合症或其它外周神经损伤中显示某些药理学作用。

相关核酸分子

按照本发明通过重组 DNA 技术获得的整合神经调节素基因的反义 RNA 和反义 DNA、mRNA、cDNA 或其相关核酸分子，还有核酶、粘粒等也被包括在本发明的范围内。如果需要，该重组 DNA 和核酸分子也能被用在各种能在基因诊断方法的建立、基因治疗和药物开发中应用的基因克隆操作中。

· 反义 RNA 和反义 DNA

因为通过携带神经调节素的翻译信息的 mRNA 链与其反义互补链、或对该 cDNA 或上述核酸分子的反义 RNA 或反义 DNA 杂交产生的双链 RNA 或 DNA 具有通过与其互补 mRNA 杂交抑制翻译的能力，因而抑制了相应基因的表达，所以它可被应用于反义药物治疗和敲除小鼠的建立。

在反义药物疗法中，反义 RNA 和反义 DNA 被用于在基因水平上说明疾病始发的机理、治疗方法的进展等。另外，为控制神经调节素基因的表达

达也可能使用该 RNA 和 DNA。更特别地为了抑制目标基因的表达，反义 RNA 可被注射到细胞中，或者向其中引入用以建立反义 RNA 的 DNA。

· 核酶

5 本发明还包括，在其酶活性已阐明的核酶中，预定用于特异性切割神经调节素的 RNA、从上述 cDNA 或核酸分子转录的相关 RNA、或从其一部分转录并通过化学合成制得的相关 RNA、或具有该酶活性位点和 RNA 切割活性的核苷酸序列的寡 DNA 的可选择的核苷酸序列的核酶。

· 粘粒

10 因为整合神经调节素基因的环状 DNA、其 DNA 片段或其相关核酸，再加上必要的成分，如从质粒获得的复制起点、λ 噬菌体的 cos 部位，能够以与质粒相同的方式复制，所以可被用作载体。这样的人工核酸粒子能在其中整合相对较大的 DNA 片段，因此，为克隆的目的，将该人工核酸粒子有效地引入细菌如大肠杆菌中是可能的。另外，该人工核酸粒子也适用于基因库的制备。

15 · 表达载体和克隆载体

包含转化核酸的微生物细胞如原核细胞或真核细胞可被用于大量所需要的蛋白质的表达。

20 按照本发明编码神经调节素的核苷酸序列被克隆以便通过适当地应用一组已知的技术和表达系统，例如，原核细胞如大肠杆菌或枯草杆菌中的表达系统、真核细胞如酵母或转化哺乳类细胞中的表达系统、转基因哺乳

动物中的表达系统等，进行其表达。

优选可使用制备与神经调节素相关的合成多肽的方法，包括在该多肽被表达的条件下培养整合了核酸分子的真核细胞或原核细胞，并收集这样产生的多肽的步骤。

5 如上所述，本发明的范围包括了包含按照本发明的核酸分子或核苷酸序列的克隆载体和表达载体。这样的其中阅读码框和按照本发明的核酸分子被恰当地连接的表达载体整合了适当的控制序列，例如，翻译控制元素如起始密码子和终止密码子和转录控制元素如启动子操纵区、核糖体结合部位和终止序列。

10 按照本发明的载体的例子包括在重组 DNA 技术领域中所熟知或已在该技术的文献中被描述的质粒、噬菌体、病毒(包括真核病毒)等，这些载体能被用在各种众所周知的表达系统中。优选的病毒载体包括杆状病毒、腺病毒、牛痘病毒等。

15 为通过使用各种众所周知的技术包括按照本发明的核酸分子或核苷酸序列的表达，载体或粘粒可被插入到原核细胞或真核细胞中，或者，为建立转基因动物，可以制备把该载体或粘粒保持在生殖细胞系或体细胞中的转化株。

20 另外，本发明还包括具有按照本发明的核酸分子或多核苷酸分子并被转化或转染的真核或原核宿主细胞或转基因微生物。为生产这些转化体等，可以使用已知的转化技术或转染技术。

如果神经调节素需要进行翻译后的修饰如形成二硫键、糖基化或程度

不同的脂质附着，哺乳动物宿主细胞可很好地复制抗原和抗原决定部位的原始形态。因此更优选为哺乳动物细胞表达系统。更具体地说，真核表达系统可进行翻译后的修饰，而大肠杆菌很难复制抗原的原始形态且可能产生不溶的蛋白质。可优选用于该目的的动物细胞的例子包括人或动物的成纤维细胞或骨髓瘤细胞系，例如 Hela-人细胞系、BHK-新生仓鼠肾细胞、VERO-猴肾细胞系、FR3T3-Fisher 大鼠成纤维细胞、NIH3T3-小鼠成纤维细胞系、C127I-小鼠乳腺癌细胞系、CV-1-非洲青猴肾成纤维细胞、3T6-小鼠胚胎成纤维细胞、L 细胞-小鼠细胞系、CHO-中国仓鼠卵巢细胞系、NSONSI-SP2 和其它小鼠骨髓瘤细胞系、YB2/0 和 Y3 小鼠骨髓瘤细胞系、大鼠骨髓瘤细胞系等。

各种适用于不同种类的哺乳动物细胞系的载体已为人所知且一般包括操纵性地连接到编码神经调节素或其片段的核苷酸序列上的启动子和/或增强子。这种适当的启动子的例子包括 SV40 起始或后期启动子，例如，PSVL 载体、巨细胞病毒(CMV)启动子、小鼠金属硫蛋白(metallothionine) I 型启动子、小鼠胸腺瘤病毒 LTR(长末端重复)等。该载体携带适宜的标志，例如其基因，如二氢叶酸还原酶或谷氨酰氨合成酶的基因。

宿主细胞的转染可通过使用标准的现有技术进行，例如为达到这一目的，已建立了磷酸钙法、用 DEAE-右旋糖苷或聚凝胺取代磷酸钙的方法、原生质体融合法、红细胞影融合法、脂质体融合法或脂质转染法、直接显微注射法和对哺乳动物细胞系使用基因炮(gene cannon)或电穿孔的转染法。一般而言，线性 DNA 比环状 DNA 更容易引入。

关联蛋白

涉及神经调节素的合成多肽可被用于抗体产生、疫苗生产等，这将在下面按神经调节素的相同方式描述。合成多肽可通过在包含与表达控制序列操纵性连接并包括上述的核苷酸序列的重组 DNA 的宿主细胞或包含携带该重组 DNA 分子的媒介或载体的宿主细胞中的表达而生产，或者，该多肽也可通过向宿主细胞直接注射本发明的裸 DNA 分子而表达。

这样表达的合成多肽可以是包含显示全部或部分神经调节素的免疫原性的片段的融合多肽或进一步由与其融合的重组分子的 DNA 编码的额外融合多肽。例如，按照本发明需要制备这样的合成神经调节素，其与蛋白质如谷光甘肽-S-转移酶、磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶或 HB 核心(乙型肝炎核心)抗原，或包含另一多肽的融合蛋白质偶联。大多数这样的融合蛋白质是通过其中两个编码序列被结合到一个已调谐的阅读码框的重组基因的表达而形成的，或者，该多肽也可通过体外的化学方法结合而成。如此融合或杂交衍生物也被包括在本发明中且该合成多肽可通过使用化学方法如现有的 Merrifield 固相合成法生产。

15 · 抗体蛋白质

对神经调节素和其关联蛋白的抗体在艾萨克综合症患者或具有其它外周神经损伤的患者体内产生，因此，各种对神经调节素的抗体也被发现存在于这些患者的血清中。特别是，在本发明的发明人的研究中，在许多患者中观察到指向 C 末端侧部分的抗体，这些抗体也很可能涉及与神经调节素的生理功能有紧密联系的症状。因此，能被结合到这些抗神经调节素抗体上的抗体可能在艾萨克综合症或外周神经损伤中具有某些药理学功能。

该抗体可通过用作为抗原的蛋白质接种动物并免疫该动物而制备。用

于这一目的的动物的例子包括广泛使用的兔、绵羊、小鼠、大鼠等。但是，所有产生的抗体是从非人动物获得的多克隆抗体，因此对于人来说是从外来物质。

在这些抗体中，特别有用和优选的是单克隆抗体，是能与单个抗原决定部位特异性结合的相同抗体。更具体地说，本发明的范围包括神经调节素的单克隆抗体、VGKC 抗体的单克隆抗体、对引起外周神经损伤的抗体或其它关联蛋白的单克隆抗体等。

在制备这些单克隆抗体的过程中，也可以使用现有的制备和克隆从用作抗原的神经调节素免疫的动物脾获得的淋巴细胞与具有 HAT 敏感性的骨髓瘤细胞的杂交瘤的细胞融合技术或使用已知的重组 DNA 技术，以进行大规模生产。

为获得人化的单克隆抗体，嵌合或人化的抗体通过包括人抗体 cDNA 与取自从小鼠、大鼠等获得的动物细胞的抗体 cDNA 的融合在内的重组 DNA 技术生产，也可以采用通过使用人派生细胞和肿瘤细胞克隆、小鼠肿瘤细胞和人细胞的融合及使用转基因小鼠生产人抗体的方法。

该抗体一般应用的例子包括测试药物、诊断药物、治疗药物、研究用试剂、检验用试剂、用于免疫筛选等的涉及到神经调节素、其关联蛋白和“14-3-3 蛋白质”的抗体。这些抗体具体应用的例子包括用于测定神经调节素或其关联蛋白的免疫检验的试剂，它包括与神经调节素或其关联蛋白反应的抗体或特别根据该事实，即该抗体与神经调节素等结合是可检测的。

“可检测”意指已知的检测手段如免疫抗体法或使用放射性的方法以及各种光谱方法可适当地采用，特定的应用方式的例子包括放射免疫测定(RIA)

法、酶联免疫测定法(ELISA)等。在RIA中,以 ^{125}I 或 ^{131}I 等标记的抗体被固定到固相载体上且测定其放射性。另外,在ELISA中,抗体按同样的方式被固定到载体上且附加碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶等的二级抗体被添加以进行酶反应,而最终测定着色或荧光。

- 5 另外,作为应用该抗体的这种具体实施的另一实例,可设计诊断艾萨克综合症或外周神经损伤和为评价治疗效果提供数据的测试方法。这种测试方法特征在于测定从受试者取得的样本中神经调节素或其关联蛋白、或者神经调节素抗体或引起外周神经损伤的抗体的水平。

10 另外,通过使用神经调节素或其关联蛋白、或者引起外周神经损伤的抗体作为标志检测与上述抗体的特异性结合,因此在从受试者获得的样本中神经调节素或其关联蛋白的水平、或者引起外周神经损伤的抗体的水平被测定。所获得的结果被用于诊断艾萨克综合症或其它外周神经损伤,或者评价治疗效果。参考这些分析试剂,被分析的神经调节素、其关联蛋白等最初出现在神经细胞中。但是,通过分析出现在受试者体液中的抗体,
15 也可能检测神经调节素或其关联蛋白。

20 通过设定编码神经调节素或其关联蛋白的基因的表达作为线索,可能检测或分离产生所说的蛋白质的细胞。通过使用抗神经调节素或其关联蛋白的抗体,优选其单克隆型抗体作为例如应用流式细胞仪方法的检测手段,可能分离或检测表达这些蛋白质的细胞。作为检测或分离用的试剂,该抗体,更优选为单克隆抗体包括通过附加例如荧光物质作为标记获得的抗体。更明确地说,检测是通过观察结合到细胞上的抗体的荧光激发进行的,而分离是使用具有自动分类功能的细胞分选仪进行的。

通过采用这种方法，可以在细胞群体中特异性地检测或分离表达神经调节素的外周神经细胞。例如通过采用这种方法，可能从将在下面说明的非人类转基因脊椎动物或非人类基因敲除脊椎动物获得的细胞中检测和分离外周神经细胞，这些细胞为检查神经调节素基因的表达和控制提供了有用的材料。

本发明还包括含有按照本发明的核酸分子或核苷酸序列并被转化或转化的真核或原核细胞，或转基因微生物。另外，本发明还包括产生单克隆抗体的B细胞与肿瘤细胞的融合细胞。该抗体和流式细胞仪被结合使用，且也可以被用来分离目标的转化体、融合细胞等。

10 医用材料的应用

按照本发明的神经调节素和其关联蛋白可被用于分析、临床测试、诊断和治疗，而且可被用在各种医用材料上，例如血液过滤材料、细胞培养基质、药物传递系统的载体、疫苗等。尽管应用的具体方式将作为实施例加以说明，但本发明并不局限于它们。

15 如果血液中的抗神经调节素抗体或引起外周神经损伤的抗体被结合到上述固定在过滤材料上的单克隆抗体上，且经过血液的透析过滤，过滤后的血液再输回到患者体内，降低体内神经调节素抗体或引起外周神经损伤的抗体的量是可能的。这种全血透析的血液交换过滤提供了一种缓解由神经调节素或其抗体、或引起外周神经损伤的抗体引发的麻痹的治疗方法。

20 为此目的本发明还提供了结合该抗体的血液过滤材料的应用。

作为另一种实施方式，还可能设想应用包含特异性地与神经调节素反

应的单克隆抗体的细胞培养介质接种从具有外周神经损伤的患者分离的外周神经和肌肉系统细胞以使其与涉及外周神经损伤原因的抗体结合，因而去除该抗体，以在体外繁殖作为外周神经的细胞。

5 人化抗体没有对人的抗原性，因此可以设想，通过直接结合到与外周神经损伤包括艾萨克综合症的原因有关的神经调节素或其它蛋白质、生物成分等上从而使其失去作用，应用这种人化抗体作为治疗的手段，或者应用这种人化抗体作为 DDS(药物传递系统)载体以高效地将具有药物效能的有效生物活性物质或化合物输送到目标部位。考虑到反应的均一性，人单克隆抗体可能是特别适宜使用的。

10 按照本发明的疫苗组合物在人体或其它非人类物质中激发对艾萨克综合症或其它外周神经损伤的免疫反应。该疫苗可以包含任何属于本发明范围内的蛋白质的多肽，加上可接受的药用载体以因此激发对该多肽的免疫反应，或包含具有任何上述插入其中的核酸分子的病毒细胞或宿主细胞以因此激发对由插入的核酸分子编码的多肽的免疫反应。

15 该疫苗组合物可按照在疫苗生产领域已知的方法生产。这样的疫苗配方一般可能包括至少一种按照本发明的多肽，加上至少一种适宜的添加剂，例如氢氧化铝、皂角苷、Quil A 或其精制形式、胞壁酰二肽、矿物油、novasom 等，如果恰好是存在至少一种可接受的药用载体或稀释剂的情况。优选的载体的例子包括液体介质如适宜用作向患者引入肽或多肽的媒介的生理盐水溶液。可包含添加剂成分如防腐剂。

20

作为另一种疫苗配方，它还可包含按照本发明的核酸分子被插入其中的病毒、或宿主细胞、或微生物如牛痘病毒、腺病毒或沙门氏菌族。这是

为了激发对由插入的核酸分子编码的多肽的免疫反应。

因此，本发明的另一方面是在人或其它动物中激发对艾萨克综合症或其它外周神经损伤的免疫反应的疫苗组合物的生产过程中使用本发明的核酸分子或多肽的方法。

5 为给予这种疫苗，可随意应用传统的给药途径，例如口服或非口服给药(例如，按任意间隔进行肌肉注射，即每7天至28天进行两次注射)。

动物

10 为研究神经调节素基因及神经调节素的功能和表达控制并在其基础上建立诊断和治疗包括艾萨克综合症的外周神经损伤的方法以发展其治疗方法，疾病模型动物是有用的。更具体地说，按照本发明的外周神经损伤动物模型是能在编码神经调节素的DNA或与如图1或2所示的核苷酸序列或如图3或4所示的核苷酸序列同源或杂交的DNA的表达中发生改变，或能诱导该改变的非人类转基因脊椎动物。

15 较有价值的非人类转基因动物的例子包括非人类脊椎动物，即固有的神经调节素基因DNA或其相关DNA的表达受到抑制的非人类基因敲除脊椎动物和有其它基因被敲除的非人类脊椎动物。所说的其它基因不包括编码神经调节素的基因，而可能是编码外周神经细胞的其它蛋白质，如“14-3-3”蛋白质等的基因。该非人类脊椎动物的种类不受限制。为上面提到的目的，这些动物也可被用作外周神经损伤的模型动物。

20 作为特别优选的非人类脊椎动物，可较容易地生产有基因被敲除的转基因小鼠。除被用于阐明被敲除的基因的功能外，这种小鼠可被广泛地用

于阐明外周神经损伤的机理、建立诊断和治疗方法、开发药物、疫苗测试等。这种转基因小鼠可通过已知的在小鼠受精卵中形成被敲除的基因的反转录 DNA 的方法或通过已知的引入反义 RNA 的反义方法建立。在这些情况下，这种生产可通过使用从小鼠基因组获得的神经调节素基因的目标载体进行，另外，也可以使用胚胎干细胞，即 ES 细胞。

以神经调节素免疫的动物可被用于筛选对艾萨克综合症或其它外周神经损伤有改善效能的药物。这样的动物没有特别限制，而可以是任何诱发免疫反应的种类。为此目的，如兔、绵羊、小鼠和大鼠的动物可被广泛地使用。

例如，在如上所述的以人神经调节素免疫的兔中，抗人神经调节素的抗体在六周前后产生并出现类似于艾萨克综合症的症状。该有类似于艾萨克综合症的症状的兔可被用于检验抗体，如单克隆抗体的功能或疫苗和药物的效能，或筛选阻滞与神经调节素结合的因子的药物、与蛋白质结合以调节其功能的药物、改善对 VGKC 功能的抑制、神经末端的信号传导异常或疼痛性肌肉痉挛的蛋白或非蛋白质，等。

增加或降低与神经调节素基因的表达有关的 DNA 内源启动子的活性的药物可通过不同于在“关联蛋白”一栏中描述的方法的方法进行筛选，该方法包括以下步骤：

a) 将该被测试的药物应用于非人类脊椎动物或从该非人类脊椎动物获得的细胞，及 b) 选择增加或降低被敲入的基因的表达的化合物。

本发明的优点

按照本发明,被认为是艾萨克综合症的关键物质的神经调节素已被鉴定且其结构已被确定,因此,可能生产或制备其单克隆抗体、能够调节该物质功能的药物、可应用于筛选该药物的动物等。通过应用神经调节素、其相关物质和该动物建立外周神经损伤包括艾萨克综合症的测试方法及诊断和治疗方法是可能的。

按照本发明,神经调节素基因的存在已通过其 cDNA 的分离和鉴定得到证明。通过利用神经调节素的抗体或引起外周神经损伤的抗体、单克隆抗体和转基因小鼠,因此提供了研究神经调节素的功能和表达的机理、调节功能等的有力手段,此外,可进行外周神经功能性异常的机理、实体等的说明。

实施例

下面将根据实施例对本发明进行进一步的说明,但本发明的范围不局限于这些说明。

实施例 1

· 被艾萨克综合症患者的血清识别的抗原(神经调节素)的基因克隆

通过使用表达人类基因组相应基因的艾萨克综合症患者的血清抗体的免疫筛选得到编码神经调节素的 cDNA。通过酸性胍/苯酚氯仿(acid guanidine/phenol chloroform)法将全部 RNAs 从人成神经细胞瘤(NB-1)株提取出来,而且, mRNAs 通过使用寡聚脱氧胸腺嘧啶珠(oligo (dT) bead)的亲合色谱法(Anal. Biochem., 162:159, 1987)分离。通过使用 λ ZAP 载体 (STRATSGENE Co., Ltd.), 按照普通方法形成 cDNA 库。通过使用 picoBlue

免疫筛选试剂盒(STRATSGENE Co., Ltd.), 可进行使用患者血清的免疫筛选。由此获得的阳性克隆(噬菌体)通过辅助噬菌体被转换进质粒 pBluescript II SK(+). 该插入到 pBluescript II SK(+)的 DNA 的核苷酸序列应用 ABI PRISM377 DNA 测序系统(Perkin Elmer Co., Ltd.)根据使用 M13PrimerM4 和 M13PrimerRV(Takara)的染料终止 (dye terminator) 法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74:5463, 1997)确定。从编码以艾萨克综合症患者的血清识别的抗原(神经调节素)的 cDNA 的 3'端确定核苷酸序列以阐明包含 Poly(A)⁺链的核苷酸序列(图 1), 该核苷酸序列进行与 GenBank 的同源分析, 结果, 未报告相似序列, 并发现该核苷酸序列为新的基因。该 cDNA(称作“短 cDNA”)是由全长 1347 个核苷酸构成并编码包含 386 个氨基酸的新型蛋白质。

虽然进行了取得由该 cDNA 编码的蛋白质的尝试, 但未发现甲硫氨酸起始密码子。由于这一原因, 该核苷酸序列应用 5'-RACE(cDNA 末端快速扩增)法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85:8998, 1988)通过 cDNA 库进行 PCR。因此, 获得了相应于全长包含 551 个氨基酸的蛋白质, 即神经调节素的 cDNA(称作“长 cDNA”)。

图 1 和 2 分别显示了“短 cDNA”和“长 cDNA”核苷酸序列。

实施例 2

· 在大肠杆菌中重组蛋白质的表达

编码神经调节素的一部分的短 cDNA 被从按照实施例 1 的免疫筛选方法获得的 cDNA 克隆中提取出来, 该在一端具有 EcoRI/XhoI 识别序列的短 cDNA 被插入谷光甘肽-S-转移酶(GST)融合蛋白表达载体 pGEX-5X-3 以进

行亚克隆。整合了短 cDNA 的 pGEX-5X-3 在 42℃ 45 秒钟通过热激(hot shock)方法被导入 BL21 大肠杆菌株以获得 BL21/短 cDNA- GST 基因/pGEX-5X-3。该 BL21 在含有 0.1mg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养，并加入 0.1mM 的异丙基硫-β-D-半乳糖苷(IPTG)，此外，该培养在 37℃ 进行 2 小时以诱导前述融合蛋白的表达。通过离心法收集的 BL21 用 PBS(磷酸盐缓冲液)清洗，然后再用 1mg/mL 的溶菌酶消化，并用 0.1%的 Triton X-100 溶解。含有溶解的 GST 融合蛋白的 BL21 导出蛋白悬浮液被加载到谷胱甘肽琼脂糖 4B(GS4B)柱上，再通过 50mM 的还原型谷胱甘肽/PBS 用 PBS 洗脱以纯化目标 GST-短神经调节素融合蛋白。而且，通过 SDS-电泳(SDS-PAGE)检测分子量、同质性、亚单元结构等。

· 在大肠杆菌中通过编码神经调节素的全长 cDNA 重组体的蛋白质的表达

神经调节素 cDNA 通过向在实施例 1 中获得的在其一端具有 EcoRI/XhoI 识别序列的全长 cDNA 的 3'端添加两分子的流感血凝素(HA)-标记获得，插入谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合蛋白表达载体 pGEX-5X-1 作为表达载体并进行亚克隆。该整合了 cDNA 的 pGEX-5X-1 在 42℃ 45 秒钟通过热激方法被导入 BL21 大肠杆菌株以获得 BL21/长 cDNA- GST 基因/pGEX-5X-1。该 BL21 在含有 0.1mg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养，并加入 0.1mM 的异丙基硫-β-D-半乳糖苷(IPTG)，此外，该培养在 30℃ 进行 3 小时以诱导分别向 N 和 C 端附加 GST 和 HA 的融合蛋白(GST-神经调节素-HAHA)的表达。通过离心法收集的 BL21 用 PBS 清洗，然后再用 1mg/mL 的溶菌酶消化，并用 0.1%的 Triton X-100 溶解。含有溶解的 GST 融合蛋白的 BL21 导出蛋白悬浮液被加载到谷胱甘肽琼脂糖 4B(GS4B)柱上，再通过 50mM 的还原型谷胱甘肽/Tris-HCl(pH8.0)用 PBS 洗脱以纯化目

标 GST-神经调节素-HAHA 融合蛋白。

为证实该表达,以 50mM 的还原型谷胱甘肽洗脱的组分按 1/200 和 1/2000 的比例稀释于 PBS 中,然后用含 0.25%SDS、0.05%巯基乙醇和 0.1% 甘油的 25mM Tris-HCl(pH6.8)处理,其后进行 8%的 SDS-PAGE。在 SDS-PAGE 后,融合蛋白(GST-神经调节素-HAHA)通过电印迹法被转移到 5 尼龙膜上,该尼龙膜在室温下用含 5%脱脂乳的 PBS 封闭 60 分钟,然后在室温下与按 1/400 的比例稀释于含 0.5%脱脂乳的 PBS 中的抗-HA 单克隆抗体(Boehringer Mannheim Co., Ltd.)进行 60 分钟的免疫反应。在反应完成后,用 0.1%Tween 20/PBS 进行清洗并在室温下通过使用辣根过氧化物酶偶联- 10 抗鼠-免疫球蛋白 G(抗鼠 IgG-HRP)作为二级抗体进行 60 分钟的另一个免疫反应,然后用 0.1%Tween 20/PBS 清洗以通过显示 HRP 活性检测目标抗原。ECL(Amersham Co., Ltd.)被用于 HRP 活性的检测(Clin. Chem., 25:1531, 1979)。结果如图 9 所示。神经调节素的分子量根据 GST-神经调节素-HAHA 融合蛋白的分子量大小被估算为大约 66KDa。

15 · 通过全长 cDNA 重组的蛋白质的体外表达

神经调节素 cDNA (图 2)在其末端被限制性内切酶 EcoRI 修饰,然后 被插入 pBluescript IKS 载体。其后,通过利用 pBluescript(1 μ g)和 TNT 偶 联翻译系统(Promega Co., Ltd.),神经调节素通过体外翻译方法表达为(³⁵S) 标记的体外实体,该(³⁵S)标记的蛋白质被加载到 10%SDS-PAGE 上并通过 20 图像分析仪(BAS2000, Fujix)检测放射性。可以看到,根据 SDS-PAGE 通 过神经调节素 cDNA 体外翻译得到的神经调节素的分子量大约为 66KDa。

实施例 3

· 通过 RNA 印迹法证实神经调节素基因的表达

通过传统方法从 NB-1 细胞、A549 细胞株、Jurkat 细胞株和 HeLa 细胞株分离得到 mRNAs, 1 μ g 的 mRNAs 用 1%琼脂糖凝胶电泳分离并通过接触印迹法转移到尼龙膜上。该尼龙膜在 80 $^{\circ}$ C 处理 2 小时, 然后在 42 $^{\circ}$ C Denhardt's 溶液中进行 2 小时的预杂交。接着, 用 32 P 放射标记的神经调节素 cDNA 作为探针在 42 $^{\circ}$ C 与 mRNA 杂交 12 小时, 如此获得的尼龙膜在反应完成后以 300 mM 的 NaCl 和 30 mM 的柠檬酸钠清洗, 然后再在 50 $^{\circ}$ C 用 15 mM 的 NaCl 和 1.5mM 的柠檬酸钠清洗。目标 mRNA 通过感光 X 光片检测。从所获得的放射自显影看出, 在神经细胞的 NB-1 细胞中神经调节素基因被强烈表达。

· 神经调节素对兔的免疫(图 10 和 11)

通过使用全长包含 511 个氨基酸的神经调节素, 其与 GST 的融合蛋白被产生出来, 然后依照普遍的方法与添加剂一起被用作免疫三只兔子的抗原。六周后, 可观察到在所有 3 只兔子诱发出具有类似于艾萨克综合症的症状, 如后肢麻痹、肌肉强直、由此导致的步行困难等的外周神经损伤(图 10)。从以神经调节素免疫的兔子获得的肌肉经 HE 染色并进行显微镜观察, 结果与正常肌肉组织相比, 肌细胞的大小是不均匀的, 并观察到神经细胞的变性(图 11)。

另外, 人神经调节素被分为 3 段, 即 C 端区段、N 端区段以及它们的中间段。它们分别对 5 只兔子进行免疫, 结果, 上述症状在以神经调节素的 C 端段免疫的兔子身上诱发出, 在以其它段免疫的情况下, 在兔子身上未获得这种结果。

从以神经调节素免疫的兔子获得的血清在下面的试验中被用作抗神经调节素抗血清。

· 通过蛋白质印迹法证实在各种细胞中神经调节素基因的表达

5 通过使用 GST-短神经调节素融合蛋白(阳性对照)及在实施例 1 中制备的 NB-1 神经细胞和 HEK(人胚胎肾)-293T, 用蛋白质印迹法证实神经调节素基因的表达状态。

10 首先, 用 1%NP-40 溶解的细胞溶解液从用作样本的各种细胞制备, 各细胞溶解液以含有 0.25%SDS、0.05%巯基乙醇和 0.1%甘油的 25mM 的 Tris-HCl(pH6.8)处理, 并通过 8%SDS-PAGE 分离。在 SDS-PAGE 后, 从各种细胞获得的蛋白质通过电印迹法被转移到硝化纤维(NC)膜上。在 NC 膜上, 抗神经调节素的抗血清按 1/1000 的比例用添加了 2.0mg/mL 的 GST-短神经调节素融合蛋白和 5%脱脂乳的 TBS (Tris 缓冲盐水) 稀释, 并在室温下进行 60 分钟的免疫反应。另外, 同时进行使同样的抗体溶液与作为阴性对照的单独的 NC 膜反应的试验或将抗体溶液的 GST-短神经调节素融合蛋白换成单独的 GST 的试验。反应完成后获得的 NC 膜用 0.1%Tween
15 20/TBS 清洗, 再在室温下进行 60 分钟的与作为二级抗体的 HRP 标记抗兔 IgG 抗体的免疫反应, 并用 0.1%Tween 20/TBS 清洗以检测 HRP 活性因而检测目标抗原。使用 ECL(Amersham Co., Ltd.) 检测 HRP 活性(Clin. Chem., 25:1531, 1979)。结果, 在 NB-1 细胞中观察到神经调节素的产生。

20 实施例 4

· 在患者血清中检测抗人神经调节素抗体(图 12)

通过使用如上所述制备的 GST-短神经调节素融合蛋白作为抗原,应用蛋白质印迹法检测存在于人血清中的抗神经调节素抗体。

5 首先, GST-短神经调节素融合蛋白(100ng/道)通过 SDS-PAGE 电泳被转移到 NC 膜。从 5 个艾萨克综合症患者、30 个具有自诉有作为糖尿病等的并发症的手足疼痛性麻痹的不同于艾萨克综合症的其它外周神经损伤患者、和 8 个健康正常人获得的血清用作一级抗体。为检验血清中抗神经调节素抗体的存在,用 TBS 按 1/1000 稀释的血清样本涂覆到 NC 膜上以在室温下进行 60 分钟的免疫反应,该 NC 膜用 0.1%Tween 20/TBS 清洗,再在室温下用 HRP 标记的抗人 IgG 抗体作为二级抗体进行 60 分钟的免疫反应。
10 该 NC 膜用 0.1%Tween 20/TBS 清洗以检测 HRP 活性,因而人 IgG 与目标抗原的反应被检测到。HRP 活性按上述方法测定。

结果,从 5 个艾萨克综合症患者中的 4 个患者和 30 个具有不同于艾萨克综合症的外周神经损伤的患者中的 7 个患者检测到抗神经调节素抗体,而未从 8 个健康正常人检测到该抗体。图 11 显示了部分结果。

15 再看检测到抗体的患者的血清,从 4 个阳性艾萨克综合症患者检测到指向神经调节素的 C 末端部分的抗体,且从 7 个具有不同于艾萨克综合症的外周神经损伤的患者得到同样的检测结果,此外,从另外的两个人检测到指向神经调节素的 N 末端部分的抗体。

实施例 5

20 · 通过鼠基因组的杂交克隆检测神经调节素编码 cDNA

由小鼠肝脏获得的鼠基因组库(Clontech Co., Ltd.)被用作基因库,而人

神经调节素 cDNA 的全长序列被用作探针, 该探针通过使用 Bca BEST 标记试剂盒(Takara Co., Ltd.)以放射性同位素(^{32}P)进行标记。每板的噬菌体 DNAs 被转移到两个 GeneScreen Plus 片(Du Pont Co., Ltd.)上, 并在反应溶液(1M NaCl、1%SDS(十二烷基磺酸钠)、10%Dextran、100g/ml 鲑精 DNA)中
5 与标记探针进行杂交过夜。在杂交完成后, 滤膜在室温下用 $2 \times \text{SSC}$ (标准柠檬酸盐缓冲液的缩写, 意指 0.15M NaCl 和 0.015 M 柠檬酸钠, pH7.2)清洗 2 次, 在 65°C 用 $2 \times \text{SSC}/1\% \text{SDS}$ 清洗 2 次, 及在室温下用 $0.1 \times \text{SSC}$ 清洗 2 次, 然后通过放射自显影法检测阳性空斑。在同样的条件下, 进行第二和第三次筛选操作以采用图像分析仪(Fujix Co., Ltd.)检测和分离阳性
10 空斑。

在分析中使用的噬菌体 DNA 应用 WizardTM Lambda Preps DNA 纯化系统(Promega Co., Ltd.)进行纯化, 结果, 获得 9 个阳性克隆。

· DNA 印迹分析

为检验通过杂交克隆获得的 9 个阳性克隆含有包括等同于甲硫氨酸起始密码子的 ATG 的区域, 进行了以下的分析。
15

1ng 如此纯化的基因组噬菌体 DNA 用限制性内切酶 SacI 消化并通过 0.5%琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶经过溴化乙锭染色并确认被消化的基因组 DNA, 然后凝胶中的 DNA 通过印迹石(blotting stone)法被转移到滤膜上在碱性缓冲液(0.4M NaOH、0.6M NaCl)中放置过夜。该用 50mM NaOH 和 1M Tris-HCl(pH8.0)中和的滤膜经空气干燥, 再浸入预杂交溶液(1%SDS、1M NaCl、10%Dextran), 然后在 65°C 进行预杂交 30 分钟。
20

接着, 通过使用 Bca BEST 标记试剂盒(Takara Co., Ltd.)以放射性同位素(^{32}P)标记特异性识别包含等同于神经调节素 cDNA 的甲硫氨酸起始密码子的 ATG 及其侧翼序列的区域的探针, 该探针和 100g/ml 的鲑精 DNA 被加到前述的预杂交溶液中以在 65°C 进行杂交过夜, 在杂交反应结束后, 滤膜在室温下用 $2 \times \text{SSC}$ 清洗 2 次, 在 65°C 用 $2 \times \text{SSC}/1\% \text{SDS}$ 清洗 2 次, 及在室温下用 $0.1 \times \text{SSC}$ 清洗 2 次, 然后该滤膜感光成像底片以通过图像分析仪(Fujix Co., Ltd.)检测和分离阳性空斑。

结果发现, 在 9 个克隆中 3 个出现了包含相应于甲硫氨酸起始密码子的 ATG 的 5' 区域, 更具体地说, 从 1 个克隆中检测到大约 2kb 的带, 而从 2 个克隆中检测到大约 7kb 的带。这 3 个克隆被发现是包含 5' 上游区域的基因组 DNAs。

实施例 6

· 小鼠 cDNA 的分离

按下面的方法通过小鼠基因组的杂交克隆获得编码小鼠神经调节素的 cDNA 是可能的。

从小鼠胚胎获得的小鼠胚胎 Lambda cDNA 库(STRATAGENE Co., Ltd.)被用作基因库, 而人神经调节素 cDNA 的全长序列被用作探针, 该探针通过使用 Bca BEST 标记试剂盒(Takara Co., Ltd.)以放射性同位素(^{32}P)进行标记。每板的噬菌体 DNAs 被转移到两个 GeneScreen Plus 片(Du Pont Co., Ltd.)上, 并在 65°C 于反应溶液(1M NaCl、1%SDS、10%Dextran、100g/ml 鲑精 DNA)中与标记探针反应 8 小时。滤膜在室温下用 $2 \times \text{SSC}$ 清洗 2 次, 在 65

℃用 $2 \times \text{SSC}/1\% \text{SDS}$ 清洗 2 次, 及在室温下用 $0.1 \times \text{SSC}$ 清洗 2 次, 然后通过放射自显影法检测阳性空斑。在同样的条件下, 进行第二和第三次筛选操作以采用图像分析仪(Fujix Co., Ltd.)检测和分离阳性空斑。

在上述分析中使用的噬菌体 DNA 应用 Wizard™ Lambda Preps DNA 纯化系统(Promega Co., Ltd.)进行纯化, 结果, 获得 1 个阳性克隆。

如此纯化的基因组噬菌体 DNA 用限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 内切, 然后插入片段被切割出来。在克隆载体 pBluescriptII 的 EcoRI 和 XhoI 部位, 该插入片段被进一步进行亚克隆。结果, 可获得编码小鼠神经调节素的 cDNA。在分析该 cDNA 的核苷酸序列时, 通过 ABIPRISM377 DNA 测序系统(Perkin Elmer Co., Ltd.)确定其序列。

如此分析获得的核苷酸序列被转换成氨基酸序列, 结果发现, 所说的序列包含甲硫氨酸起始密码子, 且与人神经调节素的核苷酸序列具有 85% 或更高的同源性。

序列表

(1) 一般信息

申请人: LOCOMOGENE, INC.

发明名称: 神经调节素 (NEUROTONIN) 及其应用

在先申请: 日本, 2001-34217

优先权日: 2001-02-09

序列数目: 4

(2) 序列信息

序列编号: 1

长度: 1347

类型: cDNA

来源: 人

名称: 神经调节素短 cDNA

```

1
tgacagaagg gagaagaaag aatgaagcg agttttcagt attccaagca taagagccag 60
caagatacat tcctcaagt gtccagaatt tccaattaca gacgacaaag tagcactgat 120
tcgaattcag aattgtcaaa tgaagaatta aggcaatgtc ttaatgaaac ttagaggag 180
gtagaa atg tta aaa act gaa ctt gag gca tct caa aga caa ctc aga ggt aaa 234
      Met Leu Lys Thr Glu Leu Glu Ala Ser Gln Arg Gln Leu Arg Gly Lys
          1           5           10           15
gag gaa gca ttg aaa att ctt caa agc atg gca ata ctg ggc aaa gcc 282
Glu Glu Ala Leu Lys Ile Leu Gln Ser Met Ala Ile Leu Gly Lys Ala
          20           25           30
aca agt cat acg cag gca gtg ctt caa aaa act atg gaa caa aac aga 330
Thr Ser His Thr Gln Ala Val Leu Gln Lys Thr Met Glu Gln Asn Arg
          35           40           45
tcc ttg gag aag gaa ata aat gcc ttg cag tgg gaa ata gaa ttt gat 378
Ser Leu Glu Lys Glu Ile Asn Ala Leu Gln Trp Glu Ile Glu Phe Asp
          50           55           60
cat aat aga ttt aaa aat ata gag gaa tct tgg atc caa aaa tat gac 426
His Asn Arg Phe Lys Asn Ile Glu Glu Ser Trp Ile Gln Lys Tyr Asp
          65           70           75           80
agg cta aac tgt gaa aat gca gtc ctc aaa gag aat ttg aaa gtg aaa 474
Arg Leu Asn Cys Glu Asn Ala Val Leu Lys Glu Asn Leu Lys Val Lys
          85           90           95

```

aca gaa gaa att aaa atg ctg aag tct gac aat gca gtt ttg aat caa	522
Thr Glu Glu Ile Lys Met Leu Lys Ser Asp Asn Ala Val Leu Asn Gln	
100 105 110	
cgg tat ttg gag gcc ctc gcc atg ctt gat atc aaa cag cag aag atg	570
Arg Tyr Leu Glu Ala Leu Ala Met Leu Asp Ile Lys Gln Gln Lys Met	
115 120 125	
gct cag gaa aac atg tgc tgt gat aaa agt ggc ttt gca gag gct tca	618
Ala Gln Glu Asn Met Cys Cys Asp Lys Ser Gly Phe Ala Glu Ala Ser	
130 135 140	
ggt ctt gag ctt gcg gtc ctc gga gcc tgc ctt tgt cat ggg ccc gga	666
Gly Leu Glu Leu Ala Val Leu Gly Ala Cys Leu Cys His Gly Pro Gly	
145 150 155 160	
ggg aac ccc tgt tct tgt gcc aga atg gca gca tcc act cgg aaa ctg	714
Gly Asn Pro Cys Ser Cys Ala Arg Met Ala Ala Ser Thr Arg Lys Leu	
165 170 175	
ctt ctt cag ctc aaa caa gag ttg gaa att ttg cag aag agt aaa gaa	762
Leu Leu Gln Leu Lys Gln Glu Leu Glu Ile Leu Gln Lys Ser Lys Glu	
180 185 190	
gaa gct tac gtg atg gca gat gct ttc aga att gca ttt gag caa caa	810
Glu Ala Tyr Val Met Ala Asp Ala Phe Arg Ile Ala Phe Glu Gln Gln	
195 200 205	
tta atg aga aaa aat gac cag gca cta caa ttg aca caa atg gat aaa	858
Leu Met Arg Lys Asn Asp Gln Ala Leu Gln Leu Thr Gln Met Asp Lys	
210 215 220	
atg cat aaa aaa gca aca aaa tgg atg aat tgg aag cac ctt aaa gag	906
Met His Lys Lys Ala Thr Lys Trp Met Asn Trp Lys His Leu Lys Glu	
225 230 235 240	
gat gga ttt cca tca cca agg agt aag aag acc ttc ggg cag aga ctg	954
Asp Gly Phe Pro Ser Pro Arg Ser Lys Lys Thr Phe Gly Gln Arg Leu	
245 250 255	
ttg ggt atg ctc cct tca gaa aac agt tct aag agg atg gaa gac cag	1002
Leu Gly Met Leu Pro Ser Glu Asn Ser Ser Lys Arg Met Glu Asp Gln	
260 265 270	
gac agt cct caa gag gtc ctt aag atg ctc ata gat ttg ctt aat gat	1050
Asp Ser Pro Gln Glu Val Leu Lys Met Leu Ile Asp Leu Leu Asn Asp	
275 280 285	
aaa gaa gaa gct ttg gct cat caa aga aaa gtt agc tac atg ctt gct	1098
Lys Glu Glu Ala Leu Ala His Gln Arg Lys Val Ser Tyr Met Leu Ala	
290 295 300	
cgg gca ttg gaa gac aaa gac act gct tca aac gag aat aaa gaa aaa	1146
Arg Ala Leu Glu Asp Lys Asp Thr Ala Ser Asn Glu Asn Lys Glu Lys	
305 310 315 320	
aat cct ata aaa gag aat ttc cct ttc aac aac ccc tgg cgt aag act	1194
Asn Pro Ile Lys Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asn Pro Trp Arg Lys Thr	

```

          325          330          335
tca gaa ttc tct gtt ttg ggt gat cct ata cat tca agt gtc tgc att      1242
Ser Glu Phe Ser Val Leu Gly Asp Pro Ile His Ser Ser Val Cys Ile
          340          345          350
tta aat tct gtg ggc tgc att tgt tca atc cag cac tct caa ata gat      1290
Leu Asn Ser Val Gly Cys Ile Cys Ser Ile Gln His Ser Gln Ile Asp
          355          360          365
cca aac tat aga act ctt aaa aga tcc cat tct ttg cca tca agt atc      1338
Pro Asn Tyr Arg Thr Leu Lys Arg Ser His Ser Leu Pro Ser Ser Ile
          370          375          380
ata ttt taa
Ile Phe
385

```

序列编号: 2

长度: 2738

类型: cDNA

来源: 人

名称: 神经调节素长 cDNA

```

2
gagctggagt ccgggctccg gtcccctcca cggaccttga gagggtagcc ggggtcagac      60
ctggcagaca gcccatTTTT tcttatgata aagacggcat ttggctc                      107

atg agc aag gtg gca aga tca tca agt gag tca gac atg cag ctc tgg      155
Met Ser Lys Val Ala Arg Ser Ser Ser Glu Ser Asp Met Asn Leu Trp
  1           5           10           15
gaa aca gaa gag gat gac atg aca gaa ggt gat tta ggg tat ggc ctc      203
Glu Thr Glu Glu Asp Asp Met Thr Glu Gly Asp Leu Gly Tyr Gly Leu
          20           25           30
gga agg aaa cct ggt ggg att tat gaa ata gaa ttt tca cat agg tct      251
Gly Arg Lys Pro Gly Gly Ile Tyr Glu Ile Glu Phe Ser His Arg Ser
          35           40           45
aga aaa aga tca gat gga aag aac ttt agc cct cct cca ttt ccg aga      299
Arg Lys Arg Ser Asp Gly Lys Asn Phe Ser Pro Pro Pro Phe Pro Arg
          50           55           60
aag gga gaa gaa aga aat gaa gcg agt ttt cag tat tcc aag cat aag      347
Lys Gly Glu Glu Arg Asn Glu Ala Ser Phe Asn Tyr Ser Lys His Lys
          65           70           75           80
agc cag caa gat aca ttc cct caa gtg tcc aga att tcc aat tac aga      395
Ser Gln Gln Asp Thr Phe Pro Gln Val Ser Arg Ile Ser Asn Tyr Arg
          85           90           95
cga caa agt agc act gta gat tcg aat tca gaa ttg tca aat gaa gaa      443

```

Arg Gln Ser Ser Thr Val Asp Ser Asn Ser Glu Leu Ser Asn Glu Glu	
100	105
110	
tta agg caa tgt ctt aat gaa act tta gag gag gta gaa atg tta aaa	491
Leu Arg Gln Cys Leu Asn Glu Thr Leu Glu Glu Val Glu Met Leu Lys	
115	120
125	
act gaa ctt gag gca tct caa aga caa ctc aga ggt aaa gag gaa gca	539
Thr Glu Leu Glu Ala Ser Gln Arg Gln Leu Arg Gly Lys Glu Glu Ala	
130	135
140	
ttg aaa att ctt caa agc atg gca ata ctg ggc aaa gcc aca agt cat	587
Leu Lys Ile Leu Gln Ser Met Ala Ile Leu Gly Lys Ala Thr Ser His	
145	150
155	160
acg cag gca gtg ctt caa aaa act atg gaa caa aac aga tcc ttg gag	635
Thr Gln Ala Val Leu Gln Lys Thr Met Glu Gln Asn Arg Ser Leu Glu	
165	170
175	
aag gaa ata aat gcc ttg cag tgg gaa ata gaa ttt gat cat aat aga	683
Lys Glu Ile Asn Ala Leu Gln Trp Glu Ile Glu Phe Asp His Asn Arg	
180	185
190	
ttt aaa aat ata gag gaa tct tgg atc caa aaa tat gac agg cta aac	731
Phe Lys Asn Ile Glu Glu Ser Trp Ile Gln Lys Tyr Asp Arg Leu Asn	
195	200
205	
tgt gaa aat gca gtc ctc aaa gag aat ttg aaa gtg aaa aca gaa gaa	779
Cys Glu Asn Ala Val Leu Lys Glu Asn Leu Lys Val Lys Thr Glu Glu	
210	215
220	
att aaa atg ctg aag tct gac aat gca gtt ttg aat caa cgg tat ttg	827
Ile Lys Met Leu Lys Ser Asp Asn Ala Val Leu Asn Gln Arg Tyr Leu	
225	230
235	240
gag gcc ctc gcc atg ctt gat atc aaa cag cag aag atg gct cag gaa	875
Glu Ala Leu Ala Met Leu Asp Ile Lys Gln Gln Lys Met Ala Gln Glu	
245	250
255	
aac atg tgc tgt gat aaa agt ggc ttt gca gag gct tca ggt ctt gag	923
Asn Met Cys Cys Asp Lys Ser Gly Phe Ala Glu Ala Ser Gly Leu Glu	
260	265
270	
ctt gcg gtc ctc gga gcc tgc ctt tgt cat ggg ccc gga ggg aac ccc	971
Leu Ala Val Leu Gly Ala Cys Leu Cys His Gly Pro Gly Gly Asn Pro	
275	280
285	
tgt tct tgt gcc aga atg gca gca tcc act cgg aaa ctg ctt ctt cag	1019
Cys Ser Cys Ala Arg Met Ala Ala Ser Thr Arg Lys Leu Leu Leu Gln	
290	295
300	
ctc aaa caa gag ttg gaa att ttg cag aag agt aaa gaa gaa gct tac	1067
Leu Lys Gln Glu Leu Glu Ile Leu Gln Lys Ser Lys Glu Glu Ala Tyr	
305	310
315	320
gtg atg gca gat gct ttc aga att gca ttt gag caa caa tta atg aga	1115
Val Met Ala Asp Ala Phe Arg Ile Ala Phe Glu Gln Gln Leu Met Arg	
325	330
335	

aaa aat gac cag gca cta caa ttg aca caa atg gat aaa atg cat aaa	1163
Lys Asn Asp Gln Ala Leu Gln Leu Thr Gln Met Asp Lys Met His Lys	
340 345 350	
aaa gca aca aaa tgg atg aat tgg aag cac ctt aaa gag gat gga ttt	1211
Lys Ala Thr Lys Trp Met Asn Trp Lys His Leu Lys Glu Asp Gly Phe	
355 360 365	
cca tca cca agg agt aag aag acc ttc ggg cag aga ctg ttg ggt atg	1259
Pro Ser Pro Arg Ser Lys Lys Thr Phe Gly Gln Arg Leu Leu Gly Met	
370 375 380	
ctc cct tca gaa aac agt tct aag agg atg gaa gac cag gac agt cct	1307
Leu Pro Ser Glu Asn Ser Ser Lys Arg Met Glu Asp Gln Asp Ser Pro	
385 390 395 400	
caa gag gtc ctt aag atg ctc ata gat ttg ctt aat gat aaa gaa gaa	1355
Gln Glu Val Leu Lys Met Leu Ile Asp Leu Leu Asn Asp Lys Glu Glu	
405 410 415	
gct ttg gct cat caa aga aaa gtt agc tac atg ctt gct cgg gca ttg	1403
Ala Leu Ala His Gln Arg Lys Val Ser Tyr Met Leu Ala Arg Ala Leu	
420 425 430	
gaa gac aaa gac act gct tca aac gag aat aaa gaa aaa aat cct ata	1451
Glu Asp Lys Asp Thr Ala Ser Asn Glu Asn Lys Glu Lys Asn Pro Ile	
435 440 445	
aaa gag aat ttc cct ttc aac aac ccc tgg cgt aag act tca gaa ttc	1499
Lys Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asn Pro Trp Arg Lys Thr Ser Glu Phe	
450 455 460	
tct gtt ttg ggt gat cct ata cat tca agt gtc tgc att tta aat tct	1547
Ser Val Leu Gly Asp Pro Ile His Ser Ser Val Cys Ile Leu Asn Ser	
465 470 475 480	
gtg ggc tgc att tgt tca atc cag cac tct caa ata gat cca aac tat	1595
Val Gly Cys Ile Cys Ser Ile Gln His Ser Gln Ile Asp Pro Asn Tyr	
485 490 495	
aga act ctt aaa aga tcc cat tct ttg cca tca agt atc ata ttt	1640
Arg Thr Leu Lys Arg Ser His Ser Leu Pro Ser Ser Ile Ile Phe	
500 505 510	
	taaagacaag ccagttgaaa ttggaactga gagttgttta 1680
tatcgagata ctttgaaaa tgattttgta aattttgctg catcttgaga agttgtatgt 1740	
ttcctagta tttctaaatt ttaggaggtc acttaaatca aatattttct acattttctt 1800	
tttctcttt tgagatggag tcttgctctg tcaccaggt tggagtgcag tgggtgtgatc 1860	
tcggttcaact gcaacctccg cctcccgggt caggcaattc tctgcctca gcctcccag 1920	
tgactcggat tacaggcatt tgccatctct actaaaaata caaaaaattg gctgggccta 1980	
gtggcgcatt cctgtaatcc cagctgcttg ggaggctgag gtaggagagt cgcttgagcc 2040	
tgggagcgg gggttgtggt gagccgagac tgtgtcattg cactccagcc tgggcgacaa 2100	
gagcgaact ctgtctcaaa aaaaaaaaaa aaacacatta cagtgtttgc caacatccta 2160	
aaactaaaa ataatgatt ttgggaaaa caaaaaatta tttaactatt ttgattgagt 2220	

atagggatct	tagcttggct	aaatcaccaa	tatagcaatg	tatcttaatg	ctctaaaaag	2280
taacaatacc	taggactgac	tgaatgttaa	tttctggaat	tcatttatct	tgttttattt	2340
gccttgttca	gtatttttca	tttaccatat	gaagttaga	aataacaatt	tccttaagtt	2400
aacttcaata	agacagtttt	gatggtggga	ccttggcaga	agtatattga	gtcagtgccg	2460
gctgcgttca	tggcttcttg	tcagggtagt	aacattttgc	aaccaaactc	gcacagattt	2520
gtagccaagt	ctacaaagtg	cttaacagct	cttttcattg	catcctgtga	gatggttgtg	2580
atgatccagg	aaatggggtc	tcaggaatct	gaagaagctg	cctgagccaa	ggtgatttct	2640
aggagttttt	ttgtttgtgg	tatgtgaatt	ggggtgtgtg	ggggtggggt	gtgtgtgtag	2700
acagggtccc	actgtgttgc	tcaggctggt	gccaaaact			2738

序列编号: 3

长度: 1326

类型: cDNA

来源: 小鼠

名称: 神经调节素短 cDNA

3

tgaccgaagg	gagaagaaag	aagcgaacc	agtttccagt	attccaggag	gaaggccttt	60
caagatacaa	gcgctgaggg	ataccgagca	tccagactga	gcagcacaga	ttctaactca	120
gaattgtcgg	atgagcagtt	aaggcgacgt	cttcatgaag	ccttagagga	cgtagagatt	180
ttaaaaacgg	aacttgaagc	gtctcaaaga	caacttgaag	gtaaagagga	agcattgaaa	240
atcctccaaa	gc					252
atg gca atg ctt ggc aaa gcc aca agc cac aca cag aca atg ctt caa						300
Met Ala Met Leu Gly Lys Ala Thr Ser His Thr Gln Thr Met Leu Gln						
1	5	10	15			
aaa act ata gaa caa aag aga tct ctg gag aag gaa ata aat gcc ttg						348
Lys Thr Ile Glu Gln Lys Arg Ser Leu Glu Lys Glu Ile Asn Ala Leu						
	20	25	30			
cag tgg gaa atg gaa ttt gat cag gat aga ttt aaa aat ata gaa gaa						396
Gln Trp Glu Met Glu Phe Asp Gln Asp Arg Phe Lys Asn Ile Glu Glu						
	35	40	45			
tct tgg atc cag aaa tgt gac agg cta aac tgt gac aat gca gtc ctc						444
Ser Trp Ile Gln Lys Cys Asp Arg Leu Asn Cys Asp Asn Ala Val Leu						
	50	55	60			
aga gag aat ctg aag ttg aga aca gag gaa ata aag atg cta aag tct						492
Arg Glu Asn Leu Lys Leu Arg Thr Glu Glu Ile Lys Met Leu Lys Ser						
	65	70	75	80		
aag aat gct gtt ttg aat cag cgg tac ttg gag gcc ctc gcc atg ctt						540
Lys Asn Ala Val Leu Asn Gln Arg Tyr Leu Glu Ala Leu Ala Met Leu						
	85	90	95			
gat atc aag gag cag aag atg ggt cag gag gag agt ggc ttt aca gat						588
Asp Ile Lys Glu Gln Lys Met Gly Gln Glu Glu Ser Gly Phe Thr Asp						
	100	105	110			

gta tca ggt ctc gag ctt gca gtc ctt gga gcc tgc ctg tgt cat ggt Val Ser Gly Leu Glu Leu Ala Val Leu Gly Ala Cys Leu Cys His Gly 115 120 125	636
cct gga ggg agc ccc tgt tct tgt gcc aaa atg gca gca tcc act cgg Pro Gly Gly Ser Pro Cys Ser Cys Ala Lys Met Ala Ala Ser Thr Arg 130 135 140	684
aaa ctg gtt ctt cag ctc aga cat gag ttg gaa act ctg cag aag agt Lys Leu Val Leu Gln Leu Arg His Glu Leu Glu Thr Leu Gln Lys Ser 145 150 155 160	732
aag gaa gag gcg cac ata acg gca gat gca ttc agg att gct ttt gag Lys Glu Glu Ala His Ile Thr Ala Asp Ala Phe Arg Ile Ala Phe Glu 165 170 175	780
caa cag tta atg agg aaa aat gag cag gca ctg aga ctg gct gga ggg Gln Gln Leu Met Arg Lys Asn Glu Gln Ala Leu Arg Leu Ala Gly Gly 180 185 190	828
gac ctg tgt aaa aaa gcg gca acc gtg gat caa cag aca aca ccc agg Asp Leu Cys Lys Lys Ala Ala Thr Val Asp Gln Gln Thr Thr Pro Arg 195 200 205	876
cag acg atg gat atc cgg cac aaa gga gaa aga aga cct tnt ngg ntn Gln Thr Met Asp Ile Arg His Lys Gly Glu Arg Arg Pro Xaa Xaa Xaa 210 215 220	924
aga tta ctg ggg ata ctc cct tcg gaa aac agc tcc aag ggc gct gaa Arg Leu Leu Gly Ile Leu Pro Ser Glu Asn Ser Ser Lys Gly Ala Glu 225 230 235 240	972
gac caa gac aat atg caa gag gtc ttt aag atg ctg gta gat ttg ttg Asp Gln Asp Asn Met Gln Glu Val Phe Lys Met Leu Val Asp Leu Leu 245 250 255	1020
aat gac aaa gaa gaa gcc ctt gca cat cag aga aag gtt agt tac atg Asn Asp Lys Glu Glu Ala Leu Ala His Gln Arg Lys Val Ser Tyr Met 260 265 270	1068
ctc gct cgg gcg ctg gaa gac aaa gac acg gcc tca gaa agg aat aaa Leu Ala Arg Ala Leu Glu Asp Lys Asp Thr Ala Ser Glu Arg Asn Lys 275 280 285	1116
gaa aaa atc ccc atg agc cag acc ttc cca ttc aaa acg gcc tgg cac Glu Lys Ile Pro Met Ser Gln Thr Phe Pro Phe Lys Thr Ala Trp His 290 295 300	1164
gac gct tca gag ctc tgt ggt ctg cgt gat cca gta cag tca aac cat Asp Ala Ser Glu Leu Cys Gly Leu Arg Asp Pro Val Gln Ser Asn His 305 310 315 320	1212
gtt tct gaa ccc atg gct tgc atc tgt tca ata cag cat cct cca aaa Val Ser Glu Pro Met Ala Cys Ile Cys Ser Ile Gln His Pro Pro Lys 325 330 335	1260
gtt tca gac tgc cca aga act ctt aaa aga tcc tgt tct ttg cca tca Val Ser Asp Cys Pro Arg Thr Leu Lys Arg Ser Cys Ser Leu Pro Ser	1308

aaa act ata gaa caa aag aga tct ctg gag aag gaa ata aat gcc ttg	579
Lys Thr Ile Glu Gln Lys Arg Ser Leu Glu Lys Glu Ile Asn Ala Leu	
165 170 175	
cag tgg gaa atg gaa ttt gat cag gat aga ttt aaa aat ata gaa gaa	627
Gln Trp Glu Met Glu Phe Asp Gln Asp Arg Phe Lys Asn Ile Glu Glu	
180 185 190	
tct tgg atc cag aaa tgt gac agg cta aac tgt gac aat gca gtc ctc	675
Ser Trp Ile Gln Lys Cys Asp Arg Leu Asn Cys Asp Asn Ala Val Leu	
195 200 205	
aga gag aat ctg aag ttg aga aca gag gaa ata aag atg cta aag tct	723
Arg Glu Asn Leu Lys Leu Arg Thr Glu Glu Ile Lys Met Leu Lys Ser	
210 215 220	
aag aat gct gtt ttg aat cag cgg tac ttg gag gcc ctc gcc atg ctt	771
Lys Asn Ala Val Leu Asn Gln Arg Tyr Leu Glu Ala Leu Ala Met Leu	
225 230 235 240	
gat atc aag gag cag aag atg ggt cag gag gag agt ggc ttt aca gat	819
Asp Ile Lys Glu Gln Lys Met Gly Gln Glu Glu Ser Gly Phe Thr Asp	
245 250 255	
gta tca ggt ctc gag ctt gca gtc ctt gga gcc tgc ctg tgt cat ggt	867
Val Ser Gly Leu Glu Leu Ala Val Leu Gly Ala Cys Leu Cys His Gly	
260 265 270	
cct gga ggg agc ccc tgt tct tgt gcc aaa atg gca gca tcc act cgg	915
Pro Gly Gly Ser Pro Cys Ser Cys Ala Lys Met Ala Ala Ser Thr Arg	
275 280 285	
aaa ctg gtt ctt cag ctc aga cat gag ttg gaa act ctg cag aag agt	963
Lys Leu Val Leu Gln Leu Arg His Glu Leu Glu Thr Leu Gln Lys Ser	
290 295 300	
aag gaa gag gcg cac ata acg gca gat gca ttc agg att gct ttt gag	1011
Lys Glu Glu Ala His Ile Thr Ala Asp Ala Phe Arg Ile Ala Phe Glu	
305 310 315 320	
caa cag tta atg agg aaa aat gag cag gca ctg aga ctg gct gga ggg	1059
Gln Gln Leu Met Arg Lys Asn Glu Gln Ala Leu Arg Leu Ala Gly Gly	
325 330 335	
gac ctg tgt aaa aaa gcg gca acc gtg gat caa cag aca aca ccc agg	1107
Asp Leu Cys Lys Lys Ala Ala Thr Val Asp Gln Gln Thr Thr Pro Arg	
340 345 350	
cag acg atg gat atc cgg cta caa agg aga aag aag acc tta ggg caa	1155
Gln Thr Met Asp Ile Arg Leu Gln Arg Arg Lys Lys Thr Leu Gly Gln	
355 360 365	
aga tta ctg ggg ata ctc cct tcg gaa aac agc tcc aag ggc gct gaa	1203
Arg Leu Leu Gly Ile Leu Pro Ser Glu Asn Ser Ser Lys Gly Ala Glu	
370 375 380	
gac caa gac aat atg caa gag gtc ttt aag atg ctg gta gat ttg ttg	1251
Asp Gln Asp Asn Met Gln Glu Val Phe Lys Met Leu Val Asp Leu Leu	

385	390	395	400	
aat gac aaa gaa gaa gcc ctt gca cat cag aga aag gtt agt tac atg				1299
Asn Asp Lys Glu Glu Ala Leu Ala His Gln Arg Lys Val Ser Tyr Met				
	405	410	415	
ctc gct cgg gcg ctg gaa gac aaa gac acg gcc tca gaa agg aat aaa				1347
Leu Ala Arg Ala Leu Glu Asp Lys Asp Thr Ala Ser Glu Arg Asn Lys				
	420	425	430	
gaa aaa atc ccc atg agc cag acc ttc cca ttc aaa acg gcc tgg cac				1395
Glu Lys Ile Pro Met Ser Gln Thr Phe Pro Phe Lys Thr Ala Trp His				
	435	440	445	
gac gct tca gag ctc tgt ggt ctg cgt gat cca gta cag tca aac cat				1443
Asp Ala Ser Glu Leu Cys Gly Leu Arg Asp Pro Val Gln Ser Asn His				
	450	455	460	
gtt tct gaa ccc atg gct tgc atc tgt tca ata cag cat cct cca aaa				1491
Val Ser Glu Pro Met Ala Cys Ile Cys Ser Ile Gln His Pro Pro Lys				
	465	470	475	480
gtt tca gac tgc cca aga act ctt aaa aga tcc tgt tct ttg cca tca				1539
Val Ser Asp Cys Pro Arg Thr Leu Lys Arg Ser Cys Ser Leu Pro Ser				
	485	490	495	
act tta ttt tac aag taa ac				1559
Thr Leu Phe Tyr Lys				
	500			

TGACAGAAGGGAGAAGAAAGAAATGAAGCGAGTTTTTCAGTATTCCAAGCATAAGAGCCAGCAAGATACATTCCCTC
AAGTGTCCAGAATTTCCAATTACAGACGACAAAGTAGCACTGATTCCAATTCAGAATTGTCAAATGAAGAATTAAG
GCAATGTCTTAATGAACTTTAGAGGAGGTAGAA
(firstmet.) ATGTTAAAACTGAACTTGAGGCATCTCAAAGACAACCTCAGAGGTAAGAGGAAGCATTGAAAAT
TCTTCAAAGCATGGCAATACTGGGCAAAGCCACAAGTCATACGCAGGCAGTGCTTCAAAAACTATGGAACAAAAC
AGATCCTTGGAGAAGGAAATAAATGCCTTGCAGTGGGAAATAGAATTTGATCATAATAGATTTAAAAATATAGAGG
AATCTTGGATCCAAAAATATGACAGGCTAACTGTGAAAATGCCAGTCTCAAAGAGAATTTGAAAGTGAAAACAGA
AGAAATTAATAATGCTGAAGTCTGACAAATGCAGTTTTGAATCAACGGTATTTGGAGGCCCTCGCCATGCTTGATATC
AAACAGCAGAAGATGGCTCAGGAAAACATGTGCTGTGATAAAAGTGGCTTTGCAGAGGCTTCAGGTCTTGAGCTTG
CGGTCTCGGAGCCTGCCTTTGTGATGGGCCCGGAGGGAACCCCTGTTCTTGTGCCAGAATGGCAGCATCCACTCG
GAACTGCTTCTTCAGCTCAAACAAGAGTTGAAAATTTGCAGAAGAGTAAAGAAGAAGCTTACGTGATGGCAGAT
GCTTTCAGAATTGCATTTGAGCAACAATTAATGAGAAAAATGACCAGGCACTACAATTGACACAAATGGATAAAA
TGCATAAAAAAGCAACAAAATGGATGAATTGGAAGCACCTTAAAGAGGATGGATTTCCATCACCAAGGAGTAAGAA
GACCTTCGGGCAGAGACTGTTGGGTATGCTCCCTTCAGAAAACAGTTCTAAGAGGATGGAAGACCAGGACAGTCCT
CAAGAGGTCCTTAAGATGCTCATAGATTTGCTTAATGATAAAGAAGAAGCTTTGGCTCATCAAGAAAAGTTAGCT
ACATGCTTGCTCGGGCATTGGAAGACAAAGACACTGCTTCAAACGAGAATAAAGAAAAAATCCTATAAAGAGAA
TTTCCCTTCAACAACCCCTGGCGTAAGACTTCAGAATCTCTGTTTTGGGTGATCCTATACATTCAAGTGTCTGC
ATTTTAAATTCTGTGGGCTGCATTTGTTCAATCCAGCACTCTCAAATAGATCCAACTATAGAACTCTTAAAGAT
CCCATTCTTGGCATCAAGTATCATATTTAA

图 1

TGACCGAAGGGAGAAGAAAGAAGCGAAACCAGTTTCCAGTATTCCAGGAGGAAGGGCTTTCAAGATACAAGCGCTG
AGGGATACCGAGCATCCAGACTGAGCAGCACAGATTCTAACTCAGAATTGTCCGATGAGCAGTTAAGGCGAGCTCT
TCATGAAGCCTTAGAGGACGTAGAGATTTTAAAAACGGAACCTTGAAGCGTCTCAAAGACAACCTTGAAGGTAAAGAG
GAAGCATTGAAAATCCTCCAAAGC
(firstmet.) ATGGCAATGCTTGGCAAAGCCACAAGCCACACACAGACAATGCTTCAAAAACTATAGAACAAAA
GAGATCTCTGGAGAAGGAAATAAATGCCTTGCAGTGGGAAATGGAATTTGATCAGGATAGATTTAAAAATATAGAA
GAATCTTGGATCCAGAAATGTGACAGGCTAAACTGTGACAATGCAGTCCTCAGAGAGAATCTGAAGTTGAGAACAG
AGGAAATAAGATGCTAAAGTCTAAGAATGCTGTTTTGAATCAGCGGTACTTGGAGGCCCTGCCATGCTTGATAT
CAAGGAGCAGAAGATGGGTCAGGAGGAGAGTGGCTTTACAGATGTATCAGGTCTCGAGCTTGCAGTCCTTGGAGCC
TGCCTGTGTCATGGTCTGGAGGGAGCCCCTGTTCTTGTGCCAAAATGGCAGCATCCACTCGGAAACTGGTTCTTC
AGCTCAGACATGAGTTGAAAATCTGCAGAAGAGTAAGGAAGAGGGCCACATAACGGCAGATGCATTCAGGATTGC
TTTTGAGCAACAGTTAATGAGGAAAAATGAGCAGGCACTGAGACTGGCTGGAGGGGACCTGTGTA AAAAAGCGGCA
ACCGTGGATCAACAGACAACACCCAGGCAGACGATGGATATCCGGCACAAGGAGAAAGAAGACCTTNTNGGNTNA
GATTACTGGGATACTCCCTTCGAAAAACAGCTCCAAGGGCGCTGAAGACCAAGACAATATGCAAGAGGTCTTTAA
GATGCTGGTAGATTTGTTGAATGACAAAGAAGAAGCCCTTGACATCAGAGAAAGGTTAGTTACATGCTCGCTCGG
GCGCTGGAAGACAAAGACACGGCCTCAGAAAGGAATAAAGAAAAAATCCCATGAGCCAGACCTTCCCATTCAAAA
CGGCCTGGCAGACGCTTCAAGCTCTGTGGTCTGCGTGATCCAGTACAGTCAAACCATGTTTCTGAACCCATGGC
TTGCATCTGTTCAATACAGCATCCTCCAAAAGTTTCAGACTGCCAAGAACTCTTAAAAGATCCTGTTCTTTGCCA
TCAACTTTATTTTACAAGTAA

图 3

TGAGGGAGGAGGCTGAGTGTCCAGCAGCTCCCTGGGACCGACATTTGGCTA
 (firstmet.) ATGAGCAAAGTGCCGAGGTCATCGAGCGAGGCAGAGGACATCTGGGAAACAGAGGATGACATGAC
 CGAAGGTGACCTAGGCTATGGCCTCGGAAGAAAACCCGGTGGTATTTATGAAGTTCGGTTCGATTACATCTAAG
 AAAAGGTCAGATGGAAGAACTCAAGCCCTCCTCCGTTTCCAAGAAAGGGAGAAGAAAGAAGCGAAACCAGTTTCC
 AGTATTCAGGAGGAAGGGCTTTCAAGATACAAGCGCTGAGGGATACCGAGCATCCAGACTGAGCAGCACAGATTC
 TAACTCAGAATTGTCGGATGAGCAGTTAAGGGCAGCTTTCATGAAGCCTTAGAGGACGTAGAGATTTTAAAAACG
 GAACTTGAAGCGTCTCAAAGACAACCTGAAGGTAAGAGGAAGCATTGAAAATCCTCAAAGCATGGCAATGCTTG
 GCAAAGCCACAAGCCACACAGACAATGCTTCAAAAACTATAGAACAAAAGAGATCTCTGGAGAAGGAAATAAA
 TGCCTTGCAGTGGGAAATGGAATTTGATCAGGATAGATTTAAAAATATAGAAGAATCTTGGATCCAGAAATGTGAC
 AGGCTAAACTGTGACAATGCAGTCCCTCAGAGAGAATCTGAAGTTGAGAACAGAGGAAATAAGATGCTAAAGCTA
 AGAATGCTGTTTTGAATCAGCGTACTTGGAGGCCCTCGCCATGCTTGATATCAAGGAGCAGAAGATGGGTCAGGA
 GGAGAGTGGCTTTACAGATGTATCAGGTCTCGAGCTTGCAGTCCCTGGAGCCTGCCTGTGTCATGGTCCCTGGAGGG
 AGCCCCTGTTCTTGTGCCAAAATGGCAGCATCCACTCGGAAACTGGTTCTTCAGCTCAGACATGAGTTGGAAACTC
 TGCAGAAGAGTAAGGAAGAGGGCCACATAACGGCAGATGCATTAGGATTGCTTTTGGCAACAGTTAATGAGGAA
 AAATGAGCAGGCACTGAGACTGGCTGGAGGGGACCTGTGTA AAAAAGCGGCAACCGTGGATCAACAGACAACACCC
 AGGCAGACGATGGATATCCGGCTACAAAGGAGAAAGAAGACCTTAGGGCAAAGATTACTGGGATACTCCCTTCGG
 AAAACAGCTCCAAGGGCGCTGAAGACCAAGACAATATGCAAGAGGCTTTAAGATGCTGGTAGATTTGTTGAATGA
 CAAAGAAGAAGCCCTTGCACATCAGAGAAAGGTTAGTTACATGCTCGCTCGGGCGCTGGAAGACAAAGACACGGCC
 TCAGAAAGGAATAAAGAAAAATCCCATGAGCCAGACCTTCCATTCAAACGGCCTGGCAGCAGCCTTCAGAGC
 TCTGTGGTCTCGGTGATCCAGTACAGTCAAACCATGTTTCTGAACCCATGGCTTGCATCTGTTCAATACAGCATCC
 TCCAAAAGTTTCAGACTGCCAAGAAGCTTAAAAGATCCTGTTCTTTGCCATCACTTTATTTTACAAGTAAAC

图 4

MLKTELEASQRQLRGKEEALKILQSMAILGKATSHTOAVLQKTMENRSLKEINALQWEIEFDHNRFKNIEESWI
 QKYDRLNCENAVLKENLKVKTEEIKMLKSDNAVLNQRYLEALAMLDIKQKMAQENIMCCDKSGFAEASGLELAVLG
 ACLCHGPGGNPCSCARMAA STRKLLQLKQELEILQKSKEEAYVMADAFRIAFEQQLMRKNDQALQLTQMDKMHKK
 ATKNNNNKHLKEDGFSPRSKKTFGQRLLGMLPSENSSKRMEDQDSPQEVLMKLDLLNDKEEALAHQRKVSYMLA
 RALEDKDTASNENKEKNPIKENFPFNNPWRTSEFVLDGPIHSSVCLNSVGCICSIQHSQIDPNYRTLKRSHSL
 PSSIIIF*

图 5

MSKVARSSSESDMQLWETEEDDMTEGDLGYGLGRKPGGIYEIEFSHRSRKRS DGKNFSPPPFPRKGEERNEASFQY
 SKHKSQQDTFPQVSRISNYRRQSSSTVDSNSELSNEELRQCLNETLEEVEMLKTELEASQRQLRGKEEALKILQSM
 ILGKATSHTQAVLQKTMEQNRSLKEINALQWEIEFDHNRFKNIEESWIQKYDRLNCENAVLKENLKYKTEEIKML
 KSDNAVLNQRYLEALAMLDIKQKMAQENMCCDKSGFAEASGLELAVLGACLCHGPGGNPCSCARMAASTRKL L L Q
 LKQELEILQKSKEEAYVMADAFRIFAEQQLMRKNDQALQLTQMDKMHKATKMMNWKHLKEDGFSPSRKKTFGQR
 LLGMLPSENSSKRMEDQDSPQEVLMMLDLLNDKEEALAHQRKVSYMLARALEDKDTASNENKEKNPIKENFPFNN
 PWRKTSEFSVLGDP IHSSVCI LNSVGCICSIQHSQIDPNYRTLKRSHSLPSSIIF*

图 6

MAMLGKATSHTQTMLQKTEQKRSLEKEINALQWEMFDQDRFKNIEESWIQKCDRLNCDNAVLRENLKLRTTEEIK
 MLKSKNAVLNQRYLEALAMLDIKEQKMGQEEESGFTDVSGLELAVLGACLCHGPGGSPSCAKMAASTRKLVLQRH
 ELETLQKSKEEAHTADAFRIFAEQQLMRKNEQALRLAGGDLCKKAATVDQQTTPRQTMDIRHKGERRPXXXRLLG
 ILPSENSSKGAEDQDNMQEVFKMLVDLLNDKEEALAHQRKVSYMLARALEDKDTASERNKEKIPMSQTFPFKTAWH
 DASELCGLRDPVQSNHVSEPMACICSIQHPPKVSDCPRTLKRSCSLPSTLFYK*

图 7

MSKVPRSSSEAEDIWETEEDDMTEGDLGYGLGRKPGGIYEVPCSI TSKKRS DGKNSSPPPFPRKGEERSETSFQYSR
 RKGFDQTS AEGYRASRLSSTDSNSELSDEQLRRRLHEALEDVEILKTELEASQRQLEGKEEALKILQSMAMLGKAT
 SHTQTMLQKTEQKRSLEKEINALQWEMFDQDRFKNIEESWIQKCDRLNCDNAVLRENLKLRTTEEIKMLKSKNAV
 LNQRYLEALAMLDIKEQKMGQEEESGFTDVSGLELAVLGACLCHGPGGSPSCAKMAASTRKLVLQRHELETLQKS
 KEEAHTADAFRIFAEQQLMRKNEQALRLAGGDLCKKAATVDQQTTPRQTMDIRLQRRKTLGQRLLGILPSENSS
 KGAEDQDNMQEVFKMLVDLLNDKEEALAHQRKVSYMLARALEDKDTASERNKEKIPMSQTFPFKTAWH DASELCGL
 RDPVQSNHVSEPMACICSIQHPPKVSDCPRTLKRSCSLPSTLFYK*

图 8

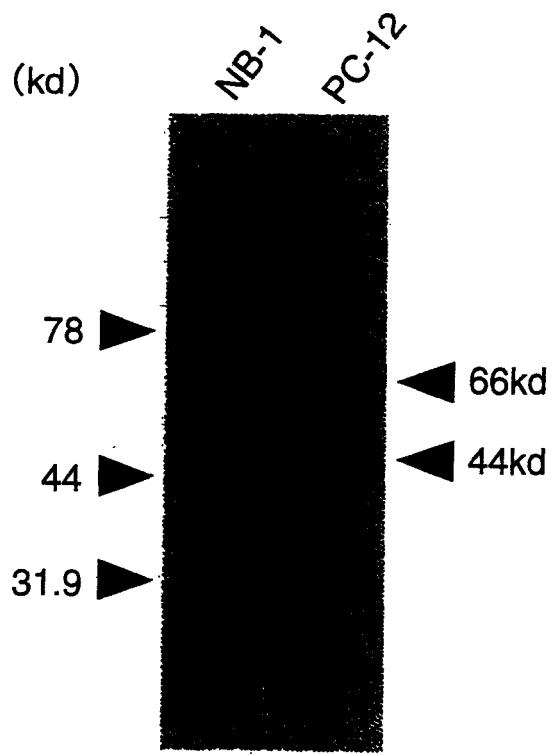
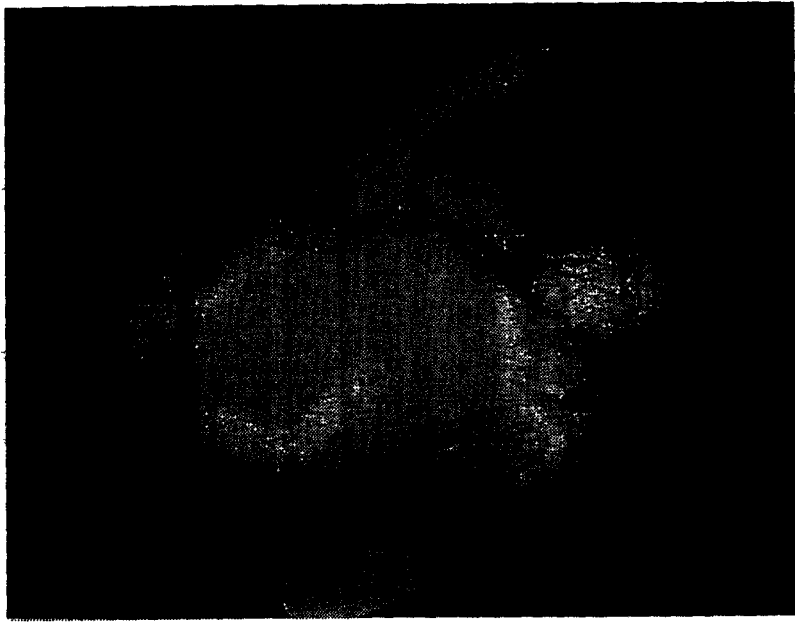
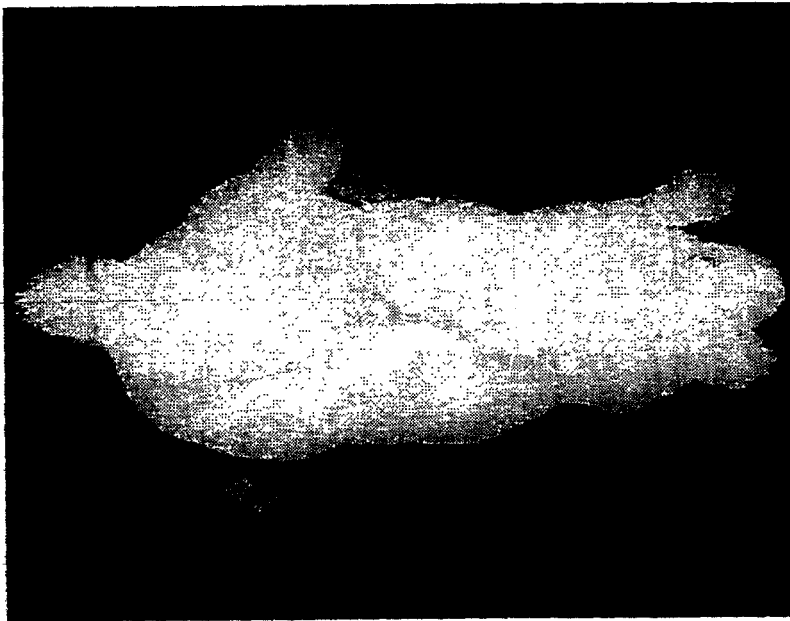


图 9

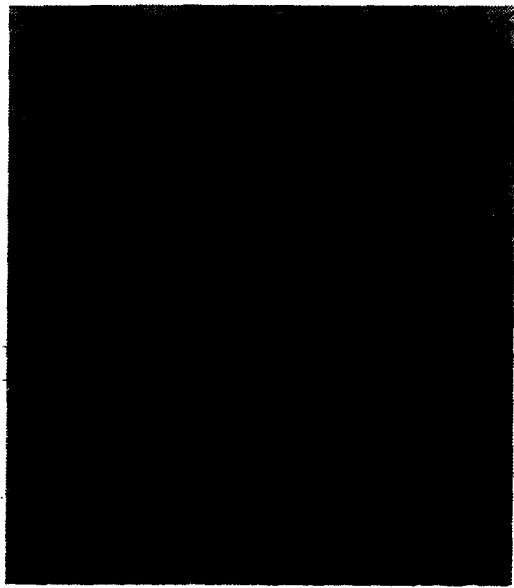


B

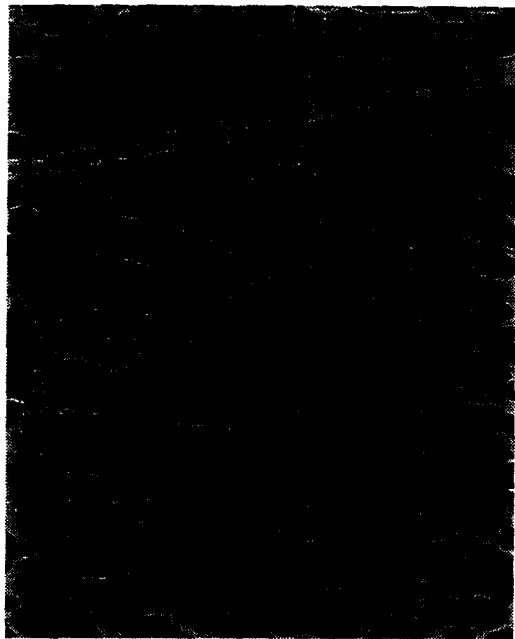


A

图 10



B



A

图 11

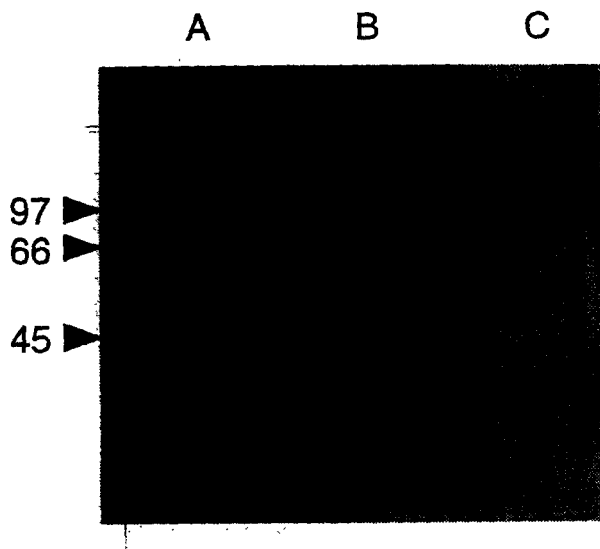


图 12

专利名称(译)	神经调节素及其应用		
公开(公告)号	CN1491281A	公开(公告)日	2004-04-21
申请号	CN02804802.4	申请日	2002-02-04
[标]发明人	中岛利博		
发明人	中岛利博		
IPC分类号	A01K67/027 A61K39/00 A61K45/00 A61M1/34 A61M1/36 A61P25/02 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/04 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/68 A61K39/395 G01N33/531 G01N33/563		
CPC分类号	C07K14/47 A01K2217/05 G01N33/6896 G01N2500/00 C07K16/18 A61P25/02		
代理人(译)	张金海		
优先权	2001034217 2001-02-09 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

为详细说明引起艾萨克综合症的物质并建立有效的诊断和治疗方法，对从艾萨克综合症者获得的血清应用一种免疫筛选方法。从神经细胞得到的cDNA库中分离得到一特定的cDNA，其核苷酸序列已阐明并通过对其的克隆获得一新的蛋白质，即神经调节素(neurotonin)。该氨基酸序列已经确定的新型蛋白质被认为是艾萨克综合症的关键物质，并可应用于外周神经损伤的研究和临床治疗中。

