



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월29일  
(11) 등록번호 10-1923847  
(24) 등록일자 2018년11월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/37* (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)  
*C12N 9/50* (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)  
*G01N 33/53* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12Q 1/37* (2013.01)  
*C07K 16/18* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7032197(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년03월12일  
 심사청구일자 2017년12월06일
- (85) 번역문제출일자 2017년11월07일
- (65) 공개번호 10-2017-0126032
- (43) 공개일자 2017년11월15일
- (62) 원출원 특허 10-2011-7023982  
 원출원일자(국제) 2010년03월12일  
 심사청구일자 2015년03월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/027244
- (87) 국제공개번호 WO 2010/105236  
 국제공개일자 2010년09월16일
- (30) 우선권주장  
 61/160,217 2009년03월13일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 WO1995033850 A1\*  
 WO1996033273 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 이예리

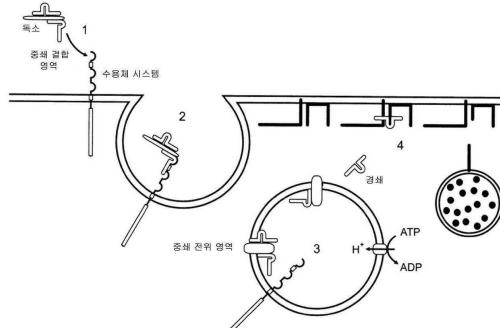
(54) 발명의 명칭 면역 기반 재표적화된 엔도펩티다제 활성 검정

**(57) 요약**

본 명세서는 SNAP-25 면역반응 유도 조성물, BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25를 포함하는 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체를 만드는 방법, BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25를 포함하는 에피토프에 선택적으로 결합

(뒷면에 계속)

**대 표 도**



하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체, 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 탐지하는 방법, 그리고  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체를 탐지하는 방법을 설명한다.

(52) CPC특허분류

*C12N 9/50* (2013.01)

*G01N 33/5014* (2013.01)

*G01N 33/5035* (2013.01)

*G01N 33/53* (2018.05)

*C07K 2317/34* (2013.01)

*C07K 2317/92* (2013.01)

(72) 발명자

호지스, 디., 다이안

미합중국 캘리포니아주 92780, 터스틴, 파인우드  
로드 14351

페르난데즈-살라스, 에스터

미합중국 캘리포니아주 92831, 풀러톤, 록키 로드  
1710

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 단계들을 포함하는 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 탐지하는 방법:

- 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제에 의해 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감하며;
- 처리된 세포로부터 보툴리눔 신경독소 A(BoNT/A) 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에 카르복실 말단을 가지는 시냅토조몰-연합된 단백질-25(SNAP-25) 절단 생성물을 분리하는 단계;
- SNAP-25 절단 생성물에 고형 상 지지물에 연결된 α-SNAP-25 항체를 접촉시키는 단계, 여기서 α-SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고;

상기 α-SNAP-25 항체는 서열번호: 95의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 101의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 상보성 결정 부위(CDR)를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 103의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 113의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가지거나,

상기 α-SNAP-25 항체는 서열번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 96의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 100의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 105의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 110의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 115의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가지거나,

상기 α-SNAP-25 항체는 서열번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 97의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 100의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 106의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 111의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 116의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가지며;

- α-SNAP-25 항체와 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항원-항체 복합체의 존재를 탐지하는 단계, 여기서, 항체-항원 복합체의 검출은 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 나타낸다.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 SNAP-25 절단 생성물은 SNAP-25<sub>197</sub>인 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체-항원 복합체의 존재는 샌드위치 ELISA를 이용하여 탐지하는 방법.

#### 청구항 4

SNAP-25 절단 생성물로부터의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하는 α-SNAP-25 항체이고,

상기 α-SNAP-25 항체는 서열번호: 95의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 101의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 103의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 113의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 경쇄 가변

영역을 가지거나,

상기  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 96의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 100의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 105의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 110의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 115의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가지거나,

상기  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 97의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 100의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 106의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 111의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 116의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 것인 항체.

## 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 SNAP-25 절단 생성물은 SNAP-25<sub>197</sub>인  $\alpha$ -SNAP-25 항체.

## 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 95의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 101의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 103의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 113의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 것인 방법.

## 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 96의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 100의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 105의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 구역, 서열번호: 110의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 구역 및 서열번호: 115의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 구역을 포함하는 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 것인 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 특허 출원은 35 U.S.C. § 119(e)에 따라 2009년 3월 13일자 출원된 U. S. 가특허 출원 61/160,217을 우선권 주장하며, 이는 전문이 참고문헌에 통합된다.

[0002]

본 명세서에 공개된 서열은 본 명세서와 함께 제출된 서열 목록에 포함되며, 전문이 참고문헌에 통합된다.

## 배경 기술

[0003]

클로스트리디아 독소, 예컨대, 보툴리눔 신경독소 (BoNTs), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F 및 BoNT/G, 및 테타누스 신경독소 (TeNT)의 뉴런 전달을 억제하는 능력을 다양한 치료 및 미용 분야에서 활용되고 있다. 예컨대, *William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin*(Slack, Inc., 2004). 약제학적 조성물로 상업적으로 이용가능한 클로스트리디아 독소는, BoNT/A 조제품, 예컨대, BOTOX (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, England), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Germany), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, South Korea), BTX-A (Biogen- tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China); 및 BoNT/B 조제품, 예컨대, MYOBLOC®/NEUROBLOC® (Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA)을 포함한다. 한 예로서, BOTOX®는 다음의 징후에 대해 하나 이상의 국가들에서 현재 사용 승인된 것이다: 이완불능(achalasia), 성인성 경직(adult spasticity), 치열(anal fissure), 요통(back pain), 안검경련(blepharospasm), 이갈기(bruxism), 목의 근긴장 이상증(cervical dystonia), 본태성 진전(essential tremor), 미간주름(glabellar lines) 또는 과잉성 안면 주름(hyperkinetic facial lines), 두통, 반측 안면경

련증(hemifacial spasm), 방광 과다 활성, 다한증(hyperhidrosis), 소아뇌성마비(juvenile cerebral palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 간대성 근경련 질환(myoclonic disorders), 코입술선(nasal labial lines), 경련성 언어장애(spasmodic dysphonia), 사시 및 VII 신경 질환.

[0004] 클로스트리디아 독소 치료는 신경전달물질 및 신경펩티드를 시냅스 간극(synaptic cleft)으로 방출하는데 이용되는 세포외유출(exocytotic) 프로세스를 붕괴시킴으로써 신경전달물질 및 신경펩티드 방출을 억제한다. 약제 산업 분야의 큰 바람은 클로스트리디아 독소 치료의 용도를 현재 감각 신경 기반 병, 예컨대, 다양한 종류의 만성 통증, 신경성 염증 및 비뇨생식기 장애, 그리고 예컨대, 체장염과 같은 기타 장애를 치료하기 위한 근-이완 용도를 넘어 확장시키고자 하는 것이다. 클로스트리디아 독소 기반 치료를 확장시키기 위해 현재 이용하는 한 가지 방법은 변형된 독소가 관심 뉴런 또는 비-뉴런 세포에 대한 변경된 세포 표적화 능력을 보유하도록 클로스트리디아 독소를 변형시키는 것을 포함한다. 소위 재표적화된 엔도펩티다제 또는 표적화된 소낭성 엑소사이토시스 조절자 단백질(TVEMPs)라고 불리는 이들 분자들은 관심 뉴런 또는 비-뉴런 표적 세포상에 존재하는 표적 수용체를 이용하여 이들의 엑소사이토시스 억제성 효과를 얻는다. 이러한 재표적화된 능력은 클로스트리디아 독소의 자연적으로 생성되는 결합 도메인을 관심 뉴런 또는 비-뉴런 표적 세포에 존재하는 비-클로스트리디아 독소 수용체에 대한 선택적 결합 활성을 나타내는 표적화 도메인으로 대체함으로써, 수득된다. 결합 도메인의 이러한 변형으로 표적 세포상에 존재하는 비-클로스트리디아 독소 수용체에 선택적으로 결합할 수 있는 분자가 생성된다. 재표적화된 엔도펩티다제는 표적 수용체에 결합하고, 세포질내로 전위하고, 그리고 관심 뉴런 또는 비-뉴런 표적 세포의 SNARE 복합체에 이의 단백질가수분해 효과를 발휘할 수 있다.

[0005] 재표적화된 엔도펩티다제의 한 그룹은 오피오이드 표적화 도메인을 보유하는 분자들을 포함한다. 이러한 오피오이드 재표적화된 엔도펩티다제는 오피오이드 표적화 도메인, 클로스트리디아 독소 전위 도메인, 및 클로스트리디아 독소 효소적 도메인을 포함한다. 오피오이드 재표적화된 엔도펩티다제, 또는 오피오이드-TVEMPs의 비제한적 예는 예컨대, *Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, 미국 특허 제5,989,545호; *J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Nerveotoxins*, 미국 특허 제7,132,259호; *Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and 방법 For Treating Pain*, 미국 특허 제7,244,437호; *Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and 방법 For Treating Pain*, 미국 특허 제7,413,742호; *Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Method For Treating Pain*, 미국 특허 제7,415,338호; *Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and 방법 of Their Use*, 미국 특허 제7,514,088호; *Keith A. Foster, Fusion Proteins*, 미국 특허 공개 2008/0064092; *Keith A. Foster, Fusion Proteins*, 미국 특허 공개 2009/0035822; *Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Method of Their Use*, 미국 특허공개 2009/0048431; *Keith A. Foster, Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, 미국 특허 공개 2009/0162341; *Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates*, 국제 특허 공개 WO 2005/023309; 및 *Lance E. Steward, Modified Clostridial Toxin with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells*, 국제 특허 출원 WO 2008/008805에 설명되어 있으며; 각 문헌은 전문이 참고 문헌에 통합된다.

[0006] 재표적화된 엔도펩티다제와 클로스트리디아 독소 사이에 일반적인 한 가지 차이는 재표적화된 엔도펩티다제는 전형적으로 운동 신경을 표적으로 하지 않기 때문에, 재표적화된 엔도펩티다제를 포유동물에 과다 투여할 경우 관련된 치사율을 전적으로 회피할 수 없을 지라도 상당히 최소화할 수 있다는 점이다. 예를 들면, 오피오이드 재표적화된 엔도펩티다제는 치사율 증거가 관찰되기 전, 치료요법적 유효량의 10,000배로 투여할 수 있고, 그리고 이러한 치사율은 중독 프로세스 때문이 아니라 분자의 수동적 확산으로 인한 것이다. 따라서, 실질적인 모든 목적을 위하여 재표적화된 엔도펩티다제는 비-치명적 분자들이다. 비록 이러한 비-치명적 성질은 치료상 상당히 유익하지만, 클로스트리디아 독소 기반 생물제제를 제조하는데 이용되는 표준 활성 검정이 마우스 LD<sub>50</sub> 생물학적 검정, 치명성 테스트이기 때문에 제조상의 문제점이 발생한다. *S. S. Arnon et al., JAMA 285: 1059-1070 (2001)*. 현재, 모든 약제 조제업자들은 이들의 클로스트리디아 독소 제조품의 효능을 나타내는데 마우스 LD<sub>50</sub> 생물학적 검정을 이용한다. 사실, 클로스트리디아 독소의 활성 단위는 마우스 LD<sub>50</sub> 단위다. 그러나, 재표적화된 엔도펩티다제는 기본적으로 비-치명적이기 때문에, 마우스 LD<sub>50</sub> 생물학적 검정은 이러한 분자들의 효능을 평가하는데 이용될 수 없다. 따라서, 재표적화된 엔도펩티다제 흡수에 필요한 모든 단계의 일체성을 평가할 수 있는 간단하고, 신뢰성 있으며, 실증된, 그리고 정부 기관에서 수용할 수 있는 활성 검정이 상당히 중요할 것이다.

[0007] 본 명세서는 다양한 산업분야, 예컨대, 제약 및 식품 산업에 유용한 재표적화된 엔도펩티다제의 활성을 검정하

기 위한 새로운 조성물, 세포 및 방법을 제공하며, 그리고 또한 관련 장점들을 제공한다. 이러한 조성물, 세포, 그리고 방법은 살아있는 동물 또는 살아있는 동물에서 취한 조직을 이용하지 않고, 재표적화된 엔도펩티다제 작용에 필요한 모든 단계들을 평가할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0008]

도 1은 중추 및 말초 뉴런에서 신경전달물질 방출 및 클로스트리디아 독소 중독의 현행 패러다임의 도해이다. 도 1a는 중추 및 말초 뉴런의 신경전달물질 방출 기전의 도해를 나타낸다. 이 방출 프로세스는 두 단계를 포함하는 것으로 설명될 수 있다: 1) 소낭 도킹, 여기서 신경전달물질 분자들을 포함하는 소낭의 소낭-결합된 SNARE 단백질은 원형질 막에 위치한 막-결합된 SNARE 단백질과 연합된다; 그리고 2) 신경전달물질 방출, 여기서 이 소낭은 원형질 막과 융합하고, 신경전달물질 분자들은 배출된다(exocytosed). 도 1b는 중추 및 말초 뉴런에서 테타누스 및 보툴리눔 독소 활성에 대한 중독 기전(intoxication mechanism)의 개요를 나타낸다. 이러한 중독 프로세스는 4 단계를 포함하는 것으로 설명될 수 있다: 1) 수용체 결합, 여기서 클로스트리디아 독소는 클로스트리디아 수용체 복합체에 결합하고, 중독 프로세스를 개시한다; 2) 복합체 내재화(internalization), 여기서 독소 결합 후, 독소/수용체 시스템 복합체를 포함하는 소낭은 세포내로 흡수된다; 3) 경쇄 전위(translocation), 여기서 다수 사건이 발생하는 것으로 보이는데, 소낭 내부 pH의 변화, 클로스트리디아 독소 중쇄의 HN 도메인을 포함하는 채널 포어 형성, 클로스트리디아 독소 중쇄로부터 경쇄의 분리 그리고 경쇄의 방출; 그리고 4) 효소적 효율적 변경, 여기서 클로스트리디아 독소의 경쇄는 이의 효적 SNARE 기질, 예전대, SNAP-25, VAMP 또는 Syntaxin을 단백질 가수분해적으로 절단하고, 따라서 소낭 도킹 및 신경전달물질 방출을 막는다.

도 2는 ORL-1을 과다발현하는 ORL-1Clone #6 클론 세포주에서 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A에 대한 충분한 투약 반응을 나타낸다. ORL-1을 과다발현하는 ORL-1Clone #6 클론 세포주에서 Noc/A의 특이적 흡수를 관찰할 수 있다. 절단된 SNAP-25<sub>197</sub>에 대하여 ECL ELISA에서 ORL-1 안정한 세포주 Clone #6상에서 실행된 Noc/A (LH<sub>N</sub>/A+ 결합 리간드 노씨셉틴(nociceptin) 변이체)와 LH<sub>N</sub>/A (임의의 결합 도메인없이 LC/A 및 H<sub>N</sub>)을 이용한 치료는 Noc/A의 흡수가 이 클론 세포주에 특이적이라는 것을 설명하였다. 또한 이러한 클론 세포주는 Noc/A에 대해 1.2 nM의 EC<sub>50</sub>으로 상당한 민감도를 보여준다.

도 3은 SK-N-DZ 단일-세포 유도된 클론 #3 및 #22에서 Noc/A에 대한 충분한 복용량 반응을 나타낸다. LH<sub>N</sub>/A (n=4 독립적인 실험 실시)와 비교하였을 때, SK-N-DZ 클론 #3 및 #22 상에서의 특이적 흡수. 세포를 RPMI SFM +N2+B27+NGF에서 폴리-D-리신 96-웰 평판상에 도말하였다. 화합물을 이용한 치료는 22 시간 동안 실시되었다. 절단된 SNAP-25<sub>197</sub>에 대한 ECL ELISA는 Noc/A의 흡수가 이 클론 세포주에 특이적임을 설명하였다. 클론 세포주는 클론 #3의 경우 0.3nM의 EC<sub>50</sub> 그리고 클론 #22의 경우 0.9nM의 EC<sub>50</sub>으로 Noc/A에 대해 상당한 민감도를 보여준다.

도 4는 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A으로 처리된 ORL1 ND7 클론 1C11, 4B7, 및 4C9으로부터 ECL 샌드위치 ELISA 검정 결과를 보여준다. 모 ND7 및 ORL1 ND7 클론을 Noc/A으로 24시간 동안 처리후 2일간 항온처리하였다. 모 ND7 EC<sub>50</sub>은 대략 50% SNAP-25<sub>197</sub> 절단에 도달하기 때문에 계산될 수 없다. 클론 4B7 및 1C11은 80% 이상의 SNAP-25<sub>197</sub> 절단에 이른다. EC<sub>50</sub> 값은 각각 5.7±0.5, 6.7±1, 및 8.6±2 nM으로 계산되었다.

도 5는 항-노씨셉틴 다클론성 항체가 SK-N-DZ 클론 #3, 클론 #22, 및 AGN P33 ORL-1 클론 #6 세포주에서 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A 흡수를 차단할 수 있다는 것을 보여준다. 세포를 RPMI SFM+N2+B27+NGF에서 폴리-D-리신 96-웰 평판상에 도말하였고, 1 nM Noc/A중에서 상이한 희석(0-3  $\mu$ g/mL)으로 항-노씨셉틴 다클론성 항체를 포함하는 무혈청 배지에서 22 시간 동안 처리되었다.

도 6은 SiMa 클론 AF4의 세포와 확립된 세포주 PC-12를 Western 블랏 이미지에서 나타낸 것과 같이, 0.017 nM 내지 1  $\mu$ M의 농도의 재표적화된 엔도펩티다제 Dyn/A으로 처리한 것을 나타낸다. 두 세포주 모두에서 복용량-의존적 흡수를 관찰할 수 있을 것이다.

도 7은 항체 2E2A6, 1D3B8, 3C1A5 및 2C9B10 그리고 시판되는 MC-6050 및 MC-6053의 7.8 nM 표준화된 BIACore SPR 곡선을 나타낸다. 도 7a는 각 항체의 온-레이트(on-rate)에 대한 표준화된 데이터를 나타낸다. 도 7b는 각 항체의 오프-레이트(off-rate)에 대한 표준화된 데이터를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

## [0009] 상세한 설명

본 명세서는 시료안에 활성있는 재표적화된 엔도펩티다제의 존부를 판단하고, 재표적화된 엔도펩티다제의 활성/효능을 결정하는 새로운 검정을 제공한다. 본 명세서에서 공개하는 이러한 새로운 세포 기반 검정은 시료안에 있는 재표적화된 엔도펩티다제의 나노몰 양을 검정할 수 있는 세포, 시약 및 검출 방법들에 의존한다. 본 명세서에서 공개하는 이러한 세포 기반 검정은 재표적화된 엔도펩티다제의 여러 기능, 즉, 세포 표면 수용체에 결합하는 재표적화된 엔도펩티다제, 엔도펩티다제-수용체 복합체의 내재화, 세포질내로 효소적 도메인 전위, 기질의 효소적 도메인 절단등의 기능을 결정하는데 사용된다. 아래에서 더 논의되는 바와 같이, 이러한 새로운 방법 및 조성물을 이용하여 미정제 및 대량 시료를 검정하고, 그리고 고도로 정제된 두개 쇄 재표적화된 엔도펩티다제 및 제형화된 재표적화된 엔도펩티다제 생성물을 검정할 수 있고, 나아가 자동화된 고처리량(high throughput) 검정 체제를 수용할 수 있다.

[0011] 따라서, 본 명세서에서 공개된 한 양태는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체를 생산하는 면역반응 유도 조성물을 제공한다. 면역반응 유도 조성물은 어쥬번트 그리고 SNAP-25 항원을 포함하는 면역반응 유도 조성물, SNAP-25 항원에 연결된 운반체, 또는 SNAP-25 항원에 연결된 유연한 스페이서에 연결된 운반체를 포함할 수 있고, 여기서 유연한 링커는 SNAP-25 항원과 운반체 사이에 있다. BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체를 생산하는 면역 반응을 촉발시키는 임의의 그리고 모든 SNAP-25 항원은 천연 SNAP-25로부터 유도된 SNAP-25, 비 천연 SNAP-25로부터 유도된 SNAP-25 항원, 그리고 SNAP-25의 면역반응성 단편을 포함하는 SNAP-25 항원, 천연 SNAP-25 또는 비천연 SNAP-25의 SNAP-25를 포함하나 이에 한정되지 않는 SNAP-25 항원이 SNAP-25 항원으로 유용할 것으로 본다. BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체를 생산하는데 유용한 SNAP-25 항원은 서열번호: 38을 포함하나 이에 한정되지 않는, 운반체 웨티드에 연결된 카르복실화된 C 말단 글루타민을 보유한 SNAP-25 웨티드를 포함하는 SNAP-25 항원을 포함하나 이에 한정되지 않는다. BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체를 생산하는데 유용한 기타 면역반응 유도 조성물은 카르복실화된 C 말단 글루타민, SNAP-25 항원에 연결된 유연한 링커에 연결된 운반체를 포함하는 면역 반응 유도 조성물을 포함하나 이에 한정되지 않으며, 여기서 유연한 링커는 SNAP-25 항원과 운반체 사이에 있다. 임의의 그리고 모든 어쥬번트 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 (mPEG), 폴리비닐 알코올 (PVA), 완전한 및 불완전한 Freund 어쥬번트를 포함하나 이에 한정되지 않는, 면역반응 유도 조성물에 유용할 것이라고 본다.

[0012] 본 명세서에서 공개된 또 다른 양태는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 이러한 방법의 양태는 (a) 본 명세서에서 공개하는 SNAP-25 면역반응 유도 조성물을 동물에 투여하는 단계; (b) 동물로부터 α-SNAP-25 항체 또는 α-SNAP-25 항체를 생산하는 세포를 포함하는 시료를 수거하는 단계; 그리고 (c) 시료로부터 α-SNAP-25 항체를 분리하는 단계를 포함한다. 공개된 이 방법들은 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 단클론 항체 또는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 다클론 항체를 생산하는데 유용하다.

[0013] 본 명세서에서 공개된 또 다른 양태는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25를 포함하는 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체를 제공한다. 이러한 α-SNAP-25 항체는 자연적으로 생성되는 그리고 비-자연적으로 생성되는 항체, 그리고 단클론성 α-SNAP-25 항체 또는 다클론성 α-SNAP-25 항체를 모두 포함한다. BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체로 유용한 단클론 α-SNAP-25 항체는 하이브리도마 세포주 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 및 3C3E2로부터 생산된 단클론 α-SNAP-25 항체를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0014] 본 명세서에서 공개된 또 다른 양태는 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 면역 기반 방법들을 제공한다.

이러한 방법의 양태들은 (a) 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제에 의한 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감하며; (b) 처리된 세포로부터 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; (c) 이 SNAP-25 성분을 본 명세서에서 공개된  $\alpha$ -SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계; 그리고 (d)  $\alpha$ -SNAP-25 항체와 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 항체-항원 복합체의 검출은 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 나타낸다. 단계 (c)의  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 임의로 고형 상 지지물에 연결될 수 있다.

[0015]

본 명세서에서 공개하는 또 다른 양태는 오피오이드-TVEMP 활성을 검출하는 면역 기반 방법들을 제공한다. 이러한 방법의 양태들은 (a) 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있고; (b) 처리된 세포로부터 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25를 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; (c) SNAP-25 성분을 본 명세서에서 공개하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계; 그리고 (d)  $\alpha$ -SNAP-25 항체와 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25를 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 항체-항원 복합체의 검출은 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 나타낸다. 단계 (c)의  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 임의로 고형 상 지지물에 연결될 수 있다.

[0016]

본 명세서에서 공개하는 추가 양태는 포유동물에서 재표적화된 엔도펩티다제 면역 저항성을 결정하는 방법들을 제공한다. 이러한 방법들의 양태는 (a)  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존부에 대해 테스트를 받은 포유동물로부터 수득한 시험 시료에 재표적화된 엔도펩티다제를 추가하는 단계; (b) 확립된 세포주로부터의 세포를 시험 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감하며; (c) 처리된 세포로부터 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; (d) SNAP-25 성분을 본 명세서에서 공개하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계; (e)  $\alpha$ -SNAP-25 항체 및 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 검출하는 단계; (f) 시험 시료 대신 음성 대조 시료로 단계 a)-e) 단계를 반복하는 단계; 그리고 (g) 단계 (e)에서 항체-항원 복합체의 검출된 양과 단계 (f)에서 항체-항원 복합체의 검출된 양을 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 단계 (e)에서 항체-항원 복합체의 검출된 양이 단계 (f)에서 항체-항원 복합체의 검출된 양과 비교하여 더 적은 것은  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체가 존재함을 나타낸다. 단계 (d)의  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 임의로 고형 상 지지물에 연결될 수 있다. 단계 (f)의 대조 시료는 음성 대조 시료에 추가하여 양성 대조 시료 또한 포함할 수 있다.

[0017]

클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 클로스트리듐 바라티(*Clostridium baratii*) 및 클로스트리듐 부티리쿰(*Clostridium butyricum*)에서 생산되는 클로스트리디아 독소는 인간 및 기타 포유동물에서 치료 및 미용에 가장 널리 이용된다. C. 보툴리눔 균주들은 7가지 항원적으로 별개의 혈청형의 보툴리눔 독소 (BoNTs)를 만드는데, 인간(BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E 및 BoNT/F), 동물(BoNT/C1 및 BoNT/D)의 보툴리누스종독, 또는 토양으로부터 분리된(BoNT/G) 것들의 조사에 의해 확인되었다. 이들 7가지 보툴리눔 독소 혈청형은 유사한 구조 및 생물학적 성질들을 가지지만, 또한 각각은 이질성 특징들, 예컨대, 상이한 약리적 성질들을 나타낸다. 대조적으로, 테타누스 독소 (TeNT)는 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*)의 균일한 균에 의해 만들어진다. 두 가지 다른 종의 클로스트리디아, 클로스트리듐 바라티(*Clostridium baratii*) 및 클로스트리듐 부티리쿰(*Clostridium butyricum*) 또한 각각 BoNT/F 및 BoNT/E에 유사한 독소를 만든다.

[0018]

클로스트리디아 독소는 대략 150 kDa의 단일 쇄로 해독되고, 후속적으로 자연적으로 생성되는 프로테아제, 예컨대, 내생적 클로스트리디아 독소 프로테아제 또는 환경에서 생산되는 자연적으로 생성되는 프로테아제에 의해 이 황화물 루프내에 있는 단백질가수분해 절단에 의해 절단된다. 이러한 해독후 프로세스는 대략 50 kDa의 경쇄(LC)와 대략 100 kDa의 중쇄(HC)를 포함하는 두 개의 쇄 분자를 만들고, 이 두 쇄는 단일 이황화물 결합 및 비공유 상호작용에 의해 연결되어 있다. 각각의 성숙한 두개 쇄 분자는 세 개의 기능을 하는 별개의 도메인을 포함한다: 1) 신경전달물질 방출 장치의 코어 성분을 특이적으로 표적하는 아연-의존적 엔도펩티다제 활성을 포함하는 금속프로테아제 부분을 포함하는, LC에 위치한 효소적 도메인; 2) 세포내 소낭으로부터 LC를 표적 세포의

세포질로 방출을 용이하게 하는 HC(H<sub>N</sub>)의 아미노 말단 절반내에 포함된 전위 도메인; 그리고 3) 표적 세포의 표면에 위치한 수용체 복합체에 독소의 결합 활성 및 결합 특이성을 결정하는 HC (H<sub>C</sub>)의 카르복실 말단의 절반내에서 발견되는 결합 도메인.

[0019]

이러한 3개의 기능적 도메인의 결합, 전위 및 효소적 활성은 독성에 모두 필요하다. 이러한 프로세스의 세부 사항들이 모두 아직 정확하게 알려져있지 않지만, 클로스트리디아 독소가 뉴런으로 진입하여, 신경전달물질 방출을 억제하는 전반적인 세포 중독 기전은 혈청형 또는 아류형에 관계없이 유사하다. 비록 출원인은 다음의 설명에 의해 제한되는 것을 바라지는 않지만, 이러한 중독 기전은 최소한 4 단계를 포함하는 것으로 설명될 수 있다: 1) 수용체의 결합, 2) 복합체의 내재화, 3) 경쇄 전위, 그리고 4) 효소적 표적변경 (도 1). 이 프로세스는 클로스트리디아 독소의 HC 도메인이 표적 세포의 원형질 막 표면에 위치한 독소-특이적 수용체 시스템에 결합할 때 시작된다. 수용체 복합체의 결합 특이성은 각각 별도로 클로스트리디아 독소 수용체 복합체를 포함하는 것으로 보이는 강글리오시드 및 단백질 수용체의 특이적 조합에 의해 일부분 수득되는 것으로 본다. 일단 결합되면, 독소/수용체 복합체들은 엔도사이토시스(endocytosis)에 의해 내재화되고, 내재화된 소낭은 특이적 세포 내 경로로 분급된다. 이러한 전위 단계는 소낭 구획의 산성화에 의해 촉발되는 것으로 보인다. 이러한 프로세스는 소수성이 증가되고, 포어 형성을 촉진시키고, 그리고 독소의 중쇄 및 경쇄의 분리를 용이하게 하는 중요한 pH-의존적 구조적 재배열을 시작하는 것으로 본다. 일단 분리되면, 독소의 경쇄 엔도펩티다제는 세포내 소낭으로부터 시토솔로 방출되고, 여기서 신경전달물질 방출 장치의 코어 성분에 특이적으로 표적화되는 것으로 본다. 이러한 코어 단백질, 소낭-연합된 막 단백질 (VAMP)/시냅토브레빈, 25 kDa의 시냅토조몰-연합된 단백질(SNAP-25) 및 Syntaxin은 시냅스 소낭 도킹과 신경 말단의 융합에 필수적이며, 가용성 N-에틸말레이미드-민감성 인자-부착 단백질-수용체 (SNARE) 패밀리의 멤버를 구성한다. BoNT/A 및 BoNT/E는 카르복실 말단 부분에서 SNAP-25를 절단하여, 각각 9개 또는 26개의 아미노산 단편을 방출하고, 그리고 BoNT/C1은 또한 카르복실 말단 부근에서 SNAP-25를 절단하여 8개의 아미노산 단편을 방출한다. 보툴리눔 혈청형 BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F 및 BoNT/G, 그리고 테타누스 독소는 VAMP의 보존된 중추 부분에서 작용하고, VAMP의 아미노 말단 부분을 시토솔로 방출한다. BoNT/C1은 시토솔 막 표면 부근 단일 부위에서 신팩신(syntaxin)을 절단한다. 시냅스 SNAREs의 선택적 단백질가수분해는 생체내 클로스트리디아 독소에 의한 신경전달물질 방출의 차단을 설명한다. 클로스트리디아 독소의 SNARE 단백질 표적은 다양한 비-뉴런 유형내 엑소사이토시스에 공통적이며; 이들 세포내에서, 뉴런내 경쇄 펩티다제 활성은 엑소사이토시스를 억제한다. 예컨대, *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 Botulinum and Tetanus Neurotoxins in Neurons, 11(9) Trends Microbiol. 431-437, (2003)* 참고.

[0020]

재표적화된 엔도펩티다제는 일반적으로 외생적 프로테아제 절단 부위와 자연적으로 생성되는 두개 쇄 루프 프로테아제 절단 부위로 구성된다. 예컨대, *Dolly, J.O. et al., Activatable Clostridial Toxins, 미국 특허 제 7,419,676호*, 이는 전문이 참고문헌에 통합된다. 비록 재표적화된 엔도펩티다제는 표적화 모이어티의 크기로 인하여 이들의 전체적인 분자량이 다양하지만, 활성 프로세스 및 두 개 쇄 분자를 만들기 위하여 외생적 절단 부위에서 절단시 이의 의존은 클로스트리디아 독소의 경우와 기본적으로 동일하다. 예컨대, *Steward, L.E. et al., Activatable Clostridial Toxins, 미국 특허공개 2009/0005313; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxins Target Cells, 미국 특허출원 11/776,075; Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxins Target Cells, 미국 특허공개 2008/0241881*, 이들 각각은 전문이 참고문헌에 통합된다.

[0021]

본 명세서의 양태는, 부분적으로, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체를 생산하는 면역 반응 유도 조성물을 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "면역반응 유도 조성물"은 동물에 투여하였을 때, SNAP-25 항원에 대항하여 면역반응을 자극하여, 이에 의해 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체를 생산하는, SNAP-25 항원을 포함하는 조성물을 말한다. 용어 "면역반응"은 면역반응 유도 조성물에 대항하여 동물의 면역 시스템에 의한 임의의 반응을 지칭한다. 예시적인 면역반응은 세포 및 국소 그리고 전신 체액 면역, 예컨대, CD8+ CTLs의 항원-특이적 유도를 포함하는 CTL 반응, T-세포 증식성 반응 및 사이토kin 방출을 포함하는 헬퍼 T-세포 반응, 그리고 예컨대, 항체를 생산하는 반응을

포함하는 B-세포 반응을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 용어 "면역반응의 유도"는 면역반응 유도 조성물을 인코드하는 면역반응 유도 조성물 또는 폴리뉴클레오티드의 투여를 말하며, 여기서 면역반응은 예컨대, 자극되고, 개시되고 또는 유도되는 등의 영향을 받는다.

[0022] SNAP-25 면역반응 유도 조성물은 SNAP-25 항원을 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "항원"은 면역반응을 유도하는 분자를 지칭하며, 펩티드, 폴리사카라이드 및 예컨대, 지방단백질 및 당지질과 같은 지질의 콘쥬게이트를 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "SNAP-25 항원"은 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지며, 면역 반응을 유도할 수 있는 임의의 항원을 지칭한다. 면역반응 유도 조성물에 이용되는 SNAP-25 항원은 서열내에서 실질적으로 독특하여, 따라서 SNAP-25이외의 항원에 대항하여 교차 반응성인 항체를 생산할 가능성을 감소시키도록 충분히 큰 것이어야 한다. 게다가, 면역반응 유도 조성물에 이용되는 SNAP-25 항원은 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 대항하여 실질적인 면역 반응만을 촉발시켜, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단이 없는 SNAP-25으로부터 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25를 구별할 수 있는 α-SNAP-25 항체를 생산할 가능성을 증가시키도록 충분히 작은 것이어야 한다. 더우기, 매우 감도가 높은 검정을 기획하기 위하여, 반복적으로 선택성이며, 수용가능한 결합활성(avidity)으로 결합하는 단일 아미노산의 α-SNAP-25 항체를 양호한 수율로 생산하는 것이 매우 바람직하다.

[0023] SNAP-25에 존재하는 BoNT/A 절단 부위 주변 서열은 P<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>'로 나타내고, P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'는 분리되기 쉬운 결합을 나타낸다. 재표적화된 엔도펩티다제에 의한 절단시, 생성된 절단 생성물은 P<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub> 서열을 포함하는 단편과 P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>'를 포함하는 단편을 포함한다. 따라서, 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25"는 카르복실 말단 아미노산으로 P<sub>1</sub> 잔기를 가지는 임의의 SNAP-25를 지칭한다. 예를 들면, 인간 SNAP-25 (서열번호: 5)의 Q197-R198은 BoNT/A 절단 부위에 대해 P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'분리되기 쉬운 결합을 나타낸다. 이와 같이, "BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 카르복실 말단 글루타민을 가지는 SNAP-25"는 이의 카르복실 말단 아미노산에 글루타민을 가지는 임의의 SNAP-25 절단 생성물이며, 여기서 글루타민은 분리되기 쉬운 결합의 Q197을 나타낸다. 또 다른 예로서, 토르페도 마르모라타(*Torpedo marmorata*) SNAP-25 (서열번호: 16)의 K<sub>204</sub>-H<sub>205</sub>는 BoNT/A 절단 부위에 대한 P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'분리되기 쉬운 결합을 나타낸다. 이와 같이, "BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 카르복실 말단 리신을 가지는 SNAP-25"는 이의 카르복실 말단 아미노산에 리신을 가지는 임의의 SNAP-25 절단 생성물이며, 여기서 리신은 분리되기 쉬운 결합의 K<sub>204</sub>를 나타낸다.

[0024] BoNT/A 절단 부위로부터 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원은 SNAP-25 항원, 합텐, 또는 면역원성, 비-면역원성, 변경되지 않을 때 약한 면역원성인 임의의 기타 항원성 화합물의 면역원성을 강화시키도록 변형될 수 있다. 이 구체예의 양태에서, SNAP-25 항원의 분리되기 쉬운 결합으로부터 카르복실 말단 P<sub>1</sub> 잔기는 카르복실화될 수 있다. 카르복실화는 두 가지 점에서 SNAP-25 항원의 바람직한 면역원성 성질들을 증가시킨다. 첫째, 하전된 아미노산은 면역원성을 강화시키기 때문에, 카르복실 말단 잔기에 COO-기를 추가하면 SNAP-25 항원의 전체적인 면역원성을 증가시킬 것이다. 둘째, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기는 절단시에 하전된 상태이기 때문에, 카르복실 말단 잔기에 COO-기를 추가하면 본 명세서에서 공개하는 α-SNAP-25 항체가 선택적으로 결합하도록 기획된 실제 항원을 더 잘 모방할 것이다.

[0025] 이 구체예의 양태에서, SNAP-25 항원의 아미노 말단 잔기는 운반체 단백질, 예컨대, 키홀 림페트 혜모시아닌 (KLH), 오브알부민 (OVA), 티로글로불린 (THY), 소 혈청 알부민 (BSA), 대두 트립신 억제제 (STI), 또는 다중 부착 펩티드 (MAP)에 SNAP-25이 부착되도록 개조된 아미노산을 첨가함으로써, 변형될 수 있다. 예를 들면, 운반체 단백질 KLH을 콘쥬게이트하기 위하여 아미노 말단에서 시스테인 잔기로 대체될 수 있다.

[0026] 따라서, 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 항원은, 그 길이가, 예를 들어, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 또는 적어도 30개의 아미노산일 수 있다. 또 하나의 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 항원은, 그 길이가, 예를 들어, 많아야 5, 많아야 6, 많아야 7, 많아야

8, 많아야 9, 많아야 10, 많아야 11, 많아야 12, 많아야 13, 많아야 14, 많아야 15, 많아야 16, 많아야 17, 많아야 18, 많아야 19, 많아야 20, 많아야 25, 또는 많아야 30개의 아미노산일 수 있다. 또 하나의 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 항원은, 예를 들어, 7-12개의 아미노산, 10-15개의 아미노산, 또는 13-18개의 아미노산일 수 있다.

[0027] 또 하나의 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 항원은 서열번호: 33을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 항원은 서열번호: 32, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 38, 또는 서열번호: 39를 포함한다. 추가 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 항원은 서열번호: 40를 포함한다.

[0028] 또 하나의 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 항원은 서열번호: 41을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 항원은 서열번호: 42, 서열번호: 43, 서열번호: 44, 서열번호: 45, 서열번호: 46를 포함한다. 추가 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 항원은 서열번호: 47를 포함한다.

[0029] BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 생성하는 면역반응을 유발하는 임의 및 모든 SNAP-25 항원이 SNAP-25 항원으로서 유용할 수 있다는 것을 고려한다. 따라서, 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 38, 서열번호: 39, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 서열번호: 44, 서열번호: 45, 또는 서열번호: 46을 포함하는 아미노산 서열 변이체는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 생성하는 면역반응을 유발하기 위해 SNAP-25 항원으로서 유용할 수 있다. 따라서, 구체예에서, SNAP-25 항원은 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 38, 서열번호: 39, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 서열번호: 44, 또는 서열번호: 46을 포함하는 SNAP-25 항원에 대해 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 또는 적어도 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 대신 할 수 있다. 또 하나의 구체예에서, SNAP-25 항원은 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 38, 서열번호: 39, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 서열번호: 44, 서열번호: 45, 또는 서열번호: 46을 포함하는 SNAP-25 항원에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 가질 수 있다.

[0030] 면역원성, 비-면역원성, 변경되지 않을 때 약한 면역원성인 SNAP-25 항원의 면역원성을 강화시키기 위하여, 하나 이상의 운반체가 SNAP-25에 연결될 수 있다는 것을 고려한다. 비제한적 예는 예컨대, 키홀 림페트 해모시아닌 (KLH), 오브알부민 (OVA), 티로글로불린 (THY), 소 혈청 알부민 (BSA), 대두 트립신 억제제 (STI), 또는 다른 부착 웨티드 (MAP)를 포함한다. 당업계에 잘 공지되어 있는 것과 같이, 운반체에 항원을 결합시키면 비-항원성 또는 약한 항원성 항원은 항원성으로 될 수 있다. 항원을 운반체에 결합시키는 방법과 다양한 기타 운반체는 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, *Harlow and Lane, supra, 1998a; Harlow and Lane, supra, 1998b; and David W. Waggoner, Jr. et al., Immunogenicity-enhancing carriers and compositions thereof and Method of using the same*, 미국 특허공개 20040057958 (Mar. 25, 2004) 참고. 융합 단백질로서 에피토프를 발현시킴으로써 에피토프가 또한 생성될 수 있다. 폴리웨티드 융합체를 발현시키는 방법도 당업계에 공지되어 있고, 예를 들면, *Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47)*, John Wiley & Sons, New York (1999)에 설명되어 있다. SNAP-25 항원의 카르복실 말단이 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기이어야 하기 때문에, 운반체는 SNAP-25 항원의 아미노 말단에 연결되어야만 한다.

[0031] 면역원성, 비-면역원성, 변경되지 않을 때 약한 면역원성인 SNAP-25 항원의 면역원성을 강화시키기 위하여, 하나 이상의 유연한 스페이서를 SNAP-25 항원에 연결할 수 있다는 것을 고려한다. 유연한 스페이서는 SNAP-25 항원의 전체적인 웨티드 길이를 증가시키고, 유연성을 제공하여, 이로써 면역세포에게 SNAP-25 항원의 적절한 제공을 용이하게 한다. 비제한적 예로서, SNAP-25 면역반응 유도 조성물은 면역 세포에게 SNAP-25 항원을 더 잘 제공하여, 이에 의해 면역반응이 용이하도록, 하나 이상의 유연한 스페이서에 나란히 연결된 SNAP-25를 포함할 수 있다.

[0032]

펩티드를 포함하는 유연한 스페이서는 길이가 최소한 한 개의 아미노산이며, 작은 측쇄 R기를 가진 비-하전된 아미노산, 예컨대, 글리신, 알라닌, 발린, 루이신 또는 세린을 포함하며. 따라서, 한 구체예에서 유연한 스페이서는 길이가 예컨대, 최소한 1개, 최소한 2개, 최소한 3개, 최소한 4개, 최소한 5개, 최소한 6개, 최소한 7개, 최소한 8개, 최소한 9개, 또는 최소한 10개 아미노산이다. 또 다른 구체예에서, 유연한 스페이서는 길이가 예컨대, 최소한 1개, 많아야 2개, 많아야 3개, 많아야 4개, 많아야 5개, 많아야 6개, 많아야 7개, 많아야 8개, 많아야 9개, 또는 많아야 10개 아미노산이다. 다른 구체예에서, 유연한 스페이서는 예컨대, 1-3개 사이의 아미노산, 2-4개 사이의 아미노산, 3-5개 사이의 아미노산, 4-6개 사이의 아미노산, 또는 5-7개 사이의 아미노산이다. 유연한 스페이서의 비제한적 예는 예컨대, GGG, GGGG (서열번호: 57), 및 GGGGS (서열번호: 58)와 같은 G-스페이서 또는 AAA, AAAA (서열번호: 59) 및 AAAAV (서열번호: 60)와 같은 A-스페이서를 포함한다. 유연한 스페이서는 융합 단백질로서 SNAP-25 항원에 인-프레임(in-frame)으로 연결된다.

[0033]

상기에서 논의된 것과 같이, 유연한 스페이서는 SNAP-25 항원의 전체적인 펩티드 길이를 증가시키기 위하여 부분적으로 이용된다. 예를 들면, 5-10개 아미노산의 SNAP-25 항원은 SNAP-25 항원의 아미노-단부에 3-5개 아미노산의 유연한 스페이서를 연결시킴으로써 전체적인 길이가 증가될 수 있다. 또 다른 예로서, 5-10개 아미노산의 SNAP-25 항원은 SNAP-25 항원의 아미노-단부에 4-6개 아미노산의 유연한 스페이서를 연결시킴으로써 전체적인 길이가 증가될 수 있다. 또 다른 예로서, 7-12개 아미노산의 SNAP-25 항원은 SNAP-25 항원의 아미노-단부에 1-3개 아미노산의 유연한 스페이서를 연결시킴으로써 전체적인 길이가 증가될 수 있다. 또 다른 예로서, 7-12개 아미노산의 SNAP-25 항원은 SNAP-25 항원의 아미노-단부에 4-6개 아미노산의 유연한 스페이서를 연결시킴으로써 전체적인 길이가 증가될 수 있다. 유연한 스페이서에 의해 제공되는 증가된 길이로 작은 크기의 SNAP-25 항원을 선별할 수 있고, 이에 의해 SNAP-25 항원은 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 대항하여 실질적인 면역 반응만을 촉발시킬 가능성을 증가시키고, 이에 의해 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단이 없는 SNAP-25로부터 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25를 구별할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 생산할 가능성을 증가시킬 수 있다.

[0034]

본 명세서에서 공개하는 SNAP-25 면역반응 유도 조성물은 본 명세서에서 공개하는 SNAP-25 항원과 하나 이상의 어쥬번트를 임의로 포함할 수 있다는 것을 고려한다. 여기에서 사용된 것과 같이, SNAP-25 면역반응 유도 조성물과 관련하여 사용된 용어 "어쥬번트"는 SNAP-25 항원에 대한 면역 반응을 증가시키거나 다각화시키는 임의의 물질 또는 물질의 혼합물을 지칭한다. 면역반응 유도 어쥬번트는 예를 들면, 보호성 면역화에 요구되는 항원의 양 또는 면역화 횟수를 감소시키는 도움을 줄 수 있다. 면역반응 유도 조성물에 면역반응 유도 어쥬번트의 사용은 잘 공지되어 있다. 이러한 어쥬번트의 주요 목적은 면역반응을 증가시키는 것이다. 비제한적 어쥬번트는 예컨대, Freund 유형의 어쥬번트, 예컨대, Freund 완전한 어쥬번트 (FCA); Freund 불완전한 어쥬번트 (FIA); 사포게닌 글리코시드, 예컨대, 사포닌; 카르보풀; N-아세틸뮤라밀-L-알라닐-D-이소글루타민 (흔히 뮤라밀 디펩티드 또는 "MDP"로 알려짐); 그리고 리포폴리사카라이드 (LPS)을 포함하나 이에 한정되지 않는, 리포倨, 오일 상을 포함한다. 이러한 어쥬번트는 수성상과 유제의 형태로 일반적으로 이용되거나, 또는 좀더 일반적으로, 물-불 용성 무기염으로 구성될 수 있다. 이러한 무기염은 예를 들면, 수산화 알루미늄, 황산아연염, 콜로이드성 수산화 철, 인산칼슘염 또는 염화칼슘염으로 구성될 수 있다. 수산화 알루미늄 ( $Al(OH)_3$ )이 흔히 이용되는 어쥬번트다. 현재, 인간에게 사용하기 위한 유일하게 FDA-승인을 받은 어쥬번트는 알루미늄염(Alum)이며, 항원의 침전에 의해 항원을 "넣어두는데(depot)" 이용된다. 상기에서 제공된 어쥬번트는 단지 예일 뿐이다. 사실, 면역반응을 유도하기 위한 필수 특징을 만족한기만 한다면 본 명세서에서 공개하는 면역반응 유도 조성물에 임의의 면역반응 유도 어쥬번트가 이용될 수 있다.

[0035]

본 명세서에서 공개된 운반체 역시 어쥬번트로 작용할 수 있다. 특이적 어쥬번트 및 이를 만들고 이용하는 방법들은 예컨대, Gupta et al. *Vaccine*, 11: 993-306, 1993; Arnon, R. (Ed.) *Synthetic Vaccines* 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987; and David W. Waggoner, Jr. et al., *Immunogenicity-Enhancing Carriers and Compositions Thereof and Methods of Using the Same*, 미국 특허공개 No. 20040057958 (Mar. 25, 2004)에서 설명된다. 추가적인 어쥬번트는 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell, M. F. and Newman, M. J.) *Pharmaceutical Biotechnology*, Volume 6, Plenum Press (New York)의 Chapter 7(pp 141-227)에서 설명된 임의의 화합물을 포함한다. 이 명세서의 실시예들은 뮤라밀 디펩티드 (MDP) 및 Montanide 720을 포함한다. 폴리이소신:시토신(폴리 I:C) 또는 CpG 모티프를 포함하는 플라스미드 DNA과 같

은 분자들 또한 극미립자내에 포집된 항원과 함께 어쥬번트로 투여될 수 있다. 또 다른 예로서, 어쥬번트는 세포의 세포질내로 항원성 화합물의 진입을 용이하게 하는, 예컨대, 리스테리오리신, 스트렙토리신 또는 이의 혼합물과 같은 물질이다.

[0036] 따라서, 구체예에서, SNAP-25 면역반응을 유도하는 조성물은 담체 웨타이드에 연결된 카르복실화된 카르복실 말단 글루타민을 갖는 SNAP-25 항원을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 카르복실화된 카르복실 말단 글루타민을 갖는 SNAP-25 항원은 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 38, 또는 서열번호: 39를 포함한다. 이 구체예의 또 하나의 양태에서, SNAP-25 항원은 서열번호: 40을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 담체 웨타이드는 열쇠구멍삿갓조개헤모시아닌 (KLH), 난백알부민 (OVA), 갑상선글로불린 (THY), 소 혈청 알부민 (BSA), 대두 트립신 억제제 (STI) 또는 다중 부착 웨타이드 (MAP)이다.

[0037] 또 하나의 구체예에서, SNAP-25 면역반응을 유도하는 조성물은 담체 웨타이드에 연결된 카르복실화된 카르복실 말단 리신을 갖는 SNAP-25 항원을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 카르복실화된 카르복실 말단 리신을 갖는 SNAP-25 항원은 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 서열번호: 44, 서열번호: 45, 또는 서열번호: 46을 포함한다. 이 구체예의 또 하나의 양태에서, SNAP-25 항원은 서열번호: 47을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 담체 웨타이드는 열쇠구멍삿갓조개헤모시아닌 (KLH), 난백알부민 (OVA), 갑상선글로불린 (THY), 소 혈청 알부민 (BSA), 대두 트립신 억제제 (STI) 또는 다중 부착 웨타이드 (MAP)이다.

[0038] 또 하나의 구체예에서, SNAP-25 면역반응을 유도하는 조성물은 하나 이상의 연성 링커에 연결된 카르복실화된 C 말단 글루타민 및 담체 웨타이드를 갖는 SNAP-25 항원을 포함하고, 여기서, 상기 연성 링커는 SNAP-25 항원 및 담체 웨타이드 사이에 개재된다. 이 구체예의 양태에서, 카르복실화된 카르복실 말단 글루타민을 갖는 SNAP-25 항원은 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 38, 또는 서열번호: 39를 포함한다. 또 하나의 구체예에서, SNAP-25 항원은 서열번호: 46을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 담체 웨타이드는 열쇠구멍삿갓조개헤모시아닌 (KLH), 난백알부민 (OVA), 갑상선글로불린 (THY), 소 혈청 알부민 (BSA), 대두 트립신 억제제 (STI) 또는 다중 부착 웨타이드 (MAP)이다. 이 구체예의 양태에서, 연성 링커는 G-스페이서 또는 A-스페이서이다.

[0039] 또 하나의 구체예에서, SNAP-25 면역반응을 유도하는 조성물은 연성 링커에 연결된 카르복실화된 C 말단 리신 및 담체 웨타이드를 갖는 SNAP-25 항원을 포함하고, 여기서, 상기 연성 링커는 SNAP-25 항원 및 담체 웨타이드 사이에 개재된다. 이 구체예의 양태에서, 카르복실화된 카르복실 말단 리신을 갖는 SNAP-25 항원은 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 서열번호: 44, 서열번호: 45, 또는 서열번호: 46을 포함한다. 이 구체예의 또 하나의 양태에서, SNAP-25 항원은 서열번호: 47을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 담체 웨타이드는 열쇠구멍삿갓조개헤모시아닌 (KLH), 난백알부민 (OVA), 갑상선글로불린 (THY), 소 혈청 알부민 (BSA), 대두 트립신 억제제 (STI) 또는 다중 부착 웨타이드 (MAP)이다. 이 구체예의 양태에서, 연성 링커는 G-스페이서 또는 A-스페이서이다.

[0040] 본 명세서의 양태는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체를 생산하는 방법을 일부 포함한다. BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체는 당업계에 잘 공지되어 있는 상당히 다양한 방법들에 의해 만들어질 수 있다. 이러한 항체를 만들고, 이용하고, 그리고 항체 결합 특이성, 결합 친화도 및 결합활성을 검출하고, 결정하는 특이적 프로토콜은 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, *ANTIBODIES: A Laboratory Manual* (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998a); and *Using ANTIBODIES: A Laboratory Manual: Portable Protocols No. I* (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2001; and *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004; David Anderson et al., *Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use*, 미국 특허 제7,034,132호 (Apr. 25, 2005); and Beatriz M. Carreno et al., *Antibodies Against CTLA4*, 미국 특허 제7,034,121호 (Apr. 25, 2006).

[0041] 비제한적 예로서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 다클론성 항체는 예컨대, 토끼, 염소, 마우스 또는 또 다른 포유동물과 같은 동물에게, 본 명세서에서 공개된 면역반응 유도 조성물을 1회 이상 주사하여 만들 수 있다. 또 다른 비제한적 예로서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결

합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체는 계란과 같은 알에게 본 명세서에서 공개된 면역반응 유도 조성물을 1회 이상 주사하여 만들 수 있다. 면역화된 동물의 항체 역가는 고정된 항원을 이용하여 효소 연결된 면역 흡착 검정 (ELISA) 또는 세포 기반 활성 검정과 같은 표준 기술에 의해 시간을 두고 모니터할 수 있다. 원한다면, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체에 대한 단클론성 항체는 포유동물 (예컨대, 혈액으로부터)로부터 분리하고, 당업계에 공지되어 있는 기술, 예컨대, IgG 분획물을 얻기 위한 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해 추가 정제되거나, 또는 항체를 생산하는데 이용되는 웨티드에 대해 친화도 정제에 의해 추가 정제된다.

[0042] 또 다른 비제한적 예로서, 하이브리도마 방법을 이용하여, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체를 만들 수 있다. 예컨대, *Chapter 6 Monoclonal Antibodies, pp. 196-244, Harlow & Lane, supra, 1998a; and Chapter 7 Growing Hybridomas, pp. 245-282, Harlow & Lane, supra, 1998a; and Goding, pp. 59-103, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986)*을 참고. 이러한 방법에서, 숙주 동물, 예컨대, 마우스, 햄스터, 또는 또 다른 적합한 숙주 동물을 본 명세서에서 공개하는 SNAP-25 항원의 1회 이상 주사에 노출시켜, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 생산하는 또는 생산할 수 있는 램프구를 유도한다. 면역화된 동물의 항체 역가는 고정된 항원을 이용하여 효소 연결된 면역 흡착 검정 (ELISA) 또는 세포 기반 활성 검정과 같은 표준 기술에 의해 시간을 두고 모니터할 수 있다. 대안으로, 램프구는 적당한 세포 배양주를 이용하여 시험관에서 면역화될 수 있다. 면역화 후 적합한 시간 후, 항체 역가가 최대일 때, 항체를 생산하는 세포를 동물로부터 분리시킨다. 일반적으로, 인간 기원의 세포가 바람직한 경우, 말초 혈액 램프구를 이용하고, 또는 비-인간 포유동물 원천이 바람직한 경우 비장 세포 또는 램프질 세포를 이용한다. 분리된 항체를 생산하는 세포들은 하이브리도마 세포를 만들기 위하여 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적당한 융합 물질을 이용하여 불사화 세포주와 융합시킨다. 불사화된 세포주는 통상적으로 형질변환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소 및 인간 기원의 골수종 세포다. 전형적으로, 뮤린 골수종 세포주는 적합하게 면역화된 마우스로부터 수거한 비장세포와 융합시켜, 하이브리도마를 만든다. 바람직한 불사화 세포주는 하이포산틴, 아미노프테린 및 티미딘(HAT)을 포함하는 배양 배지에 민감한 마우스 골수종 세포주다. 표준 기술에 따라 융합 파트너로 임의의 다수의 골수종 세포주를 이용할 수 있는데, 예컨대, P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 또는 Sp2/0-Ag14 골수종 세포주이다. 융합으로 생성된 하이브리도마 세포들은 HAT 배지를 이용하여 선별하는, 융합안된 그리고 비생산적으로 융합된 골수종 세포들은 죽는다 (융합안된 비장 세포는 이들이 형질변환되지 않았기 때문에 배양물에서 수일 후에 죽는다). 하이브리도마 세포가 성장한 배양 배지는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의 존재에 대해 검정할 수 있다. 예를 들면, 하이브리도마 상청액은  $\alpha$ -SNAP-25 양성 배지를 이용하여, 면역침강 검정, 시험관 결합 검정, 예컨대, 방사능면역검정 (RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA), 또는 세포 기반 활성 검정에서 스크리닝할 수 있다. 이러한 기술 및 검정은 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, *Chapter 11 Immunoprecipitation, pp. 421-470, Harlow & Lane, supra, 1998a; Chapter 12 Immunoblotting, pp. 471-510, Harlow & Lane, supra, 1998a; Chapter 14 Immunoassays, pp. 553-612, Harlow & Lane, supra, 1998a* 참고. 항체가 또한 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단이 없는 SNAP-25에 비-반응성인지를 판단하기 위하여 추가 연구를 실시할 수 있다.  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의 결합 친화도는 또한 예컨대, Scatchard 검정에 의해 판단할 수 있다. 예컨대, *Peter J. Munson and David Rodbard, Ligand: A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand-Binding Systems, 107(1) Anal. Biochem. 220-239 (1980)*. 바람직한 하이브리도마 세포를 확인한 후, 원하는 단클론성 항체를 발현시키는 클론 세포주를 수득할 때까지, 단일 세포로부터 기인된 클론을 검정하기 위하여 제한된 회색 과정을 이용한다. BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 충분히 선택적이며, 충분히 높은 결합 활성으로 결합하는 항체를 추가 특징화 및 연구를 위해 선택한다.

[0043] BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체를 제조하는 또 다른 대안은 재조합 복합 면역글로불린 라이브러리, 예컨대, 항체 파아지 디스플레이 라이브러리를 SNAP-25 웨티드로 스크리닝하고, 그리고 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 결합하는 면역글로불린 라이브러리 구성원을 분리하는 것이다. 파아지 디스플레이 라이브러리를 만들고 스크리닝하기 위한 키트는 시판되며, 예컨대, Recombinant Phage Antibody System (Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ); 및 SurfZAP™ Phage 디스플레이 키트

(Stratagene, La Jolla, CA)가 있다. 추가적으로, 항체 디스플레이 라이브러리를 만들고, 스크리닝하는데 유용한 방법들 및 시약들은 예를 들면, *Ladner et al.*의 미국 특허 제5,223,409호; *Borrebaeck et al.*의 미국 특허 제5,712,089호; *Griffiths et al.*의 미국 특허 제5,885,793호; *Griffiths et al.*의 미국 특허 제5,962,255호; *McCafferty et al.*의 미국 특허 제5,969,108호; *Griffiths et al.*의 미국 특허 제6,010,884호; *Jespers et al.*의 미국 특허 제6,017,732호; *Borrebaeck et al.*의 미국 특허 제6,027,930호; *Johnson et al.*의 미국 특허 제6,140,471호; *McCafferty et al.*의 미국 특허 제6,172,197호에서 찾아 볼 수 있으며, 이들 각각은 전문이 참고문헌에 통합된다.

[0044]

본 명세서의 양태는, 부분적으로,  $\alpha$ -SNAP-25 항체 또는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 생산하는 세포를 포함하는 시료를 수거하는 것을 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 " $\alpha$ -SNAP-25 항체 또는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 생산하는 세포를 포함하는 시료"는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 최소한 하나의  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 포함하는 또는 임의의 생물학적 물질을 지칭한다. BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 포함할 수 있는, 혈액, 혈장, 혈청 및 임파액을 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 그리고 모든 시료들을 이 방법에 이용할 수 있다는 것을 고려한다. 또한, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 생산할 수 있는, CD8 세포, CTL 세포, 헬퍼 T-세포 및 B-세포를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 세포를 이 방법에 이용할 수 있다는 것을 고려한다.  $\alpha$ -SNAP-25 항체 또는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 생산하는 세포를 포함하는 시료를 개체로부터 수거하기 위한 다양한 잘 공지된 방법들을 이용할 수 있다. 예컨대, *Harlow & Lane, supra, 1998a; and Harlow & Lane, supra, 1998b.* 유사하게, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 분리시키기 위하여 프로세싱에 다양한 잘 알려진 방법들을 이용할 수 있다. 시료를 수거하기 위한 과정은 분리될 항체 유형에 근거하여 선택할 수 있다. 비제한적 예로서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체를 분리할 때, 적합한 시료는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 포함하는 혈액 시료일 것이며, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체를 분리할 때, 적합한 시료는 비장 세포 또는 하이브리도마와 같은  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 생산하는 세포일 것이다.

[0045]

본 명세서의 양태는, 부분적으로, 시료로부터 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 분리하는 것을 포함한다.  $\alpha$ -SNAP-25 항체, 예컨대, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체 또는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체를 분리하는 방법들은 당업계에 숙련자에게 잘 공지되어 있다. 예컨대, *Harlow and Lane, supra, 1998a; and Harlow and Lane, supra, 1998b* 참고. 예를 들면, 이러한  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체는 잘 공지된 기술, 예컨대, 면역혈청의 IgG 분획물을 주로 제공하는, 단백질 A 또는 단백질 G를 이용한 친화도 크로마토그래피를 이용하여 시료로부터 분리할 수 있다. 그 다음 또는 대안으로, 특이적 SNAP-25 항원을 컬럼 또는 자성 비드에 고정시켜, 면역친화도 크로마토그래피에 의해 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체를 정제할 수 있다. BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체는 통상적인 면역글로불린 정제 과정, 예컨대, 단백질 A-세파로즈, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석, 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 배지 또는 복수로부터 분리할 수 있다.

[0046]

따라서, 한 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 생산하는 방법은 (a) 운반체 웨티드에 연결된 카르복실화된 C 말단 글루타민을 가지는 SNAP-25 항원을 포함하는 SNAP-25 면역반응 유도 조성물을 동물에게 투여하는 단계; (b)  $\alpha$ -SNAP-25 항체 또는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 생산하는 세포를 포함하는 시료를 동물로부터 수거하는 단계; 그리고 (c) 시료로부터  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 분리하는 단계를 포함한다. 이 구체예의 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25

항체는 다클론성 항체다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체는 단클론성 항체다. 이 구체예의 추가 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 단클론성 항체는 IgG 아류형이다. 이 구체예의 다른 양태들에서, SNAP-25 면역반응 유도 조성물은 어쥬번트, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 (mPEG), 또는 폴리비닐알코올 (PVA)을 추가로 포함한다.

[0047] 또 다른 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체를 생산하는 방법은 (a) 유연한 링커와 운반체 웨티드에 연결된 카르복실화된 C 말단 글루타민을 가지는 SNAP-25 항원을 포함하는 SNAP-25 면역반응 유도 조성물을 동물에게 투여하는 단계, 여기서 유연한 링커는 SNAP-25 웨티드와 운반체 웨티드 사이에 있으며; (b) α-SNAP-25 항체 또는 α-SNAP-25 항체를 생산하는 세포를 포함하는 시료를 동물로부터 수거하는 단계; 그리고 (c) 시료로부터 α-SNAP-25 항체를 분리하는 단계를 포함한다. 이 구체예의 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체는 다클론성 항체다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체는 단클론성 항체다. 이 구체예의 추가 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체는 IgG 아류형이다. 이 구체예의 다른 양태들에서, SNAP-25 면역반응 유도 조성물은 어쥬번트, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 (mPEG), 또는 폴리비닐알코올 (PVA)을 추가로 포함한다.

[0048] 본 명세서의 양태는, 부분적으로, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 분리된 α-SNAP-25 항체를 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "항체"는 특정 항원에 반응하여 면역 시스템에 의해 만들어진, 그리고 이 특정 항원에 특이적으로 결합하는 분자를 지칭하며, 그리고 천연 항체 및 비천연 항체를 모두 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "분리된"은 인간의 중재에 의해 이의 자연 환경으로부터 분자를 분리시킨 것을 지칭한다. 예를 들면, 항체는 다클론성 항체, 단클론성 항체, 이량체, 다량체, 다중특이적 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 이중-기능을 하는 항체, Ig 수용체와 같이 세포에 연합된 항체, 선형 항체, 디아바디(diabody), 또는 미니바디(minibody), 그리고 원하는 생물학적 활성을 나타내는 단편 및 이들의 단일 쇄 유도체일 수 있다. 항체는 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인, 그리고 경쇄 불변 도메인 (C<sub>L</sub>) 및 중쇄 불변 도메인, CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> 및 CH<sub>3</sub>을 포함하는 전장의 면역글로불린 분자이거나 또는 전장의 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 단편, 예컨대, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, Fc 단편, Fd 단편, Fv 단편일 수 있다. 항체는 임의의 척추동물 종(예컨대, 인간, 염소, 말, 당나귀, 뮤린, 쥐, 토끼, 또는 닭)으로부터 유도될 수 있고, 임의의 유형 (예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, 및 IgA), 클래스 (예컨대, IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM) 또는 하위클라스(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)일 수 있다. 천연 항체, 비천연 항체, 그리고 이의 항원성 화합물-결합 단편의 구조에 대한 전반적인 공개는 예컨대, *Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrabeck, Antibody Engineering, 2d ed. (Oxford University Press 1995)*을 참고하며, 이를 각각은 전문이 참고문헌에 통합된다.

[0049] 자연적으로 생성되는 항체는 통상적으로 두 개의 동일한 경쇄(L)와 두 개의 동일한 중쇄(H)으로 구성된 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각 경쇄는 한 개의 이황화물 공유 결합에 의해 중쇄에 연결되며, 이황화물 링 키지의 수는 상이한 면역글로불린 이소타입의 중쇄에서 다양하다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 공간을 두고 있는 쇄내 이황화물 브릿지를 가진다. 각 중쇄는 한쪽 단부에 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)에 이어서 몇 개의 불변 도메인을 가진다. 각 경쇄는 한쪽 단부에 변 도메인(V<sub>L</sub>)과 다른쪽 단부에 불변 도메인을 가진다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제 1 불변 도메인과 나란히 배열되며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 나란히 배열된다. 특정 아미노산 잔기들은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이에 경계면을 형성하는 것으로 본다.

[0050] 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위는 항체의 가변 도메인, 예컨대, Fv 단편내에 포함된다. 이러한 단편은 하나의 중쇄 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)과 하나의 경쇄 가변 도메인 (V<sub>L</sub>)이, 단단한 비-공유적으로 연합된 이량체를 포함한다. 각 도메인은 4개의 구조 부분(FR)을 포함하는데, 이 부분들은 대체로 β-шу트 형태를 취하며, 3개의 초가변

부위에 의해 연결되어 루프 연결을 이루고, 일부의 경우는  $\beta$ -шу트 구조의 일부를 이루기도 한다. 각 초가변 부분은 상보성 결정 부위(CDRs)에 대응하는 아미노산 서열을 포함한다. 집합적으로,  $V_H$ - $V_L$  이량체의 표면에서 항원-결합 부위를 한정하는 6개의 CDR 부분의 3차원 형태가 항원-결합 특이성을 부여한다. 예컨대, Cyrus Chothia, et al., *Conformations of Immunoglobulin Hypervariable regions*, *Nature* 342(6252): 877-883 (1989); Elvin A. Kabat, et al *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 참고, 이들 각각은 전문이 참고문헌에 통합된다. 항체의 불변 도메인은 항원에 항체의 결합에 직접적으로 관련하지 않지만, 항체의 존성 세포의 세포 독성에서 항체의 참여와 같은 다양한 효과 또는 기능을 나타낸다.

[0051] 표적 항원은 CDR-형성된 항원-결합 부위에 의해 인식되는 일반적으로 소위 에피토프라고 불리는 하나 이상의 결합 부위를 가진다. 여기에서 사용된 것과 같이, "에피토프"는 "항원성 결정자"와 동의어이며, 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합하거나 이 분자와 상호작용하는 예컨대, 웨티드, 폴리사카라이드 또는 지질을 함유하는 분자와 같은 표적 항원상의 부위를 지칭한다. 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 각 항체는 상이한 구조를 가진다. 따라서, 한 개 항원은 하나 이상의 대응하는 항체를 가질 수 있다.

[0052] 다클론성 항체는 특정 항원에 결합할 수 있는 최소한 두 가지 종류의 항체를 포함하는 이질성 항체 분자 집단을 지칭한다. 정의에 의하면, 다클론성 항체는 최소한 두 가지 상이한 에피토프에 결합하는 상이한 두 가지 항체를 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "단클론성 항체" 또는 "단클론성 항체들"은 특정 항원에 결합할 수 있는 오직 한 가지 종류의 항체만을 포함하는 실질적으로 균질한 항체 집단을 지칭하는데, 예컨대, 이러한 집단을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 정의에 따르면, 단클론성 항체는 단일 에피토프에 결합한다. 단클론성 항체는 단일 항원성 부위에 대해 매우 특이적이다. 더우기, 다클론성 항체와는 대조적으로, 각 단클론성 항체는 항원에 있는 단일 결정자에 배향한다. 이들의 특이성에 추가하여, 단클론성 항체는 유리하며, 이때 단클론성 항체들은 다른 항체에 의해 오염되지 않도록 합성할 수 있다. 변경자 "단클론성"은 실질적으로 동질 항체 집단으로부터 수득되나, 임의의 특정 방법에 의한 항체 생산을 요구하는 것으로 해석되지 않는 항체의 특징을 나타낸다. 예를 들면, 본 명세서에 따라 이용된 단클론성 항체는 Kohler et al (1975) *Nature* 256:495에서 처음 설명한 하이브리도마 방법에 의해 만들어지거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 만들어질 수 있다(예를 들면: U.S. 특허 제4,816,567호; U.S. 특허 제5,807,715호). 이러한 단클론성 항체는 또한 예를 들면 Clackson et al (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks et al (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597;에서 설명하고 있는 기술을 이용하여 파아지 항체 라이브러리로부터 분리될 수도 있다.

[0053] 따라서, 구체예에서,  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25에 선택적으로 결합하는 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ ) 및 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ )을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ )은 서열번호: 72, 서열번호: 74, 서열번호: 76, 서열번호: 80, 서열번호: 82, 또는 서열번호: 133이다. 이 구체예의 또 하나의 양태에서, 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ )은 서열번호: 84, 서열번호: 86, 서열번호: 88, 서열번호: 90, 또는 서열번호: 92이다.

[0054] 또 하나의 구체예에서, 핵산 서열은 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25에 선택적으로 결합하는 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ ) 및 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ )을 포함하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 인코딩한다. 이 구체예의 양태에서, 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ )은 핵산 서열 서열번호: 71, 서열번호: 73, 서열번호: 75, 서열번호: 77, 서열번호: 79, 서열번호: 81, 또는 서열번호: 132에 의해 인코딩된다. 이 구체예의 또 하나의 양태에서, 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ )은 서열번호: 71, 서열번호: 73, 서열번호: 75, 서열번호: 77, 서열번호: 79, 서열번호: 81, 또는 서열번호: 132과 적어도 70% 동일, 적어도 75% 동일, 적어도 80% 동일, 적어도 85% 동일, 적어도 90% 동일, 적어도 95% 동일, 적어도 96% 동일, 적어도 97% 동일, 적어도 98% 동일, 또는 적어도 99% 동일한 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 이 구체예의 또 하나의 구체예에서, 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ )은 서열번호: 83, 서열번호: 85, 서열번호: 87, 서열번호: 89, 또는 서열번호: 91에 의해 인코딩된다. 이 구체예의 또 하나의 양태에서, 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ )은 서열번호: 83, 서열번호: 85, 서열번호: 87, 서열번호: 89, 또는 서열번호: 91과 적어도 70% 동일, 적어도 75% 동일, 적어도 80% 동일, 적어도 85% 동일, 적어도 90% 동일, 적어도 95% 동일, 적어도 96% 동일, 적어도 97% 동일, 적어도 98% 동일, 또는 적어도 99% 동일한 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

- [0055] 또 하나의 구체예에서,  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25에 선택적으로 결합하는 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ ) CDR1 구역, CDR2 구역, CDR3 구역, 또는 이의 임의 조합을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ ) CDR1 구역은 서열번호: 93, 서열번호: 94, 서열번호: 95, 서열번호: 118, 서열번호: 119, 또는 서열번호: 120이다. 이 구체예의 또 하나의 양태에서, 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ ) CDR2 구역은 서열번호: 96, 서열번호: 97, 서열번호: 98, 서열번호: 99, 서열번호: 121, 서열번호: 122, 또는 서열번호: 123이다. 이 구체예의 또 하나의 구체예에서, 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ ) CDR3 구역은 서열번호: 100, 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 124, 서열번호: 134, 또는 서열번호: 135이다.
- [0056] 또 하나의 구체예에서,  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25에 선택적으로 결합하는 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ ) CDR1 구역, CDR2 구역, CDR3 구역, 또는 이의 임의 조합을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ ) CDR1 구역은 서열번호: 103, 서열번호: 104, 서열번호: 105, 서열번호: 106, 서열번호: 107, 서열번호: 125, 서열번호: 126, 서열번호: 127, 서열번호: 128, 또는 서열번호: 129이다. 이 구체예의 또 하나의 양태에서, 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ ) CDR2 구역은 서열번호: 108, 서열번호: 109, 서열번호: 110, 서열번호: 111, 또는 서열번호: 112이다. 이 구체예의 또 하나의 구체예에서, 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ ) CDR3 구역은 서열번호: 113, 서열번호: 114, 서열번호: 115, 서열번호: 116, 또는 서열번호: 117이다.
- [0057] 또 하나의 구체예에서,  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합한다. 이 구체예의 양태에서, 에피토프는 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 또는 서열번호: 37을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 에피토프는 서열번호: 39, 서열번호: 40, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 또는 서열번호: 44를 포함한다.
- [0058] 상기에서 논의된 것과 같이, SNAP-25에 존재하는 BoNT/A 절단 부위 주변 서열은  $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$ 로 나타내고,  $P_1-P_1'$ 는 분리되기 쉬운 결합을 나타낸다. BoNT/A에 의한 절단시, 생성된 절단 생성물은  $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$  서열을 포함하는 단편과  $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$ 를 포함하는 단편을 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25"는  $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$  서열을 포함하는 임의의 SNAP-25 절단 생성물에는 선택적으로 결합하지만,  $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$  서열을 포함하는 임의의 SNAP-25 절단 생성물 또는 BoNT/A 절단 부위의  $P_1-P_1'$  분리되기 쉬운 결합을 가진 임의의 SNAP-25에는 선택적으로 결합하지 않는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 지칭한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 " $\alpha$ -SNAP-25<sub>197</sub> 항체"는 서열번호: 5의 글루타민 197에 대응하는 카르복실 말단  $P_1$  잔기를 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 " $\alpha$ -SNAP-25<sub>204</sub> 항체"는 서열번호: 16의 리신 204에 대응하는 카르복실 말단  $P_1$  잔기를 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합하는 항체를 지칭한다.
- [0059] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "선택적으로"는 오로지 한 가지 방식 또는 오로지 한 가지로 독특한 효과 또는 영향 또는 반응하는 것을 말한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 항체에 대해 언급될 때 용어 "선택적으로 결합한다" 또는 "선택적 결합"은 비-표적 에피토프와 실질적으로 교차 반응하지 않도록 지적된 표적 에피토프에 항체의 식별적인 결합을 지칭한다. 여기에서 정의된 바와 같이, 웨티드 에피토프의 최소 크기는 약 5개 아미노산이며, 그리고 웨티드 에피토프는 전형적으로 최소한 5개, 최소한 6개, 최소한 7개, 최소한 8개, 최소한 9개, 최소한 10개, 최소한 15개, 또는 최소한 20개의 아미노산을 포함한다. 웨티드 에피토프는 불연속일 수 있는데, 예컨대, 에피토프는 웨티드의 1차 구조에 인접하지 않지만, 웨티드의 2차, 3차 또는 4차 구조에 의해 에피토프로 올 수 있는 아미노산 잔기를 포함한다. 더욱기, 에피토프는 아미노산 서열이외의 부분을 포함하는데, 예컨대, 탄수화물 모이어티, 지방단백질 또는 당지질과 같은 지질 모이어티, 또는 포스포릴화된 아미노산과 같은 화학적으로 변형된 아미노산 모이어티를 포함할 수도 있다. 이 구체예의 양태들에서, BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는, 최소한 5개, 최소한 6개, 최소한 7개, 최소한 8개, 최소한 9개, 최소한 10개, 최소한 15개, 또는 최소한 20개의 아미노산을 포

함하는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있다. 이 구체예의 다른 양태들에서, BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체는 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는, 많아야 5개, 많아야 6개, 많아야 7개, 많아야 8개, 많아야 9개, 많아야 10개, 많아야 15개, 또는 많아야 20개 아미노산을 포함하는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있다.

[0060] 선택적 결합은 결합 성질들, 예컨대, 결합 친화도, 결합 특이성, 및 결합활성을 포함한다. *David J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, pp. 240 (1998)* 참고. 결합 친화도는 항체의 에피토프 결합 부위에서 항체 잔기의 시간 길이를 지칭하며, 그리고 항체가 이의 에피토프에 결합하는 강도로 간주할 수 있다. 결합 친화도는 평형에서 K<sub>d</sub>/K<sub>a</sub>의 비율로 정의되는 항체의 평형 해리 상수 (KD)로 설명된 수 있다. 여기서 K<sub>a</sub>는 항체의 연합 속도 상수이며, K<sub>d</sub> 항체의 해리 속도 상수다. 결합 친화도는 연합 및 해리 모두에 의해 결정되는데, 다만 높은 연합 또는 낮은 해리가 고친화도를 담보할 수는 없다. 연합 속도 상수(K<sub>a</sub>), 또는 온-레이트 상수 (Kon)는 단위 시간 당 결합 사건의 수를 측정하거나, 또는 항체 및 항원이 가역적으로 항체-항원 복합체로 연합되는 경향을 측정한다. 연합 속도 상수는 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>로 나타내고, 다음과 같이 부호화된다: [Ab] × [Ag] × Kon. 연합 속도 상수가 클수록 항체가 항원에 더 신속하게 결합하거나, 항체와 항원 사이의 결합 친화도가 더 높다. 해리 속도 상수 (K<sub>d</sub>), 또는 오프-레이트 상수 (Koff)는 단위 시간당 해리 사건의 수를 측정하거나, 항체-항원 복합체가 이들 성분 분자들, 즉 항체와 항원으로 가역적으로 분리되는 경향을 측정한다. 해리 속도 상수는 s<sup>-1</sup>로 나타내고, 다음과 같이 부호화된다: [Ab + Ag] × Koff. 해리 속도 상수가 작을수록, 항체는 이의 항원에 더 단단하게 결합하거나, 또는 항체와 항원 사이의 결합 친화도가 더 크다. 평형 해리 상수 (KD)는 평형상태에서 새로운 항체-항원 복합체가 형성되는 속도가 항체-항원 복합체가 해리되는 속도와 동일한 속도를 측정한다. 평형 해리 상수는 M으로 나타내고, Koff/Kon=[Ab] × [Ag]/[Ab + Ag]으로 정의되며, 여기서 [Ab]는 항체의 몰 농도이며, [Ag]는 항원의 몰 농도이며, 그리고 [Ab + Ag]는 항체-항원 복합체의 몰 농도이며, 여기서 모든 농도는 시스템이 평형 상태일 때 각 성분의 농도다. 평형 해리 상수가 작을수록, 항체는 이의 항원에 더 단단히 결합하거나, 또는 항체와 항원 사이에 더 큰 결합 친화도를 가진다.

[0061] 따라서, 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 1×10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 1×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 1×10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 또는 1×10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 미만의 해리속도상수를 가질 수 있다. 또 하나의 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 1×10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 초과, 1×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 초과, 1×10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 초과, 1×10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 초과의 해리속도상수를 가질 수 있다. 다른 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체의 결합 친화도는 1×10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 내지 1×10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, 1×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 내지 1×10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, 1×10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 내지 1×10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, 또는 1×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> 내지 1×10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>의 해리속도상수를 가질 수 있다.

[0062] 또 하나의 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체의 결합 친화도는 1×10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 1×10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 또는 1×10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup> 미만의 해리속도상수를 가질 수 있다. 이 구체예의 다른 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 1.0×10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 2.0×10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 3.0×10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 4.0×10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 5.0×10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 6.0×10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 7.0×10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> 미만, 8.0×10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, 또는 9.0×10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> 미만의 해리속도상수를 가질 수 있다. 또 하나의 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 1×10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> 초과, 1×10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> 초과, 또는 1×10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup> 초과의 해리속도상수를 가질 수 있다. 이 구체예의 다른 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분

리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체의 결합 친화도는, 예를 들어  $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  초파,  $2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  초파,  $3.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  초파,  $4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  초파,  $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  초파,  $6.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  초파,  $7.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  초파,  $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  초파, 또는  $9.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  초파의 해리속도상수를 가질 수 있다.

[0063] 또 하나의 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체의 결합 친화도는 0.500 nM 미만의 평형해리상수를 가질 수 있다. 이 구체예의 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체의 결합 친화도는, 예를 들어, 0.500 nM 미만, 0.450 nM 미만, 0.400 nM 미만, 0.350 nM 미만, 0.300 nM 미만, 0.250 nM 미만, 0.200 nM 미만, 0.150 nM 미만, 0.100 nM 미만, 또는 0.050 nM 미만의 평형해리상수를 가질 수 있다. 또 하나의 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체의 결합 친화도는 0.500 nM 초파의 평형해리상수를 가질 수 있다. 이 구체예의 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 0.500 nM 초파, 0.450 nM 초파, 0.400 nM 초파, 0.350 nM 초파, 0.300 nM 초파, 0.250 nM 초파, 0.200 nM 초파, 0.150 nM 초파, 0.100 nM 초파, 또는 0.050 nM 초파의 평형해리상수를 가질 수 있다.

[0064] 또 하나의 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체의 결합 친화도는, 예를 들어  $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  미만,  $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  미만,  $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  미만,  $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  미만, 또는  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  미만의 온전한 SNAP-25의 해리속도상수를 가질 수 있다. 또 하나의 구체예에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체의 결합 친화도는, 예를 들어, 많아야  $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 많아야  $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 많아야  $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 많아야  $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 또는 많아야  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 의 온전한 SNAP-25의 해리속도상수를 가질 수 있다.

[0065] 결합 특이성은 그 에피토프를 함유하는 분자 및 그 에피토프를 함유하지 않는 분자 사이를 구별하기 위한 항체의 능력이다. 결합 특이성을 측정하는 하나의 수단은 그 에피토프를 함유하지 않는 분자에 대한 항체의 Kon 해리속도에 대해 에피토프를 함유하는 분자에 대한 항체의 Kon 해리속도를 비교하는 것이다. 예를 들어, 에피토프, 예컨대, 예를 들어, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단이 없는 SNAP-25 에피토프 또는 BoNT/A 절단 부위의 온전한  $P_1$ - $P_1'$  분리되기 쉬운 결합을 갖는 SNAP-25 에피토프를 포함하지 않는 SNAP-25에 대해, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 대한  $\alpha$ -SNAP-25 항체의 해리속도상수 (Ka)를 비교하는 것이다. 이 구체예의 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체는, 예를 들어 미만,  $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  미만,  $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  미만,  $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  미만,  $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  미만, 또는  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  미만의 에피토프(들)을 포함하지 않는 SNAP-25에 대한 해리속도상수 (Ka)를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체는, 예를 들어, 많아야  $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 많아야  $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 많아야  $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 많아야  $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  또는 많아야  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 의 그 에피토프(들)을 포함하지 않는 SNAP-25에 대한 해리속도상수 (Ka)를 갖는다.

[0066] 이 구체예의 추가 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체는, 예를 들어, 적어도 2-배 초파, 적어도 3-배 초파, 적어도 4-배 초파, 적어도 5-배 초파, 적어도 6-배 초파, 적어도 7-배 초파, 적어도 8-배 초파, 또는 적어도 9-배 초파의 에피토프를 포함하지 않는 SNAP-25에 대해 그 에피토프에 대한 해리속도상수 (Ka)를 갖는다. 이 구체예의 추가 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체는, 예를 들어, 적어도 10-배 초파, 적어도 100-배 초파, 적어도

1,000-배 초과 또는 적어도 10,000-배 초과의 에피토프를 포함하지 않는 SNAP-25에 대해 그 에피토프에 대한 해리속도상수 (Ka)를 갖는다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체는, 예를 들어, 많아야 1-배 초과, 많아야 2-배 초과, 많아야 3-배 초과, 많아야 4-배 초과, 많아야 5-배 초과, 많아야 6-배 초과, 많아야 7-배 초과, 많아야 8-배 초과, 또는 많아야 9-배 초과의 에피토프를 포함하지 않는 SNAP-25에 대해 그 에피토프에 대한 해리속도상수 (Ka)를 갖는다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체는, 예를 들어, 많아야 10-배 초과, 많아야 100-배 초과, 많아야 1,000-배 초과 또는 많아야 10,000-배 초과의 에피토프를 포함하지 않는 SNAP-25에 대해 그 에피토프에 대한 해리속도상수 (Ka)를 갖는다.

[0067] BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체의 결합 특이성은, α-SNAP-25 항체가 에피토프, 예컨대, 예를 들어, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖지 않는 SNAP-25 에피토프 또는 BoNT/A 절단 부위의 온전한 P<sub>1</sub>-P<sub>1'</sub> 분리되기 쉬운 결합을 갖는 SNAP-25 에피토프를 포함하지 않는 SNAP-25에 대해 그의 SNAP-25 에피토프를 구별할 수 있는 정도의 비를 특징으로 할 수 있다. 이 구체예의 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체는, 예를 들어, 적어도 2:1, 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 64:1, 적어도 7:1, 적어도 8:1, 적어도 9:1, 적어도 10:1, 적어도 15:1, 적어도 20:1, 적어도 25:1, 적어도 30:1, 적어도 35:1, 또는 적어도 40:1의 에피토프를 포함하지 않는 SNAP-25에 대해 그의 SNAP-25 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체는, 예를 들어, 적어도 2:1, 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 6:1, 적어도 7:1, 적어도 8:1, 적어도 9:1, 적어도 10:1, 적어도 15:1, 적어도 20:1, 적어도 25:1, 적어도 30:1, 적어도 35:1, 또는 적어도 40:1의 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖지 않은 SNAP-25에 대해 그 SNAP-25 에피토프에 대한 결합 특이성 비를 갖는다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 갖는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체는, 예를 들어, 적어도 2:1, 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 64:1, 적어도 7:1, 적어도 8:1, 적어도 9:1, 적어도 10:1, 적어도 15:1, 적어도 20:1, 적어도 25:1, 적어도 30:1, 적어도 35:1, 또는 적어도 40:1의 BoNT/A 절단 부위의 흡입 P<sub>1</sub>-P<sub>1'</sub> 분리되기 쉬운 결합을 갖는 SNAP-25에 대해 그 SNAP-25 에피토프에 대한 결합 특이성 비를 갖는다.

[0068] 기능을 하는 친화도으로도 공지된 결합활성(binding avidity)는 다가의 항체 및 이의 항원 사이의 기능을 하는 결합 강도의 총 합을 지칭한다. 항체 분자들은 하나 이상의 결합 부위(예컨대, IgG의 경우 2, IgM의 경우 10)를 가질 수 있고, 그리고 많은 항원은 하나 이상의 항원성 부위를 포함한다. 항체의 결합활성은 개별 항체 결합 부위의 결합 친화도에 의존적이며, 항체를 완전하게 해리시키기 위해서 모든 항체-항원 상호작용은 동시에 깨어져야 하기 때문에 결합 친화도보다는 결합 활성이 더 크다. BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체는 이러한 항체의 임의의 그리고 모든 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 것으로 본다.

[0069] 따라서, 한 구체예에서, α-SNAP-25 항체는 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 항체다. 이 구체예의 양태들에서, α-SNAP-25 항체는 카르복실 말단 글루타민을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체 또는 카르복실 말단 리신을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체다. 이 구체예의 다른 양태들에서, α-SNAP-25 항체는 서열번호: 5의 글루타민 197에 대응하는 카르복실 말단 P<sub>1</sub> 잔기를 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체 또는 서열번호: 16의 리신 204에 대응하는 카르복실 말단 P<sub>1</sub> 잔기를 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체다. 이 구체예의 다른 양태들에서, α-SNAP-25 항체는 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 38, 서열번호: 39, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 서열번호: 44, 서열번호: 45, 또는 서열번호: 46의 카르복실 말단 아미노산 서열을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 α-SNAP-25 항체다.

[0070] 본 명세서의 양태는, 부분적으로, 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 면역 기반 방법을 포함한다. 본 명세서에서 공개하는 면역 기반 방법들은 예컨대, 정확도, 정밀도, 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 범위, 특이성, 선택성, 선형성, 견고성(ruggedness), 및 시스템 적합성을 포함하는 몇 가지 매개변수에 의해 평가될 수 있다. 방법의 정확도는 검정 방법의 정확성의 척도이거나, 또는 측정된 값과 통상적인 참값 또는 용인되는 기준 값 사이에 일치의 근접함을 말한다. 방법의 정밀도는 이러한 과정을 동질성 시료의 여러 샘플링에 반복적으로 적용하였을 때, 개별 테스트 결과 사이에 합의 정도를 말한다. 이와 같이, 정밀도는 1) 검정 변이성내에서; 2) 당일 변이성 (반복성)내에서; 3) 일간(between-day)의 변이성 사이에서 (중간 정밀도); 그리고 4) 실험실간의 (between-lab) 변이성 (재생성)에서 평가한다. 변동 계수(CV%)는 관찰된 또는 이론 평균값에 대하여 나타낸 정밀도의 정량적 측정이다.

[0071] 본 명세서에서 공개하는 면역 기반 방법은 배경에 대하여 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25를 포함하는 α-SNAP-25 항체-항원 복합체의 존재를 검출할 수 있어야만 한다. 방법의 검출한계(LOD)는 음성 기준 또는 블랭크와는 상당히 상이한 신호를 발생시키는 검정물의 농도를 지칭하며, 배경과는 구별될 수 있는 검정물의 최저 농도를 나타낸다.

[0072] 따라서, 구체예에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은 음성 대조군 또는 블랭크(blank)과 유의적으로 상이한 양으로, 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOD를 검출할 수 있다. 이 구체예의 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 재표적화된 엔도펩티다아제의 10 ng 이하, 9 ng 이하, 8 ng 이하, 7 ng 이하, 6 ng 이하, 5 ng 이하, 4 ng 이하, 3 ng 이하, 2 ng 이하, 1 ng 이하의 LOD를 갖는다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 900 pg 이하, 800 pg 이하, 700 pg 이하, 600 pg 이하, 500 pg 이하, 400 pg 이하, 300 pg 이하, 200 pg 이하, 100 pg 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOD를 갖는다. 이 구체예의 추가 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 90 pg 이하, 80 pg 이하, 70 pg 이하, 60 pg 이하, 50 pg 이하, 40 pg 이하, 30 pg 이하, 20 pg 이하, 10 pg 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOD를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 9 pg 이하, 8 pg 이하, 7 pg 이하, 6 pg 이하, 5 pg 이하, 4 pg 이하, 3 pg 이하, 2 pg 이하, 1 pg 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOD를 갖는다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 0.9 pg 이하, 0.8 pg 이하, 0.7 pg 이하, 0.6 pg 이하, 0.5 pg 이하, 0.4 pg 이하, 0.3 pg 이하, 0.2 pg 이하, 0.1 pg 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOD를 갖는다.

[0073] 이 구체예의 또 하나의 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 100 nM 이하, 90 nM 이하, 80 nM 이하, 70 nM 이하, 60 nM 이하, 50 nM 이하, 40 nM 이하, 30 nM 이하, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 9 nM 이하, 8 nM 이하, 7 nM 이하, 6 nM 이하, 5 nM 이하, 4 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 또는 1 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOD를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 900 pM 이하, 800 pM 이하, 700 pM 이하, 600 pM 이하, 500 pM 이하, 400 pM 이하, 300 pM 이하, 200 pM 이하, 또는 100 pM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOD를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 100 pM 이하, 90 pM 이하, 80 pM 이하, 70 pM 이하, 60 pM 이하, 50 pM 이하, 40 pM 이하, 30 pM 이하, 20 pM 이하, 또는 10 pM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOD를 갖는다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 10 pM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제, 9 pM 이하, 8 pM 이하, 7 pM 이하, 6 pM 이하, 5 pM 이하, 4 pM 이하, 3 pM 이하, 2 pM 이하, 또는 1 pM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOD를 갖는다.

[0074] 정량한계 (LOQ)는 정확도 및 정밀도의 허용가능한 수준으로 측정될 수 있는 시료 또는 표본에서 검정물의 최저 및 최고 농도이다. 정량의 하한이란, 검출 방법이 배경으로부터 일관되게 측정할 수 있는 최저 복용량을 의미한다. 정량의 상한은, 검출 방법이 신호 발생의 포화 전에 일관되게 측정할 수 있는 최고 복용량이다. 방법의 선형 범위는 최저 및 최고 정량한계 사이의 범위이다. 선형 범위는 정량의 상한으로부터 정량의 하한을 빼서 계산된다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "하한 점근치에 대한 신호 대 잡음 비"란, 배경 신호에 의해 분리된 검출의 하한에서 상기 방법에서 검출된 신호를 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "상한 점근치에 대한 신호 대 잡음 비"란 배경 신호에 의해 분리된 검출의 상한에서 상기 방법에서 검출된 신호를 의미한다.

[0075] 따라서, 구체예에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은 음성 대조군 또는 블랭크(blank)로부터 유의적으로 상이한 양으로, 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 검출할 수 있다. 이 구체예의 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 10 ng 이하, 9 ng 이하, 8 ng 이하, 7 ng 이하, 6 ng 이하, 5 ng 이하, 4 ng 이하, 3 ng 이하, 2 ng 이하, 1 ng 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 갖는다. 이 구체예의 또 다른 양

태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 900 pg 이하, 800 pg 이하, 700 pg 이하, 600 pg 이하, 500 pg 이하, 400 pg 이하, 300 pg 이하, 200 pg 이하, 100 pg 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 갖는다. 이 구체예의 추가 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 90 pg 이하, 80 pg 이하, 70 pg 이하, 60 pg 이하, 50 pg 이하, 40 pg 이하, 30 pg 이하, 20 pg 이하, 10 pg 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 9 pg 이하, 8 pg 이하, 7 pg 이하, 6 pg 이하, 5 pg 이하, 4 pg 이하, 3 pg 이하, 2 pg 이하, 1 pg 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 갖는다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 0.9 pg 이하, 0.8 pg 이하, 0.7 pg 이하, 0.6 pg 이하, 0.5 pg 이하, 0.4 pg 이하, 0.3 pg 이하, 0.2 pg 이하, 0.1 pg 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 갖는다.

[0076] 이 구체예의 또 하나의 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 100 nM 이하, 90 nM 이하, 80 nM 이하, 70 nM 이하, 60 nM 이하, 50 nM 이하, 40 nM 이하, 30 nM 이하, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 9 nM 이하, 8 nM 이하, 7 nM 이하, 6 nM 이하, 5 nM 이하, 4 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 또는 1 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 900 pM 이하, 800 pM 이하, 700 pM 이하, 600 pM 이하, 500 pM 이하, 400 pM 이하, 300 pM 이하, 200 pM 이하, 또는 100 pM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 100 pM 이하, 90 pM 이하, 80 pM 이하, 70 pM 이하, 60 pM 이하, 50 pM 이하, 40 pM 이하, 30 pM 이하, 20 pM 이하, 또는 10 pM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 갖는다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 10 pM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제, 9 pM 이하, 8 pM 이하, 7 pM 이하, 6 pM 이하, 5 pM 이하, 4 pM 이하, 3 pM 이하, 2 pM 이하, 또는 1 pM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 갖는다.

[0077] 본 발명의 양태를 실시하는데 유용한 면역 기반 검정은 50% 이하의 정밀도를 가져야 한다. 이 구체예의 양태에서, 면역 기반 검정은 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 또는 20% 이하의 정밀도를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, 면역 기반 검정은 15% 이하, 10% 이하, 또는 5% 이하의 정밀도를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, 면역 기반 검정은 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하의 정밀도를 갖는다.

[0078] 본 발명의 양태를 실시하는데 유용한 면역 기반 검정은 적어도 50%의 정확도를 가져야 한다. 이 구체예의 양태에서, 면역 기반 검정은 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 또는 적어도 80%의 정확도를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, 면역 기반 검정은 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 정확도를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, 면역 기반 검정은 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 정확도를 갖는다.

[0079] 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은 통계적으로 유의한 하한 점근치에 대한 신호 대 잡음 비 및 통계적으로 유의한 상한 점근치에 대한 신호 대 잡음 비를 가져야 한다. 이 구체예의 양태에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 6:1, 적어도 7:1, 적어도 8:1, 적어도 9:1, 적어도 10:1, 적어도 15:1 또는 적어도 20:1의 하한 점근치에 대한 신호 대 잡음 비를 갖는다. 이 구체예의 다른 양태에서, 면역 기반 방법은, 예를 들어, 적어도 10:1, 적어도 15:1, 적어도 20:1, 적어도 25:1, 적어도 30:1, 적어도 35:1, 적어도 40:1, 적어도 45:1, 적어도 50:1, 적어도 60:1, 적어도 70:1, 적어도 80:1, 적어도 90:1, 또는 적어도 100:1, 적어도 150:1, 적어도 200:1, 적어도 250:1, 적어도 300:1, 적어도 350:1, 적어도 400:1, 적어도 450:1, 적어도 500:1, 적어도 550:1, 또는 적어도 600:1의 상한 점근치에 대한 신호 대 잡음 비를 갖는다.

[0080] 방법의 특이성은 다른 관련 성분, 예컨대, 예를 들어, 부분-활성 또는 무활성 검정물을 제외한 관심 검정물을 측정하기 위한 방법의 능력을 의미한다. 방법의 선택성은 시료 중 다양한 물질을 구별하기 위한 검정 방법의 능력을 의미한다. 방법의 선형성은, 직접, 또는 시료 중 검정물의 농도에 비례하는 명확한 수학적 변환에 의한 결과를 유도하는 능력이다. 따라서, 구체예에서, 본 명세서에 개시된 면역 기반 방법은, 예를 들어, 70% 이하, 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 또는 10% 이하의 완전 활성의 재표적화된 엔도펩티다아제의 활성을 갖는 부분 활성의 재표적화된 엔도펩티다아제로부터 완전 활성의 재표적화된 엔도펩티다아제를 구별 할 수 있다.

[0081] 방법의 견고성은 정상적인(그러나 가변적인) 테스트 조건들하에서 동일한 시료에 대해 수득된 테스트 결과의 재생성을 말한다. 과정의 강건성(robustness)은 방법 매개변수들에서 작지만 그러나 고의적인 변이에 의해 영향을 받지 않고 유지되는 능력의 측정이며, 정상적 용도에서 이의 신뢰성을 표시한다. 따라서, 견고성(ruggedness)은

불가피한 변화(unavoidable changes)를 평가하지만, 강건성(robustness)은 고의적인 변화(deliberate changes)를 평가한다. 견고성 및 강건성에 의해 평가되는 전형적인 매개변수는 냉동/해동, 항온처리 횟수, 항온처리 온도, 시약의 수명, 시료 준비, 시료 보관, 세포 계대 횟수, 많은 재표적화된 엔도펩티다제, 경제 간의 변동성, 그리고 닉킹(nicking) 반응 사이의 변동성의 효과를 포함한다. 세포 기반 검정의 강건성 매개변수는 세포 응행(냉동의 시작, 중간 및 끝), 세포 계대 수준, 세포 접종 밀도, 세포 비축 밀도(배양에서 얼마나 많은 날), 플라스크에서 세포 나이(접종까지 대기 시간), 항온처리 시간, 상이한 플레이트, 과량의 혈청, 그리고 시약들의 원천을 포함한다. 방법의 시스템 적합성은 기준 표준 또는 기준 분자의 검정에 의해 시간의 경과에 따른 시약 및 기구의 성과를 포함하는 검정 성과를 판단하는 것을 말한다. 장비, 전자공학, 검정 성과, 그리고 검정될 시료가 통합된 시스템을 구성하는 사실을 언급하는 FDA 지침에서 시스템 적합성이 강조된다. 시스템 적합성은 반응에 대한 로그 복용량을 플로팅할 때, 병행 테스트함으로써 평가될 수 있는데, 기준의 연속 희석물과 시료의 연속 희석물은 평행 곡선을 평행 곡선을 만들어야 한다.

**[0082]** 본 명세서의 양태는, 부분적으로, 확립된 세포주로부터의 세포를 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "세포"는 재표적화된 엔도펩티다제에 의한 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 임의의 진핵 세포 또는 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있는 임의의 진핵 세포를 지칭한다. 용어 "세포"는 예컨대, 뮤린, 쥐, 돼지, 소, 말, 영장류 그리고 인간과 같은 다양한 유기체의 세포를 포함하며; 예컨대, 뉴런 및 비-뉴런과 같은 다양한 세포 유형의 세포; 그리고 이질성 세포 집단, 조직 또는 유기체로부터 또는 이의 일부로부터 분리할 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "확립된 세포주"는 "불사화된 세포주" 또는 "형질변형된 세포주"와 동의어이며, 그리고 유기체, 조직, 또는 기관 원천으로부터 유도된 세포 집단으로부터 무한정 증식을 위하여 선택된 세포의 세포 배양물을 지칭한다. 정의에 따르면, 확립된 세포주는 주요 세포의 세포 배양물을 배제한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "1차(primary) 세포"는 새로운 조직 또는 기관으로부터 직접적으로 수거한 세포이며, 무한적으로 증식하는 능력을 가지지는 않는다. 확립된 세포주는 이질성 세포 집단 또는 균질한 세포 집단을 포함할 수 있다. 단일 세포로부터 유도된 확립된 세포주는 클론성 세포주라고 한다. 확립된 세포주는 이의 세포가 전체적인 세포 기전을 겪기 위해 세포에 필요한 모든 성분을 내생적으로 발현하는 것일 수 있으며, 이에 의해 재표적화된 엔도펩티다제는 SNAP-25 기질을 단백질가수분해에 의해 절단하며, 그리고 재표적화된 엔도펩티다제가 이의 수용체에 결합, 엔도펩티다제/수용체 복합체의 내재화, 재표적화된 엔도펩티다제 경쇄를 세포내 소낭으로부터 세포질로 전위 그리고 SNAP-25의 단백질가수분해에 의해 절단하며, 그리고 재표적화된 엔도펩티다제가 이의 수용체에 결합, 엔도펩티다제/수용체 복합체의 내재화, 재표적화된 엔도펩티다제 경쇄를 세포내 소낭으로부터 세포질로 전위 그리고 SNAP-25의 단백질가수분해에 의해 절단하며, 또한, 유전적으로 조작된 세포주라고도 지칭되는, 이러한 확립된 세포주로부터의 세포는 예컨대, 외생적 재표적화된 엔도펩티다제, 예컨대, 외생적 ORL1, 외생적 DOR, 외생적 KOR, 외생적 MOR, 외생적 갈라닌 수용체 1, 외생적 갈라닌 수용체 2, 외생적 갈라닌 수용체 3, 또는 이의 임의의 조합을 발현할 수 있다.

**[0083]** 본 명세서의 양태는, 부분적으로, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포를 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한", "재표적화된 엔도펩티다제에 의한 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 세포" 또는 "재표적화된 엔도펩티다제에 의한 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포"는 전체적인 세포 기전을 겪을 수 있는 세포를 지칭하며, 여기서 재표적화된 엔도펩티다제는 SNAP-25 기질을 단백질 가수분해적으로 절단하여 엑소사이토시스를 억제시키며, 그리고 세포 기전은 재표적화된 엔도펩티다제가 이의 수용체에 결합, 엔도펩티다제/수용체 복합체의 내재화, 재표적화된 엔도펩티다제 활성 쇄의 세포내 소낭으로부터 세포질로의 전위 및 SNAP-25의 단백질가수분해 절단을 포함한다. 정의에 의해, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 세포는 최소한 하나의 재표적화된 엔도펩티다제 수용체와 최소한 하나의 SNAP-25 기질을 발현하거나 또는 발현하도록 조작되어야 한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있는 세포" 또는 "재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있는 확립된 세포주를 포함하는 세포"는 전체적인 세포 기전을 겪을 수 있는 세포를 지칭하며, 여기서 재표적화된 엔도펩티다제는 SNAP-25 기질을 단백질 가수분해적으로 절단하여 엑소사이토시스를 억제시키며, 그리고 세포 기전은 재표적화된 엔도펩티다제가 이의 수용체에 결합, 엔도펩티다제/수용체 복합체의 내재화, 재표적화된 엔도펩티다제 활성 쇄의 세포내 소낭으로부터 세포질로의 전위 및 SNAP-25의 단백질가수분해 절단을 포함한다. 정의에 의해, 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있는 세포는 최소한 하나의 재표적화된 엔도펩티다제 수용체와 최소한 하나의 SNAP-25 기질을 발현하거나 또는 발현하도록 조작되어야 한다.

**[0084]** 따라서, 구체예에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 취약하다. 이 구체예의

양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는, 예를 들어, 재표적화된 엔도펩티다아제의 약 100 nM 이하, 약 90 nM 이하, 약 80 nM 이하, 약 70 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하까지 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 취약하다. 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는, 예를 들어, 재표적화된 엔도펩티다아제의 약 9 nM 이하, 약 8 nM 이하, 약 7 nM 이하, 약 6 nM 이하, 약 5 nM 이하, 약 4 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 또는 약 1 nM 이하까지 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 취약하다. 또 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는, 예를 들어, 재표적화된 엔도펩티다아제의 약 0.9 nM 이하, 약 0.8 nM 이하, 약 0.7 nM 이하, 약 0.6 nM 이하, 약 0.5 nM 이하, 약 0.4 nM 이하, 약 0.3 nM 이하, 약 0.2 nM, 또는 약 0.1 nM 이하까지 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 취약하다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 정해진 항목, 수, %, 또는 용어의 값을 정량화할 때의 용어 "약"은 정해진 항목, %, 파라미터, 또는 용어의 값을  $\pm 10\%$ 의 범위를 의미한다.

[0085] 또 하나의 구체예에서, 확립된 세포주를 포함하는 세포는 재표적화된 엔도펩티다아제를 흡수할 수 있다. 이 구체예의 양태에서, 확립된 세포주를 포함하는 세포는, 예를 들어, 약 100 nM 이하, 약 90 nM 이하, 약 80 nM 이하, 약 70 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제를 흡수할 수 있다. 다른 양태에서, 확립된 세포주를 포함하는 세포는 약 9 nM 이하, 약 8 nM 이하, 약 7 nM 이하, 약 6 nM 이하, 약 5 nM 이하, 약 4 nM 이하, 약 3 nM 이하, 약 2 nM 이하, 또는 약 1 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제를 흡수하는 능력을 갖는다. 또 다른 양태에서, 확립된 세포주를 포함하는 세포는 약 0.9 nM 이하, 약 0.8 nM 이하, 약 0.7 nM 이하, 약 0.6 nM 이하, 약 0.5 nM 이하, 약 0.4 nM 이하, 약 0.3 nM 이하, 약 0.2 nM 이하, 또는 약 0.1 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제를 흡수하는 능력을 갖는다.

[0086] 본 명세서의 양태는, 부분적으로, 본 명세서에서 공개하는 재표적화된 엔도펩티다제에 선택적 결합을 나타내는 확립된 세포주로부터의 세포를 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 재표적화된 엔도펩티다제와 관련할 때, 용어 "선택적으로 결합하는" 또는 "선택적 결합"은 재표적화된 엔도펩티다제가 비-표적 수용체에 실질적으로 결합하지 않도록 지시된 표적 수용체에 재표적화된 엔도펩티다제의 차등적 결합을 지칭한다. 재표적화된 엔도펩티다제에 대한 선택적 결합을 나타내는 확립된 세포주로부터의 세포의 수준은 재표적화된 엔도펩티다제의 표적화 도메인이 없는 분자에 대해 이들 세포가 나타내는 비-선택적 흡수의 정도에 의해 측정될 수 있다. 재표적화된 엔도펩티다제의 표적화 도메인이 없는 분자에 대한 비-선택적 흡수를 평가하는 한 가지 방법은 LH<sub>N</sub> 단편의 비-선택적 흡수를 측정하는 것이다. LH<sub>N</sub> 단편은 클로스트리디아 독소 전위 도메인 및 클로스트리디아 독소 효소적 도메인을 포함하지만, 전체적으로 임의의 표적화 도메인은 없다. LH<sub>N</sub> 단편의 비제한적 예는 LH<sub>N</sub>/A 단편, LH<sub>N</sub>/B 단편, LH<sub>N</sub>/C 단편, LH<sub>N</sub>/D 단편, LH<sub>N</sub>/E 단편, LH<sub>N</sub>/F 단편, 및 LH<sub>N</sub>/G 단편을 포함한다. 예시적인 LH<sub>N</sub>/A 단편은 폴리뉴클레오티드 분자 서열번호: 147에 의해 인코드된 서열번호: 146이다.

[0087] 따라서, 한 구체예에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제에 대하여 선택적 결합을 나타낸다. 이 구체예의 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 예컨대, 검정된 전체 활성의 최소한 75%, 검정된 전체 활성의 최소한 80%, 검정된 전체 활성의 최소한 85%, 검정된 전체 활성의 최소한 90%, 또는 검정된 전체 활성의 최소한 95%를 나타내는 재표적화된 엔도펩티다제에 대하여 선택적 결합을 나타낸다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 예컨대, 검정된 전체 활성의 약 75% 내지 약 100%, 또는 검정된 전체 활성의 약 80% 내지 약 100%, 또는 검정된 전체 활성의 약 85% 내지 약 100%, 또는 검정된 전체 활성의 약 90% 내지 약 100%를 나타내는 재표적화된 엔도펩티다제에 대하여 선택적 결합을 나타낸다.

[0088] 또 다른 구체예에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 LH<sub>N</sub> 단편의 최소한의 비-선택적 흡수를 나타낸다. 이 구체예의 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 LH<sub>N</sub> 단편의 비-선택적 흡수를 나타내는데, 예컨대, 측정된 전체 흡수의 많아야 25%, 측정된 전체 흡수의 많아야 20%, 측정된 전체 흡수의 많아야 15%, 측정된 전체 흡수의 많아야 10%, 또는 측정된 전체 흡수의 많아야 5%이다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 LH<sub>N</sub> 단편의 비-선택적 흡수를 나타내는데, 예컨대, 측정된 전체 흡수의 약 0% 내지 약 20%, 측정된 전체 흡수의 약 0% 내지 약 15%, 측정된 전체 흡수의 약 0% 내지 약 10%, 또는 측정된 전체 흡수의 약 0% 내지 약 5%이다.

[0089] 다른 구체예에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 LH<sub>N</sub>/A 단편의 최소 비-선택적 흡수를 나타낸다. 이 구체예의 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 LH<sub>N</sub>/A 단편의 비-선택적 흡수를 나타내는데, 예컨대, 측정된 전체 흡수

의 많아야 25%, 측정된 전체 흡수의 많아야 20%, 측정된 전체 흡수의 많아야 15%, 측정된 전체 흡수의 많아야 10%, 또는 측정된 전체 흡수의 많아야 5%를 나타낸다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는  $LH_N/A$  단편의 비-선택적 흡수를 나타내는데, 예컨대, 측정된 전체 흡수의 약 0% 내지 약 25%, 측정된 전체 흡수의 약 0% 내지 약 20%, 측정된 전체 흡수의 약 0% 내지 약 15%, 측정된 전체 흡수의 약 0% 내지 10%, 또는 측정된 전체 흡수의 0% 내지 약 5%이다.

[0090] 본 명세서의 양태는, 부분적으로, 재표적화된 엔도펩티다제에 대하여 민감성 및 선택적 결합을 부여하기 위하여 원형질 막위에 충분한 수의 수용체 결합 부위를 나타내는 확립된 세포주로부터의 세포를 포함한다. 평형 포화 결합 검정은 다양한 농도에서 리간드의 전체적인 그리고 비-특이적 결합을 측정한다. 리간드에 대한 평형 해리 상수 ( $K_d$ ) 및 최대 수의 수용체 결합 부위,  $B_{max}$ 는 비-선형 회귀 검정을 이용하여 특이적 결합으로부터 계산할 수 있다. 특이적 결합은 관찰된 전체 결합으로부터 비-특이적 결합을 차감하여 계산한다.  $K_d$ 는 최대 결합의 절반에 도달하는데 요구되는 리간드의 농도이며, 몰농도로 측정된다.  $B_{max}$ 는 원형질 막 위에 존재하는 최대 수의 결합 부위를 나타내며, pmol/mg, pmol/세포, fmol/세포, 또는 부위/세포로 측정된다.

[0091] 따라서, 한 구체예에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제에 대하여 민감성 및 선택적 결합을 부여하기 위하여 원형질 막 위에 충분한 수의 수용체 결합 부위를 나타낸다. 이 구체예의 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제의 표적화 리간드에 대해 예컨대, 최소한 0.1 fmol/세포, 최소한 0.2 fmol/세포, 최소한 0.3 fmol/세포, 최소한 0.4 fmol/세포, 최소한 0.5 fmol/세포, 최소한 0.6 fmol/세포, 최소한 0.7 fmol/세포, 최소한 0.8 fmol/세포, 최소한 0.9 fmol/세포, 또는 최소한 1.0 fmol/세포의  $B_{max}$  값을 나타낸다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제의 표적화 리간드에 대해 예컨대, 최소한 1 fmol/세포, 최소한 2 fmol/세포, 최소한 3 fmol/세포, 최소한 4 fmol/세포, 최소한 5 fmol/세포, 최소한 6 fmol/세포, 최소한 7 fmol/세포, 최소한 8 fmol/세포, 최소한 9 fmol/세포, 또는 최소한 10 fmol/세포의  $B_{max}$  값을 나타낸다.

[0092] 본 명세서의 양태는, 부분적으로, 클론 세포주를 유도한 모 세포주의 세포보다 더 안정하며, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 클론 세포주의 세포를 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "안정한"은 동일한 또는 유사한 계대수에서 클론 세포주를 유도한 모 세포주의 세포가 나타내는 상대적인  $EC_{50}$ , 민감도, 효능, 잘-규정된 상위 점근선, 및/또는 잘-규정된 복용량(dose)-반응 곡선의 값과 유사한 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 대한 상대적인  $EC_{50}$ , 민감도, 효능, 잘-규정된 상위 점근선, 및/또는 잘-규정된 복용량-반응 곡선을 나타내는 특정 계대수에서 확립된 세포주로부터의 세포를 지칭하며, 여기서 두 검정은 모두 동일한 검정 조건들과 동일한 재표적화된 엔도펩티다제를 이용한다.

[0093] 따라서, 한 구체예에서, 확립된 클론 세포주의 세포는 클론 세포주를 유도한 모 세포주와 비교하여 더 안정하다. 이 구체예의 양태에서, 확립된 클론 세포주의 세포는 모 SK-N-DZ 세포주와 비교하여 더 안정하다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 확립된 클론 세포주의 세포는 모 SK-N-DZ 세포주 ATCC CRL-2149와 비교하여 더 안정하다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 확립된 클론 세포주의 세포는 클론 세포주를 유도한 모 세포주와 비교하여 예컨대, 최소한 5회 이상의 계대, 최소한 10회 이상의 계대, 최소한 15회 이상의 계대, 최소한 20회 이상의 계대, 최소한 25회 이상의 계대, 또는 최소한 30회 이상의 계대에 대해 더 안정하다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 확립된 클론 세포주의 세포는 클론 세포주를 유도한 모 세포주와 비교하여 예컨대, 최소한 5 회 이상의 계대, 최소한 10 회 이상의 계대, 최소한 15 회 이상의 계대, 최소한 20 회 이상의 계대, 최소한 25 회 이상의 계대, 또는 최소한 30 회 이상의 계대에 대해 더 안정하다.

[0094] 본 명세서의 양태는, 부분적으로, 복수의 세포 계대에 걸쳐 안정한, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 클론 세포주의 세포를 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "안정한"은 동일한 확립된 클론 세포주의 세포이지만, 이전 계대의 세포에 의해 나타나는 상대적인  $EC_{50}$ , 민감도, 효능, 잘-규정된 상위 점근선, 및/또는 잘-규정된 복용량-반응 곡선에 대한 값과 유사한 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 대한 상대적인  $EC_{50}$ , 민감도, 효능, 잘-규정된 상위 점근선, 및/또는 잘-규정된 복용량-반응 곡선을 나타내는 특정 계대의 확립된 클론 세포주의 세포를 지칭하며, 여기서 두 검정은 모두 동일한 검정 조건들과 동일한 재표적화된 엔도펩티다제를 이용한다.

[0095] 본 명세서에서 공개하는 확립된 세포주로부터의 세포는 복수의 세포 계대에 걸쳐 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 대해 일관된 민감도를 나타낼 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "재표적화된 엔도펩티다제 활성에

대한 민감도"는 검정에서 비-치료 기준에 의해 검출되는 신호 또는 배경 신호 이상으로 일관되게 측정될 수 있는 최저 복용량(does)을 지칭한다.

[0096] 따라서, 구체예에서, 확립된 클론 세포주로부터의 세포는 예를 들어, 100 nM 이하, 약 80 nM 이하, 약 70 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하, 약 0.9 nM 이하, 약 0.8 nM 이하, 약 0.7 nM 이하, 약 0.6 nM 이하, 약 0.5 nM 이하, 약 0.4 nM 이하, 약 0.3 nM 이하, 약 0.2 nM 이하, 또는 약 0.1 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제인 임의의 소정의 계대에 대한 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 민감도를 나타낸다. 이 구체예의 양태에서, 확립된 클론 세포주로부터의 세포는, 예를 들어, 약 0.01 nM 내지 약 100 nM, 약 0.01 nM 내지 약 75 nM, 약 0.01 nM 내지 약 50 nM, 약 0.01 nM 내지 약 25 nM, 약 0.01 nM 내지 약 20 nM, 약 0.01 nM 내지 약 15 nM, 약 0.01 nM 내지 약 10 nM, 약 0.01 nM 내지 약 5 nM, 약 0.001 nM 내지 약 100 nM, 약 0.001 nM 내지 약 75 nM, 약 0.001 nM 내지 약 50 nM, 약 0.001 nM 내지 약 25 nM, 약 0.001 nM 내지 약 20 nM, 약 0.001 nM 내지 약 15 nM, 약 0.001 nM 내지 약 10 nM, 또는 약 0.001 nM 내지 약 5 nM의 재표적화된 엔도펩티다아제인 임의의 소정의 계대에 대한 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 민감도를 나타낸다.

[0097] 또 하나의 구체예에서, 확립된 클론 세포주로부터의 세포는, 예를 들어, 5개 이상의 세포 계대, 10개 이상의 세포 계대, 15개 이상의 세포 계대, 20개 이상의 세포 계대, 25개 이상의 세포 계대, 30개 이상의 세포 계대, 35개 이상의 세포 계대, 40개 이상의 세포 계대, 45개 이상의 세포 계대, 또는 50개 이상의 세포 계대에 대해 약 100 nM 이하, 약 75 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 25 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 15 nM 이하, 약 10 nM 이하, 또는 약 1 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 민감도를 나타낸다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 클론 세포주로부터의 세포는, 예를 들어, 약 15 내지 약 60개의 계대, 약 20 내지 약 60개의 계대, 약 25 내지 약 60개의 계대, 약 30 내지 약 60개의 계대, 약 35 내지 약 60개의 계대, 약 40 내지 약 60개의 계대, 약 45 내지 약 60개의 계대, 약 50 내지 약 60개의 계대, 약 15 내지 약 50개의 계대, 약 20 내지 약 50개의 계대, 약 25 내지 약 50개의 계대, 약 30 내지 약 50개의 계대, 약 35 내지 약 50개의 계대, 약 40 내지 약 50개의 계대, 약 15 내지 약 40개의 계대, 약 20 내지 약 40개의 계대, 약 25 내지 약 40개의 계대, 또는 약 30 내지 약 40개의 계대에 대해 약 100 nM 이하, 약 75 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 25 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 15 nM 이하, 약 10 nM 이하, 또는 약 1 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 민감도를 나타낸다.

[0098] 본 명세서에서 공개하는 확립된 세포주로부터의 세포는 복수의 세포 계대에 걸쳐 재표적화된 엔도펩티다제 흡수 또는 재표적화된 엔도펩티다제 활성의 일관된 상대적인 표능을 나타낼 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "상대적인 효능"은 현재 검정에서 검출된 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 대한 상위 점근선이 기준 표준, 기준 분자, 또는 검정에 이용된 기준 계대 수에서 검출된 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 대한 상위 점근선과 얼마나 비교되는지를 나타낸다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "상위 점근선에 대한 신호 대 잡음 비"는 검정에서 검출의 상한에서 검출된 신호를 비-치료 기준에 의해 검출되는 신호 또는 배경 신호로 나눈 것을 말한다. 검출의 상한은 검정에서 신호의 포화가 일어나기 전 지속적으로 측정할 수 있는 최대 복용량이다.

[0099] 따라서, 구체예에서, 본 명세서에 개시된 확립된 세포주로부터의 세포는 복수의 세포 계대에 관해서 명확한 상한 점근치를 나타내고 검정에 대해 일관되고 알맞은 신호 대 잡음 비를 유지할 수 있다. 이 구체예의 양태에서, 본 명세서에 개시된 확립된 세포주로부터의 세포는, 예를 들어, 5개 이상의 세포 계대, 10개 이상의 세포 계대, 15개 이상의 세포 계대, 20개 이상의 세포 계대, 25개 이상의 세포 계대, 30개 이상의 세포 계대, 35개 이상의 세포 계대, 40개 이상의 세포 계대, 45개 이상의 세포 계대, 또는 50개 이상의 세포 계대에 관해서, 예를 들어, 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 6:1, 적어도 7:1, 적어도 8:1, 적어도 9:1, 적어도 10:1, 적어도 15:1, 적어도 20:1, 적어도 25:1, 적어도 30:1, 적어도 35:1, 적어도 40:1, 적어도 45:1, 적어도 50:1, 적어도 60:1, 적어도 70:1, 적어도 80:1, 적어도 90:1, 또는 적어도 100:1, 적어도 150:1, 적어도 200:1, 적어도 250:1, 적어도 300:1, 적어도 350:1, 적어도 400:1, 적어도 450:1, 적어도 500:1, 적어도 550:1, 또는 적어도 600:1의 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 명확한 상한 점근치에 대한 신호 대 잡음 비를 가져야 한다. 이 구체예의 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 확립된 세포주로부터의 세포는, 예를 들어, 약 15 내지 약 60개의 계대, 약 20 내지 약 60개의 계대, 약 25 내지 약 60개의 계대, 약 30 내지 약 60개의 계대, 약 35 내지 약 60개의 계대, 약 40 내지 약 60개의 계대, 약 45 내지 약 60개의 계대, 약 50 내지 약 60개의 계대, 약 15 내지 약 50개의 계대, 약 20 내지 약 50개의 계대, 약 25 내지 약 50개의 계대, 약 30 내지 약 50개의 계대, 약 35 내지 약 50개의 계대, 약 40 내지 약 50개의 계대, 약 15 내지 약 40개의 계대, 또는 약 30 내지 약 40개의 계대에 관해서, 예를 들어, 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 6:1, 적어도 7:1, 적어도 8:1, 적어도 9:1, 적어도 10:1, 적어도 15:1, 적어도 20:1, 적어도 25:1, 적어도 30:1, 적어도 35:1, 적어도 40:1, 적어도 45:1, 적어도 50:1, 적어도 60:1, 적어도 70:1, 적어도 80:1, 적어도 90:1, 또는 적어도 100:1, 적어도 150:1, 적어도 200:1, 적어도 250:1, 적어도 300:1, 적어도 350:1, 적어도 400:1, 적어도 450:1, 적어도 500:1, 적어도 550:1, 또는 적어도 600:1의 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 명확한 상한 점근치에 대한 신호 대 잡음 비를 가져야 한다.

도 25:1, 적어도 30:1, 적어도 35:1, 적어도 40:1, 적어도 45:1, 적어도 50:1, 적어도 60:1, 적어도 70:1, 적어도 80:1, 적어도 90:1, 또는 적어도 100:1, 적어도 150:1, 적어도 200:1, 적어도 250:1, 적어도 300:1, 적어도 350:1, 적어도 400:1, 적어도 450:1, 적어도 500:1, 적어도 550:1, 또는 적어도 600:1의 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 명확한 상한 점근치에 대한 신호 대 잡음 비를 가져야 한다.

[0100] 본 명세서에서 공개하는 확립된 세포주로부터의 세포는 복수의 세포 계대에 걸쳐 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대하여 잘-규정된 복용량-반응 곡선을 나타낼 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "용량-반응 곡선"은 미가공 데이터를 해당 검정을 위한 통계학적 모델에 얼마나 잘 적용시키는지를 말한다. 비제한적 예로서, 4개의 매개변수 기호 피트를 가진 S 자 곡선은 효소적 활성 검정, 예컨대 효능 검정의 복용량-반응 곡선이다. 또 다른 비제한적 예로서, 한 부위 포화 피트를 가진 리간드 결합은 리간드/항체 결합 검정에 대한 복용량-반응 곡선이다.

[0101] 따라서, 구체예에서, 본 명세서에 개시된 확립된 세포주로부터의 세포는 복수의 세포 계대에 관해서 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 명확한 복용량-반응 곡선을 나타낸다. 이 구체예의 양태에서, 본 명세서에 개시된 확립된 세포주로부터의 세포는, 예를 들어, 5개 이상의 세포 계대, 10개 이상의 세포 계대, 15개 이상의 세포 계대, 20개 이상의 세포 계대, 25개 이상의 세포 계대, 30개 이상의 세포 계대, 35개 이상의 세포 계대, 40개 이상의 세포 계대, 45개 이상의 세포 계대, 또는 50개 이상의 세포 계대에 관해서 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 명확한 복용량-반응 곡선을 나타낸다. 이 구체예의 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 확립된 세포주로부터의 세포는, 예를 들어, 약 15 내지 약 60개의 계대, 약 20 내지 약 60개의 계대, 약 25 내지 약 60개의 계대, 약 30 내지 약 60개의 계대, 약 35 내지 약 60개의 계대, 약 40 내지 약 60개의 계대, 약 45 내지 약 60개의 계대, 약 50 내지 약 60개의 계대, 약 15 내지 약 50개의 계대, 약 20 내지 약 50개의 계대, 약 25 내지 약 50개의 계대, 약 30 내지 약 50개의 계대, 약 35 내지 약 50개의 계대, 약 40 내지 약 50개의 계대, 약 15 내지 약 40개의 계대, 약 20 내지 약 40개의 계대, 약 25 내지 약 40개의 계대, 또는 약 30 내지 약 40개의 계대에 관해서 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 명확한 복용량-반응 곡선을 나타낸다.

[0102] 본 명세서에서 공개하는 확립된 세포주로부터의 세포는 복수의 세포 계대에 걸쳐 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대해 일관된 상대적인  $EC_{50}$  값을 나타낼 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "상대적인  $EC_{50}$ " 또는 "상대적인  $EC_{50}$  값"은 기준 표준, 기준 분자, 또는 해당 검정에 이용된 기준 계대수에 대해 계산된  $EC_{50}$  값에 대해 표준화된 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한  $EC_{50}$  값이다.

[0103] 따라서, 구체예에서, 확립된 클론 세포주로부터의 세포는 복수의 세포 계대에 관해서 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 일관된 상대  $EC_{50}$ 를 나타낸다. 이 구체예의 양태에서, 확립된 클론 세포주로부터의 세포는 예를 들어, 5개 이상의 세포 계대, 10개 이상의 세포 계대, 15개 이상의 세포 계대, 20개 이상의 세포 계대, 25개 이상의 세포 계대, 30개 이상의 세포 계대, 35개 이상의 세포 계대, 40개 이상의 세포 계대, 45개 이상의 세포 계대, 또는 50개 이상의 세포 계대에 관해서, 예를 들어, 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 약  $\pm 10\%$ , 약  $\pm 20\%$ , 약  $\pm 30\%$ , 약  $\pm 40\%$ , 약  $\pm 50\%$ , 약  $\pm 60\%$ , 약  $\pm 70\%$ , 또는 약  $\pm 75\%$ 의 상대  $EC_{50}$ 인 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 일관된 상대  $EC_{50}$ 를 나타낸다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 클론 세포주로부터의 세포는 예를 들어, 5개 이상의 세포 계대, 10개 이상의 세포 계대, 15개 이상의 세포 계대, 20개 이상의 세포 계대, 25개 이상의 세포 계대, 30개 이상의 세포 계대, 35개 이상의 세포 계대, 40개 이상의 세포 계대, 45개 이상의 세포 계대, 또는 50개 이상의 세포 계대에 관해서, 예를 들어, 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 약  $\pm 10\%$  내지 약  $75\%$ , 약  $\pm 10\%$  내지 약  $70\%$ , 약  $\pm 10\%$  내지 약  $60\%$ , 약  $\pm 10\%$  내지 약  $50\%$ , 약  $\pm 10\%$  내지 약  $40\%$ , 약  $\pm 10\%$  내지 약  $30\%$ , 또는 약  $\pm 10\%$  내지 약  $20\%$ 의 상대  $EC_{50}$ 인 재표적화된 엔도펩티다아제 활성에 대한 상대  $EC_{50}$ 을 나타낸다.

[0104] 본 발명의 양태는, 부분적으로, 재표적화된 엔도펩티다아제를 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "재표적화된 엔도펩티다아제"는 "표적화된 소낭 세포외방출 모듈레이터(Modulator) 단백질" 또는 "TVEMP"와 동의어이다. 재표적화된 엔도펩티다아제의 비제한적인 예는 예를 들어 하기에 개시되어 있다: Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. 특허 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. 특허 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, U.S. 특허 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods and Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, U.S. 특허 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. 특허 공보

2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, U.S. 특허 공보 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. 특허출원 No. 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*, U.S. 특허출원 No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. 특허출원 No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, 국제 특허 공보 WO 2006/059093; 및 Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2006/059105, 이들 각각은 그 전체가 참고로 통합된다. 재표적화된 엔도펩티다아제의 비제한적인 예는 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 130, 및 서열번호: 131을 포함한다.

[0105]

따라서, 구체예에서, 검출될 재표적화된 엔도펩티다아제 활성을 재표적화된 엔도펩티다아제로부터 유래된다. 이 구체예의 양태에서, 검출될 재표적화된 엔도펩티다아제 활성을 하기에 개시된 재표적화된 엔도펩티다아제로부터 유래된다: Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. 특허 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. 특허 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, U.S. 특허 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods and Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, U.S. 특허 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. 특허 공보 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, U.S. 특허 공보 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. 특허출원 No. 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*, U.S. 특허출원 No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. 특허출원 No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, 국제 특허 공보 WO 2006/059093; 및 Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2006/059105, 이들 각각은 그 전체가 참고로 통합된다. 이 구체예의 양태에서, 재표적화된 엔도펩티다아제는 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 130, 또는 서열번호: 131이다.

[0106]

또 하나의 구체예에서, 검출될 재표적화된 엔도펩티다아제 활성을 하기에 개시된 재표적화된 엔도펩티다아제와 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 재표적화된 엔도펩티다아제로부터 유래한다: Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. 특허 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. 특허 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, U.S. 특허 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods and Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, U.S. 특허 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. 특허 공보 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, U.S. 특허 공보 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. 특허출원 No. 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*, U.S. 특허출원 No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. 특허출원 No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, 국제 특허 공보 WO 2006/059093; 및 Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2006/059105, 이들 각각은 그 전체가 참고로 통합된다. 또 하나의 구체예에서, 검출될 재표적화된 엔도펩티다아제 활성을 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 130, 또는 서열번호: 131의 재표적화된 엔도펩티다아제와, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 재표적화된 엔도펩티다아제로부터 유래한다.

[0107]

이 구체예의 다른 양태에서, 검출될 재표적화된 엔도펩티다아제 활성을 하기에 개시된 재표적화된 엔도펩티다아제에 대해 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상,

20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 비-인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 재표적화된 엔도펩티다아제로부터 유래한다: Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. 특허 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. 특허 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, U.S. 특허 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods and Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, U.S. 특허 공보 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, U.S. 특허 공보 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. 특허출원 No. 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*, U.S. 특허출원 No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. 특허출원 No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, 국제 특허 공보 WO 2006/059093; 및 Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2006/059105, 이들 각각은 그 전체가 참고로 통합된다. 이 구체예의 다른 양태에서, 검출될 재표적화된 엔도펩티다아제 활성을 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 130, 또는 서열번호: 131의 재표적화된 엔도펩티다아제에 대해 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 비-인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 재표적화된 엔도펩티다아제로부터 유래한다.

[0108]

이 구체예의 또 다른 양태에서, 검출될 재표적화된 엔도펩티다아제 활성을 하기에 개시된 재표적화된 엔도펩티다아제에 대해 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 비천연 재표적화된 엔도펩티다아제 변이체로부터 유래한다: Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. 특허 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. 특허 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, U.S. 특허 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods and Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, U.S. 특허 공보 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, U.S. 특허 공보 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. 특허출원 No. 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*, U.S. 특허출원 No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. 특허출원 No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, 국제 특허 공보 WO 2006/059093; 및 Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2006/059105, 이들 각각은 그 전체가 참고로 통합된다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 검출될 재표적화된 엔도펩티다아제 활성을 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 130, 또는 서열번호: 131의 재표적화된 엔도펩티다아제에 대해 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 비천연 재표적화된 엔도펩티다아제 변이체로부터 유래한다.

[0109]

또 하나의 구체예에서, 검출될 재표적화된 엔도펩티다아제 활성을 오피오이드(opioid) 재표적화된 엔도펩티다아제로부터 유래한다. 오피오이드(opioid) 재표적화된 엔도펩티다아제, 또는 오피오이드(opioid)-TVEMP의 비제한적인 예는 예를 들어 하기에 기재되어 있다: Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. 특허 5,989,545; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, U.S. 특허 7,132,259; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. 특허 7,244,437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. 특허 7,413,742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. 특허 7,415,338; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin*

*Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. 특허 7,514,088; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, U.S. 특허 공보 2008/0064092; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, U.S. 특허 공보 2009/0035822; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. 특허 공보 2009/0048431; Keith A. Foster, *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, U.S. 특허 공보 2009/0162341; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2005/023309; 및 Lance E. Steward, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for  $\beta$ -Clostridial Toxin Target Cells*, 국제특허출원 WO 2008/008805; 이들 각각은 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다.

[0110] 또 하나의 구체예에서, 검출될 재표적화된 엔도펩티다아제 활성은 갈라난 재표적화된 엔도펩티다아제로부터 유래한다. 갈라난 재표적화된 엔도펩티다아제, 또는 갈라난-TVEMP의 비제한적인 예는 예를 들어 하기에 기재되어 있다: Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capability and Enhanced Targeting Activity*, U.S. 특허출원 No. 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. 특허출원 No. 11/776,052 (Jul. 11, 2007); 및 Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, U.S. 특허출원 No. 11/776,075 (Jul. 11, 2007), 이들 각각은 그 전체가 참고로 통합된다.

[0111] 본 발명의 양태는, 부분적으로, SNAP-25을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "SNAP-25"란 재표적화된 엔도펩티다아제에 의해 우선적으로 절단된 천연 SNAP-25 또는 비천연 SNAP-25를 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "우선적으로 절단된"이란, 재표적화된 엔도펩티다아제의 절단율이 재표적화된 엔도펩티다아제에 의한 임의의 다른 기질의 절단율보다 적어도 1 제곱 이상이라는 것을 의미한다. 이 구체예의 양태에서, 재표적화된 엔도펩티다아제에 의한 SNAP-25의 절단율은 엔도펩티다아제에 의한 임의의 다른 기질의 절단율보다 적어도 10의 제곱 초과, 적어도 10의 삼제곱 초과, 적어도 10의 사제곱 초과, 또는 적어도 10의 오제곱 초과이다.

[0112] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "천연 SNAP-25"란 후번역 변형, 선택적으로 접합된 전사체, 또는 자연 돌연변이로부터 생성된 SNAP-25 아이소폼, 및 SNAP-25 서브타입을 비제한적으로 포함하는 천연 과정에 의해 생성된 임의의 SNAP-25를 의미한다. 천연 SNAP-25은 비제한적으로 하기를 포함한다: 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24, 또는 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24로부터의 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 부가하는 것.

[0113] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "비천연 SNAP-25"란 임의의 SNAP-25를 의미하고, 그의 구조는 무작위 돌연변이 생성 또는 합리적 설계를 사용하는 유전자 조작에 의해 생성된 SNAP-25 및 실험실내 화학 합성에 의해 생성된 SNAP-25을 비제한적으로 포함하는 인간 조작의 도움으로 변형되었다. 비천연 SNAP-25의 비제한적인 예는 예를 들어 하기에 기재되어 있다: Steward, L.E. et al., *FRET Protease Assays for Clostridial Toxins*, U.S. 특허 7,332,567; Fernandez-Salas et al., *Lipophilic Dye-based FRET Assays for Clostridial Toxin Activity*, U.S. 특허 공보 2008/0160561, 이들 각각은 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다. 비천연 SNAP-25는 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24로부터의 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 부가할 수 있다.

[0114] 따라서, 구체예에서, SNAP-25는 천연 SNAP-25이다. 이 구체예의 양태에서, SNAP-25는 SNAP-25 아이소폼 또는 SNAP-25 서브타입이다. 이 구체예의 양태에서, 천연 SNAP-25는 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15,

서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24의 천연 SNAP-25이다. 이 구체예의 다른 양태에서, SNAP-25는 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24와, 예를 들어, 적어도 70%의 아미노산 동일성, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 천연 SNAP-25이다.

[0115] 또 하나의 구체예에서, SNAP-25는 비천연 SNAP-25이다. 이 구체예의 다른 양태에서, SNAP-25는 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 또는 서열번호: 4와, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 비천연 SNAP-25이다. 이 구체예의 다른 양태에서, SNAP-25는 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24에 관해서 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 비-인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 비천연 SNAP-25이다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, SNAP-25는 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24에 관해서 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 비천연 SNAP-25이다.

[0116] SNAP-25은 내생성 SNAP-25 또는 외생성 SNAP-25일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "내생성 SNAP-25"가 세포 내에 자연히 존재하는 SNAP-25를 의미하는 것은, 세포 계놈 내에서 자연히 인코딩되기 때문이고, 이로써, 세포는 SNAP-25의 외부 공급원, 또는 SNAP-25을 인코딩하는 유전 물질의 외부 공급원의 필요없이 SNAP-25를 고유하게 발현시킨다. 내생성 SNAP-25의 발현은 예를 들어, 세포 분화와 같은 환경적 자극이 있거나 없을 수 있다. 당연히, 내생성 SNAP-25은 단지 천연 SNAP-25 또는 이의 변이체일 수 있다. 예를 들어, 다음의 확립된 세포주들은 내생성 SNAP-25: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa, SK-N-DZ, 및 SK-N-BE(2)-C를 발현시킨다.

[0117] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "외생성 SNAP-25"란 SNAP-25의 외부 공급원, 또는 인간 조작에 의해 SNAP-25을 인코딩하는 유전 물질의 외부 공급원의 도입을 통해 세포 내에서 발현되는 SNAP-25을 의미한다. 외생성 SNAP-25의 발현은 환경적 자극 예컨대, 예를 들어, 세포 분화가 있거나 없을 수 있다. 비제한적인 예로서, 확립된 세포주로부터의 세포는 SNAP-2의 일시적 또는 안정한 형질전환에 의해 외생성 SNAP-25를 발현시킬 수 있다. 또 하나의 비제한적인 예로서, 확립된 세포주로부터의 세포는 SNAP-25의 단백질 형질전환에 의해 외생성 SNAP-25를 발현시킬 수 있다. 외생성 SNAP-25은 천연 SNAP-25 또는 이의 변이체, 또는 비천연 SNAP-25 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0118] 따라서, 구체예에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 내생성 SNAP-25를 발현시킨다. 이 구체예의 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포에 의해 발현된 내생성 SNAP-25는 천연 SNAP-25이다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포에 의해 발현된 내생성 SNAP-25는 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24이다. 이 구체예의 추가 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포에 의해 발현된 내생성 SNAP-25는 천연 SNAP-25, 예컨대, 예를 들어, SNAP-25 아이소폼 또는 SNAP-25 서브타입이다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포에 의해 발현된 내생성 SNAP-25는 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24와 예를 들어, 적어도 70%의 아미노산 동일성, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 천연 SNAP-25이다.

[0119] 또 하나의 구체예에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 외생성 SNAP-25을 발현시킨다. 이 구체예의 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 천연

SNAP-25를 발현시킨다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24의 천연 SNAP-25를 발현시킨다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 천연 SNAP-25, 예컨대, 예를 들어, SNAP-25 아이소폼 또는 SNAP-25 서브타입을 발현시킨다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24와 예를 들어, 적어도 70%의 아미노산 동일성, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 천연 SNAP-25를 발현시킨다.

[0120]

구체예의 또 하나의 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 비천연 SNAP-25를 발현시킨다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24와 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 비천연 SNAP-25를 발현시킨다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24에 대해 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 비-인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 비천연 SNAP-25를 발현시킨다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 서열번호: 10, 서열번호: 11, 서열번호: 12, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 서열번호: 17, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 20, 서열번호: 21, 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24에 대해 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 비천연 SNAP-25를 발현시킨다.

[0121]

재표적화된 엔도펩티다제에 노출된 후 SNAP-25의 절단을 검출하는 검정을 이용하여 세포가 내생적 또는 외생적 SNAP-25를 발현하는지를 평가할 수 있다. 이러한 검정에서, 재표적화된 엔도펩티다제 치료 후, SNAP-25를 발현하는 세포에서 SNAP-25 절단-산물의 생성을 탐지할 것이다. 특이적 Western 블랏 검정의 비제한적인 예, 그리고 잘-특징화된 시약들, 조건 및 프로토콜은 *Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, and Stratagene, Inc., La Jolla, CA*을 포함하나 이에 한정되지 않는 상업자로부터 바로 이용가능하다. SNAP-25 절단에 대한 이러한 검정 및 유사한 검정들은 내생적 또는 외생적 SNAP-25를 발현하는 세포를 확인하는데 유용할 것이다.

[0122]

비제한적 예로서, SNAP-25 절단 생성물을 인지하는 또는 절단된 그리고 절단안된 SNAP-25 형 모두를 인지하는 항체를 이용한 Western 블랏 검정을 이용하여 재표적화된 엔도펩티다제의 흡수에 대해 검정할 수 있다. 이러한 검정에 유용한  $\alpha$ -SNAP-25 항체의 예는  $\alpha$ -SNAP-25 마우스 단클론성 항체 SMI-81(Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), 마우스  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체 CI 71.1(Synaptic Systems, Goettingen, Germany),  $\alpha$ -SNAP-25 마우스 단클론성 항체 CI 71.2(Synaptic Systems, Goettingen, Germany),  $\alpha$ -SNAP-25 마우스 단클론성 항체 SP12(Abcam, Cambridge, MA),  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 다클론성 항혈청(Synaptic Systems, Goettingen, Germany),  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 다클론성 항혈청(Abcam, Cambridge, MA), 및  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 다클론성 항혈청 S9684 (Sigma, St Louis, MO)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0123]

본 명세서의 양태는, 부분적으로, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "재표적화된 엔도펩티다제 수용체"는 재표적화된 엔도펩티다제 활성 반응을 유도하는 방식으로 선호적으로 재표적화된 엔도펩티다제와 상호작용하는 자연적으로 생성되는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 또는 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 말한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "선호적으로 상호 작용하는"은 재표

적화된 엔도펩티다제 수용체에 대한 재표적화된 엔도펩티다제의 평형 해리 상수(KD)가 세포 표면에서 임의의 기타 수용체에 대한 재표적화된 엔도펩티다제의 것보다 최소한  $10^1$  미만이다. 재표적화된 엔도펩티다제-재표적화된 엔도펩티다제 수용체의 복합체를 이들 성분 분자들, 즉, 재표적화된 엔도펩티다제와 재표적화된 엔도펩티다제 수용체로 가역적으로 분리(해리)시키는 경향을 측정하는 특정 유형의 평형 상수인 평형 해리 상수는 평형에서  $KD=Ka/Kd$ 이다. 연합 상수 ( $K_a$ )는  $K_a=[C]/[L][R]$ 로 정의하고, 해리 상수 ( $K_d$ )는  $K_d=[L][R]/[C]$ 로 정의하며, 여기서  $[L]$ 은 재표적화된 엔도펩티다제의 몰 농도와 같고,  $[R]$ 은 재표적화된 엔도펩티다제 수용체의 몰 농도이며, 그리고  $[C]$ 는 엔도펩티다제-수용체 복합체의 몰 농도이며, 그리고 여기서 모든 농도는 시스템이 평형일 때 각 성분의 농도다. 해리 상수가 작을수록 재표적화된 엔도펩티다제가 이의 수용체에 더 단단하게 결합하거나, 또는 재표적화된 엔도펩티다제와 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 사이에 결합 친화도가 더 높다. 이 구체예의 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제가 이의 수용체로부터의 해리 상수는 임의의 기타 수용체에 대한 재표적화된 엔도펩티다제의 것보다 최소한  $10^2$ , 최소한  $10^3$ , 최소한  $10^4$ , 또는 최소한  $10^5$  미만이다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제가 이의 수용체에 선호적으로 상호작용하는 결합 친화도는 예컨대, 500 nM 이하, 400 nM 이하, 300 nM 이하, 200 nM 이하 또는 100 nM 이하의 평형 해리 상수 (KD)를 가질 수 있다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제가 이의 수용체에 선호적으로 상호작용하는 결합 친화도는 예컨대, 90 nM 이하, 80 nM 이하, 70 nM 이하, 60 nM, 50 nM 이하, 40 nM 이하, 30 nM 이하, 20 nM 이하 또는 10 nM 이하의 평형 해리 상수 (KD)를 가질 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "재표적화된 엔도펩티다제 활성 반응을 유도하는"은 재표적화된 엔도펩티다제 수용체가 재표적화된 엔도펩티다제와 상호작용하여 엔도펩티다제/수용체 복합체를 형성하고, 이러한 복합체를 세포의 세포질안으로 내재화시키는 능력을 말한다.

[0124]

여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체"는 해독후 변경에 의해 생성된 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 이소폼(isoforms), 선택적으로 스플라이스된 전사체, 또는 자발적 돌연변이, 및 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 아류형을 포함하나 이에 한정되지 않는, 자연적으로 생성되는 프로세스에 의해 만들어진 임의의 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 말한다. Christopher Evans et al., *Opioid Receptor Genes*, 미국 특허 제6,265,563호; Christopher Evans et al., *Method of Screening Modulators of Opiod Receptor Activity*, 미국 특허 제6,432,652호; Christopher Evans et al., *Opoiod Receptors and Method of Use*, 미국 특허 제7,282,563호; 그리고 Christopher Evans et al., *Delta Opioid Receptor Proteins*, 미국 특허공개 2008/0219925(이들 각 문현들은 전문이 참고문헌에 통합된다)에서 설명된 것과 같이, 천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 오피에이트 유사 수용체 1 (ORL1),  $\delta$ -오피오이드 수용체 (DOR),  $\kappa$ -오피오이드 수용체 (KOR), 및  $\mu$ -오피오이드 수용체 (MOR)와 같은 천연 오피오이드 수용체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체의 다른 예는 갈라닌 수용체 1, 갈라닌 수용체 2, 그리고 갈라닌 수용체 3을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예컨대, 영장류, 소, 개, 마우스, 쥐, 닭, 물고기와 같은 다른 척추동물 종의 천연 오피오이드 수용체는 당업계에 공지되어 있고, 본 명세서의 양태에 이용될 수 있다.

[0125]

천연 ORL1은 비제한적으로 하기를 포함한다: 서열번호: 25 및 서열번호: 26, 또는 서열번호: 25 또는 서열번호: 26로부터 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 부가하는 것. 천연 DOR은 비제한적으로 하기를 포함한다: 서열번호: 27 및 서열번호: 28, 또는 서열번호: 27 또는 서열번호: 28로부터 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 부가하는 것. 천연 KOR은 비제한적으로 하기를 포함한다: 서열번호: 29 및 서열번호: 30, 또는 서열번호: 29 또는 서열번호: 30으로부터 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 부가하는 것. 천연 MOR은 비제한적으로 하기를 포함한다: 서열번호: 31, 또는 서열번호: 31로부터 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 부가하는 것.

[0126]

천연 갈라닌 수용체 1은 비제한적으로 하기를 포함한다: 서열번호: 136, 서열번호: 137, 및 서열번호: 138, 또는 서열번호: 136, 서열번호: 137, 또는 서열번호: 138로부터 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 부가하는 것. 천연 갈라닌 수용체 2은 비제한적으로 하기를 포함한다: 서열번호: 139, 또는 서열번호: 139로부터 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 부가하는 것.

부가하는 것. 천연 갈라닌 수용체 3은 비제한적으로 하기를 포함한다: 서열번호: 140, 또는 서열번호: 140으로부터 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 부가하는 것.

[0127] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 변이체"는 인간의 조작 또는 기획에 의해 생성된 임의의 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 말하는데, 랜덤 돌연변이 생성 또는 합리적 기획을 이용하여 유전공학에 의해 생성된 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 또는 화학적 합성에 의해 만들어진 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 변이체의 비제한적 예는 예컨대, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체의 보존적 변이체, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체의 비-보존적 변이체, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체의 키메라 변이체 그리고 재표적화된 엔도펩티다제 수용체의 활성 단편을 포함한다.

[0128] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체"는 임의의 재표적화된 엔도펩티다제 수용체의 구조가 인간의 조작에 의해 변형된 것을 말하는데, 랜덤 돌연변이 생성 또는 합리적 기획을 이용하여 유전공학적으로 조작에 의해 만들어진 재표적화된 엔도펩티다제 수용체와 시험관내 화학적 합성에 의해 만들어진 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140에서 예컨대, 1 개 이상, 2 개 이상, 3 개 이상, 4 개 이상, 5 개 이상, 6 개 이상, 7 개 이상, 8 개 이상, 9 개 이상, 10 개 이상, 20 개 이상, 30 개 이상, 40 개 이상, 50 개 이상, 또는 100 개 이상의 아미노산이 치환, 결손 또는 추가될 수 있다.

[0129] 따라서, 구체예에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 예컨대, 예를 들어, ORL1, DOR, KOR, 또는 MOR이다. 이 구체예의 양태에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 아이소폼 또는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 서브타입이다. 이 구체예의 양태에서, 천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 또는 서열번호: 31의 천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체이다. 이 구체예의 다른 양태에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 또는 서열번호: 31과 예를 들어, 적어도 70%의 아미노산 동일성, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체이다.

[0130] 또 하나의 구체예에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체, 예컨대, 예를 들어, 유전자 조작의 ORL1, 유전자 조작의 DOR, 유전자 조작의 KOR, 또는 유전자 조작의 MOR이다. 이 구체예의 다른 양태에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 또는 서열번호: 31과 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체이다. 이 구체예의 다른 양태에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 또는 서열번호: 31에 관해서 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 비-인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체이다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 또는 서열번호: 31에 관해서 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체이다.

[0131] 또 다른 구체예에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 예컨대, 갈라닌 수용체 1, 갈라닌 수용체 2, 또는 갈라닌 수용체 3와 같은 천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체다. 이 구체예의 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 이소폼 또는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 아류형이다. 이 구체예의 양태들에서, 천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140의 천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 예컨대, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140과 최소한 70% 아미노산 동일성, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 또는 최소한

95% 아미노산 동일성을 가지는 천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체다.

[0132] 또 다른 구체예에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체, 예컨대, 유전적으로 조작된 갈라닌 수용체 1, 유전적으로 조작된 갈라닌 수용체 2, 또는 유전적으로 조작된 갈라닌 수용체 3이다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140과 예컨대, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 또는 최소한 95% 아미노산 동일성을 가지는 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140에 대해 예컨대, 1 개 이상, 2 개 이상, 3 개 이상, 4 개 이상, 5 개 이상, 6 개 이상, 7 개 이상, 8 개 이상, 9 개 이상, 10 개 이상, 20 개 이상, 30 개 이상, 40 개 이상, 50 개 이상, 또는 100 개 이상 비-연속된 아미노산이 치환, 결손, 또는 추가를 가지는 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140에 대해 예컨대, 1 개 이상, 2 개 이상, 3 개 이상, 4 개 이상, 5 개 이상, 6 개 이상, 7 개 이상, 8 개 이상, 9 개 이상, 10 개 이상, 20 개 이상, 30 개 이상, 40 개 이상, 50 개 이상, 또는 100 개 이상 연속된 아미노산의 치환, 결손, 또는 추가를 보유한 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체다.

[0133] 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 내생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 또는 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체일 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "내생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체"는 수용체가 세포내 계놈에 의해 자연적으로 인코드되어, 외부 원천의 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 또는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 인코드하는 외부 원천의 도움없이, 세포가 본래부터 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현시켜, 세포내에 자연적으로 존재하는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 말한다. 내생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 예컨대, 세포 분화 또는 프로모터 활성화와 같은 환경적 자극에 의해 또는 이러한 자극없이 발현될 수 있다. 예를 들면, 다음의 확립된 세포주는 최소한 하나의 내생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현한다: AGN P33, Neuro-2a, SiMa, 및 SK-N-DZ. 내생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 오로지 자연적으로 생성되는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 또는 자연적으로 생성되는 이의 변이체일 수 있다.

[0134] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체"는 외부 원천의 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 또는 인간의 조작에 의해 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 인코드하는 외부 원천의 도입을 통하여 세포안에서 발현되는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 말한다. 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 예컨대, 세포 분화 또는 프로모터 활성화와 같은 환경적 자극에 의해 또는 이러한 자극없이 발현될 수 있다. 비제한적 예로서, 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체, 예컨대, ORL1, DOR, KOR, MOR, 갈라닌 수용체 1, 갈라닌 수용체 2, 또는 갈라닌 수용체 3을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자의 일시적인 또는 안정적인 형질감염에 의해 하나 이상의 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현할 수 있다. 또 다른 비제한적 예로서, 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체, 예컨대, ORL1, DOR, KOR, MOR, 갈라닌 수용체 1, 갈라닌 수용체 2, 또는 갈라닌 수용체 3의 단백질 형질감염에 의해 하나 이상의 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현시킬 수 있다. 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체는 자연적으로 생성되는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 또는 이의 천연 변이체, 또는 비천연 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 또는 이의 비천연 변이체일 수 있다.

[0135] 따라서, 구체예에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 내생성 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체를 발현시킨다. 이 구체예의 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포에 의해 발현된 내생성 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체는 천연 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체이다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포에 의해 발현된 내생성 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체는 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140이다. 이 구체예의 추가 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포에 의해 발현된 내생성 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체는 천연 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체, 예를 들어, 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체 아이소폼 또는 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체 서브타입이다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포에 의해 발현된 내생성 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체는 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140과 예를 들어, 적어도 70%의 아미노산 동일성, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 천연 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체이다.

[0136]

또 하나의 구체예에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 외생성 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체를 발현시킨다. 이 구체예의 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 천연 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체를 발현시킨다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140의 천연 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체를 발현시킨다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 천연 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체, 예컨대, 예를 들어, 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체 아이소폼 또는 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체 서브타입을 발현시킨다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140과 예를 들어, 적어도 70%의 아미노산 동일성, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 천연 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체를 발현시킨다.

[0137]

구체예의 또 하나의 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 비천연 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체를 발현시킨다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140과, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖는 비천연 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체를 발현시킨다. 이 구체예의 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 32, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140에 관해서 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 비-인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 비천연 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체를 발현시킨다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 일시적으로 또는 안정하게 조작되어 서열번호: 25, 서열번호: 26, 서열번호: 27, 서열번호: 28, 서열번호: 29, 서열번호: 30, 서열번호: 31, 서열번호: 32, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140에 관해서 예를 들어, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100개 이상의 인접 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 비천연 재표적화된 엔도펩티다아제 수용체를 발현시킨다.

[0138]

또 다른 구체예에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 외생적 ORL1, 외생적 DOR, 외생적 KOR, 외생적 MOR, 또는 이의 임의의 조합을 발현하도록 일시적으로 또는 안정적으로 조작한다. 이 구체예의 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 자연적으로 생성되는 ORL1, 자연적으로 생성되는 DOR, 자연적으로 생성되는 KOR, 자연적으로 생성되는 MOR, 또는 이의 임의의 조합을 발현하도록 일시적으로 또는 안정적으로 조작한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 비-자연적으로 생성되는 ORL1, 비-자연적으로 생성되는 DOR, 비-자연적으로 생성되는 KOR, 비-자연적으로 생성되는 MOR, 또는 이의 임의의 조합을 발현하도록 일시적으로 또는 안정적으로 조작한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 자연적으로 생성되는 ORL1 또는 비-자연적으로 생성되는 ORL1, 자연적으로 생성되는 DOR 또는 비-자연적으로 생성되는 DOR, 자연적으로 생성되는 KOR 또는 비-자연적으로 생성되는 KOR, 자연적으로 생성되는 MOR 또는 비-자연적으로 생성되는 MOR, 또는 이의 임의의 조합을 발현하도록 일시적으로 또는 안정적으로 조작한다.

[0139]

다른 구체예에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 외생적 갈라닌 수용체 1, 외생적 갈라닌 수용체 2, 외생적 갈라닌 수용체 3, 또는 이의 임의의 조합을 발현하도록 일시적으로 또는 안정적으로 조작한다. 이 구체예의 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 1, 자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 2, 자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 3, 또는 이의 임의의 조합을 발현하도록 일시적으로 또는 안정적으로 조작한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 비-자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 1, 비-자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 2, 비-자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 3, 또는 이의 임의의 조합을 발현하도록 일시적으로 또는 안정적으로 조작한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 확립된 세포주로부터의 세포는 자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 1 또는 비-자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 1, 자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 2 또는 비-자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 2, 자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 3 또는 비-자연적으로 생성되는 갈라닌 수용체 3, 또는 이의 임의의 조합을 발현하도록 일시적으로 또는 안정적으

로 조작한다.

[0140]

하나 이상의 내생적 또는 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하는 세포는 재표적화된 엔도펩티다제 흡수에 대한 직간접 검정을 포함하는 일상적인 방법에 의해 확인할 수 있다. 재표적화된 엔도펩티다제 결합 또는 흡수 성질들을 결정하는 검정을 이용하여 세포가 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하는지를 평가할 수 있다. 이러한 검정은 라벨된 재표적화된 엔도펩티다제, 예컨대, [<sup>125</sup>I] 재표적화된 엔도펩티다제를 이용한 교차 결합 검정을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예컨대, Noriko Yokosawa et al., *Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines*, 57(1) *Infect. Immun.* 272-277 (1989); Noriko Yokosawa et al., *Binding of botulinum type C1, D and E neurotoxin to neuronal cell lines and synaptosomes*, 29(2) *Toxicon* 261-264 (1991); and 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) 참고. 기타 비제한적 검정은 라벨된 또는 라벨안된 항체를 이용하여 재표적화된 엔도펩티다제 결합을 검출하는 면역세포화학 검정(예컨대, Atsushi Nishikawa et al., *The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor neurotoxin into HT-29 cells*, 319(2) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327-333 (2004) 참고) 및 라벨된 또는 라벨안된 항체를 이용하여 결합된 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 검출하는 면역침강 검정(예컨대, 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), 참고)을 포함한다. 이러한 검정들에 유용한 항체는 재표적화된 엔도펩티다제에 대항하여 선택된 항체 및/또는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체, 예컨대, ORL1, DOR, KOR, MOR, 갈라닌 수용체 1, 갈라닌 수용체 2, 또는 갈라닌 수용체 3에 대항하여 선택된 항체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 항체가 라벨된 경우, 분자의 결합은 당업계에 공지되어 있는 기술을 이용하여 Western blotting 검정, 현미경을 통한 항체의 세포내 위치를 직접 관찰, 세척후 세포 또는 기질-결합된 항체의 측정, 유세포검정, 전기영동 또는 모세관 전기영동을 포함하는 다양한 수단을 통하여 검출할 수 있다. 항체가 라벨안된 경우, 결합된 분자의 간접 검출을 위한 라벨된 제2 항체를 이용할 수 있고, 검출은 라벨된 항체와 같은 과정으로 진행할 수 있다. 재표적화된 엔도펩티다제 흡수 성질들 또는 특징들을 결정하는 이러한 그리고 유사한 검정들은 내생적 또는 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하는 세포를 확인하는데 유용할 것이다.

[0141]

재표적화된 엔도펩티다제에 노출된 후 분자의 방출을 모니터하는 검정을 이용하여 세포가 하나 이상의 내생적 또는 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하는지를 평가할 수도 있다. 이러한 검정에서, 재표적화된 엔도펩티다제 치료 후, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하는 세포에서 분자의 방출 억제가 일어날 것이다. 잘 공지된 검정은 뉴런으로부터 방사능-라벨된 카테콜아민 방출, 예컨대, [<sup>3</sup>H] 노르아드레날린 또는 [<sup>3</sup>H] 도파민 방출의 억제를 측정하는 방법(예컨대, 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) 참고), 또는 형광 과정을 이용하여 카테콜아민 방출을 측정하는 방법(예컨대, 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); and 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) 참고)을 포함한다. 기타 비제한적 예는 내분비 세포, 예컨대, 뇌하수체 전엽 세포 또는 난소 세포로부터 호르몬 방출 억제를 측정하는 검정을 포함한다. 분자 방출에 대한 이러한 검정 및 유사한 검정이 내생적 또는 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현시키는 세포를 확인하는데 유용할 것이다.

[0142]

재표적화된 엔도펩티다제에 노출된 후 SNAP-25 기질의 절단을 검출하는 검정 또한 세포가 하나 이상의 내생적 또는 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하는지를 평가하는데 이용할 수 있다. 이러한 검정에서, 재표적화된 엔도펩티다제 치료후 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하는 세포에서 SNAP-25 절단-산물의

생성, 또는 고유 SNAP-25의 사라짐이 검출될 것이다. 특이적 Western 블랏 검정의 비제한적인 예, 그리고 잘-특정화된 시약들, 조건 및 프로토콜은 Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, and Stratagene, Inc., La Jolla, CA을 포함하나 이에 한정되지 않는 상업자로부터 바로 이용가능하다. SNAP-25 절단에 대한 이러한 그리고 유사한 검정이 내생적 또는 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하는 세포를 확인하는데 유용할 것이다.

[0143] 비제한적 예로서, SNAP-25-절단된 생성물 또는 절단된 그리고 절단안된 SNAP-25의 형태를 모두 인지하는 항체를 이용한 Western 블랏 검정을 이용하여 재표적화된 엔도펩티다제의 흡수에 대해 검정할 수 있다. 이러한 검정에 유용한  $\alpha$ -SNAP-25 항체의 예는 SMI-81  $\alpha$ -SNAP-25 마우스 단클론성 항체 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), CI 71.1 마우스  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), CI 71.2  $\alpha$ -SNAP-25 마우스 단클론성 항체 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), SP12  $\alpha$ -SNAP-25 마우스 단클론성 항체 (Abcam, Cambridge, MA),  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 다클론성 항혈청 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany),  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 다클론성 항혈청 S9684 (Sigma, St. Louis, MO), 및  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 다클론성 항혈청 (Abcam, Cambridge, MA)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0144] 본 명세서의 양태는 유전적 조작 또는 재조합 조작을 통하여 외생적 SNAP-25 및/또는 하나 이상의 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하도록 만들어진 세포를 제공한다. 유전적 조작 또는 재조합 조작을 통하여, 외생적 SNAP-25 및/또는 하나 이상의 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현시키는데 유용한 세포는 내생적 SNAP-25 및/또는 하나 이상의 내생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하거나 발현하지 않는 뉴런 세포 및 비-뉴런 세포를 포함한다. 이러한 유전적으로 조작된 또는 재조합에 의해 조작된 세포는 구성적, 조직-특이적, 세포-특이적 또는 유도성 프로모터 요소, 인핸서 요소 또는 이들 모두의 조절하에 외생적 SNAP-25 및 하나 이상의 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현할 수 있을 것이다. 세포가 외생적 SNAP-25 및/또는 하나 이상의 외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작되거나 또는 재조합적으로 조작될 수 있고, 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 받을 수 있다면, 임의의 세포라도 유용하다.

[0145] 세포가 전반적인 세포 기전을 겪고, 이에 의해 재표적화된 엔도펩티다제가 SNAP-25 기질, 예컨대, SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, 또는 MOR을 단백질 가수분해적으로 절단하는데 필요한 성분을 인코드하는 외생적 폴리뉴클레오티드 분자를 세포내로 도입시키는데 유용한 방법은 화학물질-중재된 전달 방법, 예컨대, 인산칼슘염-중재된, 디에틸-아미노에틸 (DEAE) 텍스트란-중재된, 지질-중재된, 폴리에틸렌이민(PEI)-중재된, 폴리리신-중재된 그리고 폴리브랜-중재된 전달; 물리적-중재된 전달 방법, 예컨대, 유전자총(biolistic) 입자 전달, 현미주사 (microinjection), 원형질 융합 및 전기천공; 그리고 바이러스-중재된 전달 방법, 예컨대, 레트로바이러스-중재된 형질감염을 포함하나 이에 한정되지 않는다(예컨대, *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); and *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, pp 9.16.4-9.16.11 (2000) 참고, 이들 각 문헌은 전문이 참고문헌에 통합된다). 세포 안으로 폴리뉴클레오티드 분자를 도입하기 위한 특이적 방법의 선택은 세포가 전체적인 세포 기전을 겪게 되고, 이에 의해 재표적화된 엔도펩티다제가 SNAP-25 기질을 단백질 가수분해적으로 절단하는데 필요한 성분을 일시적으로 또는 안정적으로 포함하는지에 따라 부분적으로 달라진다는 것을 당업계 숙련자는 인지 할 것이다. 세포가 전체적인 세포 기전을 겪게 되고, 이에 의해 재표적화된 엔도펩티다제가 SNAP-25 기질을 단백질 가수분해적으로 절단하는데 필요한 성분을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자의 비제한적 예는 다음과 같다: 서열번호: 61 또는 서열번호: 62의 ORL1 폴리뉴클레오티드 분자; 서열번호: 63 또는 서열번호: 64의 DOR 폴리뉴클레오티드 분자; 서열번호: 65 또는 서열번호: 66의 KOR 폴리뉴클레오티드 분자; 서열번호: 67의 MOR 폴리뉴클레오티드 분자; 서열번호: 141, 서열번호: 142, 또는 서열번호: 143의 갈라닌 수용체 1 폴리뉴클레오티드 분자, 서열번호: 144의 갈라닌 수용체 2 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 서열번호: 145의 갈라닌 수용체 3 폴리뉴클레오티드 분자, 그리고 서열번호: 68, 또는 서열번호: 69의 SNAP-25 폴리뉴클레오티드 분자.

[0146] 화학 매개된 전달 방법은 당업자에 공지되어 있고, 예를 들어 하기에 기재되어 있다: 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), 이를 각각은 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다. 그와 같은 화학 매개된 전달 방

법은 표준 절차에 의해 제조될 수 있고, 상업적으로 이용가능하다. 참고, 예를 들어, CellPfect Transfection Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); Mammalian Transfection Kit, Calcium phosphate 및 DEAE Dextran, (Stratagene, Inc., La Jolla, CA); Lipofectamine<sup>TM</sup> Transfection Reagent (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); ExGen 500 Transfection kit (Fermentas, Inc., Hanover, MD), 및 SuperFect and Effectene Transfection Kits (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

[0147] 물리 매개된 전달 방법은 당업자에 공지되어 있고, 예를 들어 하기에 기재되어 있다: 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 Doliostic 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); 및 Oliver Greschet al., *New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells*, 33(2) Methods 151-163 (2004), 이들 각각은 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다.

[0148] 바이러스 매개된 전달 방법은 당업자에 공지되어 있고, 예를 들어 하기에 기재되어 있다: 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*, U.S. 특허 No. 5,464,758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, *Methods for Regulating Gene Expression*, U.S. 특허 No. 5,814,618; David S. Hogness, *Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same*, U.S. 특허 No. 5,514,578; David S. Hogness, *Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor*, U.S. 특허 6,245,531; Elisabetta Vegeto et al., *Progesterone Receptor Having C. Terminal Hormone Binding Domain Truncations*, U.S. 특허 No. 5,364,791; Elisabetta Vegeto et al., *Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy*, U.S. 특허 No. 5,874,534, 이들 각각은 그 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다. 그와 같은 바이러스 매개된 전달 방법은 표준 절차에 의해 제조될 수 있고, 상업적으로 이용가능하다: 참고, 예를 들어, ViraPower<sup>TM</sup> Adenoviral Expression System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) and ViraPower<sup>TM</sup> Adenoviral Expression System Instruction Manual 25-0543 version A, Invitrogen, Inc., (Jul. 15, 2002); and AdEasy<sup>TM</sup> Adenoviral Vector System (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) and AdEasy<sup>TM</sup> Adenoviral Vector System Instruction Manual 064004f, Stratagene, Inc. 더욱이, 그와 같은 바이러스 전달 시스템은 표준 방법으로 제조될 수 있고, 상업적으로 이용가능하다: 참고, 예를 들어, BD<sup>TM</sup> Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems (BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA) and BD<sup>TM</sup> Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems User Manual, PT3001-1, BD Biosciences Clontech, (Mar. 14, 2003), GeneSwitch<sup>TM</sup> System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) and GeneSwitch<sup>TM</sup> System A Mifepristone-Regulated Expression System for Mammalian Cells version D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (Nov. 4, 2002); ViraPower<sup>TM</sup> Lentiviral Expression System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) and ViraPower<sup>TM</sup> Lentiviral Expression System Instruction Manual 25-0501 version E, Invitrogen, Inc., (Dec. 8, 2003); and Complete Control<sup>®</sup> Retroviral Inducible Mammalian Expression System (Stratagene, La Jolla, CA) and Complete Control<sup>®</sup> Retroviral Inducible Mammalian Expression System Instruction Manual, 064005e.

[0149] 따라서, 한 구체예에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 세포가 전체적인 세포 기전을 겪게 되고, 이에 의해 재표적화된 엔도펩티다제가 SNAP-25 기질을 단백질 가수분해적으로 절단하는데 필요한 성분을 일시적으로 포함한다. 또 다른 구체예에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립

된 세포주로부터의 세포는 세포가 전체적인 세포 기전을 겪게 되고, 이에 의해 재표적화된 엔도펩티다제가 SNAP-25 기질을 단백질 가수분해적으로 절단하는데 필요한 다수의 성분을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자를 일시적으로 포함한다. 이 구체예의 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 ORL1, DOR, KOR, MOR, 또는 SNAP-25를 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자를 일시적으로 포함한다. 이 구체예의 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 ORL1을 인코드하는 서열번호: 61, 또는 서열번호: 62의 폴리뉴클레오티드 분자를 일시적으로 포함한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 DOR을 인코드하는 서열번호: 63, 또는 서열번호: 64의 폴리뉴클레오티드 분자를 일시적으로 포함한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 KOR을 인코드하는 서열번호: 65, 또는 서열번호: 66의 폴리뉴클레오티드 분자를 일시적으로 포함한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 MOR을 인코드하는 서열번호: 67의 폴리뉴클레오티드 분자를 일시적으로 포함한다.

[0150] 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 갈라닌 수용체 1을 인코드하는 서열번호: 141, 서열번호: 142, 또는 서열번호: 143의 폴리뉴클레오티드 분자를 일시적으로 포함한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 갈라닌 수용체 2를 인코드하는 서열번호: 144의 폴리뉴클레오티드 분자를 일시적으로 포함한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 갈라닌 수용체 3을 인코드하는 서열번호: 145의 폴리뉴클레오티드 분자를 일시적으로 포함한다. 이 구체예의 추가 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 SNAP-25를 인코드하는 서열번호: 68 또는 서열번호: 69의 폴리뉴클레오티드 분자를 일시적으로 포함한다.

[0151] 또 다른 구체예에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 세포가 전체적인 세포 기전을 겪게 되고, 이에 의해 재표적화된 엔도펩티다제가 SNAP-25 기질을 단백질 가수분해적으로 절단하는데 필요한 성분을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자를 안정적으로 포함한다. 또 다른 구체예에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 세포가 전체적인 세포 기전을 겪게 되고, 이에 의해 재표적화된 엔도펩티다제가 SNAP-25 기질을 단백질 가수분해적으로 절단하는데 필요한 다수의 성분들을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자를 안정적으로 포함한다. 이 구체예의 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 ORL1, DOR, KOR, MOR, 또는 SNAP-25를 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자를 안정적으로 포함한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 DOR을 서열번호: 63, 또는 서열번호: 64의 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자를 안정적으로 포함한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 KOR을 인코드하는 서열번호: 65, 또는 서열번호: 66의 폴리뉴클레오티드 분자를 안정적으로 포함한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 MOR을 인코드하는 서열번호: 67의 폴리뉴클레오티드 분자를 안정적으로 포함한다.

[0152] 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 갈라닌 수용체 1을 인코드하는 서열번호: 141, 서열번호: 142, 또는 서열번호: 143의 폴리뉴클레오티드 분자를 안정적으로 포함한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 갈라닌 수용체 2를 인코드하는 서열번호: 144의 폴리뉴클레오티드 분자를 안정적으로 포함한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 갈라닌 수용체 3을 인코드하는 서열번호: 145의 폴리뉴클레오티드 분자를 안정적으로 포함한다. 이 구체예의 추가 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감한 확립된 세포주로부터의 세포는 SNAP-25를 인코드하는 서열번호: 68 또는 서열번호: 69의 폴리뉴클레오티드 분자를 안정적으로 포함한다.

[0153] 상기에서 언급된 바와 같이, 세포가 전체적인 세포 기전을 겪게 되고, 이에 의해 재표적화된 엔도펩티다제가 SNAP-25 기질, 본 명세서에서 공개하는 예컨대, SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, 갈라닌 수용체 1, 갈라닌 수용체 2, 또는 갈라닌 수용체 3을 단백질 가수분해적으로 절단하는데 필요한 외생적 성분을 세포내로 도입할 수 있다. 이러한 외생적 성분을 운반 물질과 함께 세포 집단 안으로 도입시키는 방법이 단서조항으로 본 명세서에서 공개한 외생적 성분을 주어진 세포 집단내 세포의 최소한 50%에 일시적으로 도입시킨다면, 임의의 그리고 모든 방법이 유용할 것이다. 따라서, 이 구체예의 양태들은 예컨대, 주어진 세포 집단의 최소한 50%, 최소한 60%, 최

소한 70%, 최소한 80%, 또는 최소한 90%가 전체적인 세포 기전을 세포가 겪게 되고, 이에 의해 재표적화된 엔도펩티다제가 SNAP-25 기질, 예컨대, 본 명세서에서 공개하는 예컨대, SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, 갈라닌 수용체 1, 갈라닌 수용체 2, 또는 갈라닌 수용체 3을 단백질 가수분해적으로 절단하는데 필요한 외생적 성분을 일시적으로 포함하는 세포 집단을 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "운반 물질"은 공유적으로-연결된, 비-공유적으로-연결된 또는 임의의 기타 방식으로 연합된 폴리펩티드를 세포 안으로 내재화시킬 수 있는 또는 내재화를 강화시키는 임의의 문자를 말한다. 따라서, 용어 "운반 물질"은 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결된 문자를 세포 막, 세포의 세포질 또는 핵으로 전달하는 (이에 한정되지 않는) 단백질, 펩티드, 펩티드모방체, 작은 문자들, 폴리뉴클레오티드 문자들, 리포좀, 지질, 바이러스, 레트로바이러스 그리고 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 용어 "운반 물질"은 수용체 중재된 엔도사이토시스를 통하여 기능을 하는 운반 물질과 수용체 중재된 엔도사이토시스와는 독립적인 운반 물질을 포함하는 임의의 기전에 의해 내재화된 문자들을 추가로 포함한다.

[0154]

운반 물질은 SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, 갈라닌 수용체 1, 갈라닌 수용체 2, 또는 갈라닌 수용체 3과 같은 성분에 화학적 콘쥬게이트된 또는 유전공학적으로 생산된 융합 단백질로 공유적으로 연결된 성분의 세포내 흡수를 가능하게 하거나 또는 강화시키는 물질일 수도 있다. 이러한 물질을 이용하는 방법 및 운반 물질을 공유적으로 연결시키는 방법은 예컨대, *Steven F. Dowdy, Protein Transduction System and Method of Use Thereof*, 국제공개 WO 00/34308; *Gerard Chassaing & Alain Prochiantz, Peptide which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules*, 미국 특허 제6,080,724호; *Alan Frankel et al., Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiety*, 미국 특허 제5,674,980호; *Alan Frankel et al., TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates*, 미국 특허 제5,747,641호; *Alan Frankel et al., TAT-derived Transport Polypeptide and Fusion Proteins*, 미국 특허 제5,804,604호; *Peter F. J. O'Hare et al., Use of Transport Proteins*, 미국 특허 제6,734,167호; *Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, 미국 특허 제5,807,746호; *Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into cells*, 미국 특허 제 6,043,339호; *Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Protein with Cell Membrane Translocating Activity*, 미국 특허 제6,248,558호; *Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Protein with Cell Membrane Translocating Activity*, 미국 특허 제6,432,680호; *Jack J. Hawiger et al., Method for Importing Biologically Active Molecules into Cell*, 미국 특허 제6,495,518호; *Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Protein with Cell Membrane Translocating Activity*, 미국 특허 제6,780,843호; *Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, 미국 특허 제6,306,993호; *Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, 미국 특허 제 6,495,663호; 그리고 *Pamela B. Davis et al., Fusion Proteins for Protein Delivery*, 미국 특허 제 6,287,817호에서 설명되며, 이들 각 문현은 전문이 참고문현에 통합된다.

[0155]

운반 물질은 SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, 갈라닌 수용체 1, 갈라닌 수용체 2, 또는 갈라닌 수용체 3과 같은 비-공유적으로 연합된 성분의 세포 흡수를 가능하게 하는 또는 강화시키는 물질일 수도 있다. 이러한 물질을 이용하는 방법 및 공유 링키지없이 작용하는 방법들은 예컨대, *Gilles Divita et al., Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use*, 미국 특허 제 6,841,535호; *Philip L Felgner and Olivier Zelphati, Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use*, 미국 특허공개 No. 2003/0008813; 그리고 *Michael Karas, Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids*, 미국 특허공개 2004/0209797에서 설명하고 있으며, 이들 각 문현은 전문이 참고문현에 통합된다. 이러한 펩티드 운반 물질은 표준 방법에 의해 제조하고, 이용하며, 그리고 시판되는 것들도 있는데, 예컨대 CHARIOT™ 시약 (Active Motif, Carlsbad, CA); BIO-PORTER® 시약 (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA), BIO TREK™ Protein Delivery 시약 (Stratagene, La Jolla, CA), 및 PRO-JECT™ Protein 형질감염 시약 (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL)이 있다.

[0156]

본 명세서의 양태는, 부분적으로, 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료를 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료"는 활성의 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 또는 잠재적으로 포함하는 임의의 생물체제를 말한다. 본 명세서에서 공개된 방법에 따라, 정제된, 부분적으로 정제된, 또는 정제안된 재표적화된 엔도펩티다제; 자연적 또는 비천연 서열을 가진 재조합 재표적화된 엔도펩티다제; 변경된 세포 특이성을 가진 재조합 재표적화된 엔도펩티다제; 대량의 재표적화된 엔도펩티다제; 제형화된 재표적화된 엔도펩티다제

제 생성물; 그리고 예컨대, 세균, 효모, 곤충 또는 포유류 원천의 세포 또는 비가공된, 분획된 또는 부분적으로 정제된 세포 용해물; 혈액, 혈장 또는 혈청; 가공되지 않은 식품, 부분적으로 조리된 식품, 조리된 식품, 또는 프로세스된 식품; 마실 것; 동물 사료; 토양 시료; 물 시료; 뜨 침전물; 로션; 화장품; 및 임상 제제를 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 시료들이 검정될 수 있다. 용어 "시료"는 포유동물의 조직 시료, 양, 소 및 돼지와 같은 가축의 조직 시료; 영장류의 조직 시료; 그리고 인간의 조직 시료를 포함하나 이에 한정되지 않는 조직 시료를 포함한다. 이러한 시료는 유아의 내장 시료와 같은 내장의 시료, 그리고 상처로부터 수득한 조직 시료를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 비제한적 예로서, 재표적화된 엔도펩티다제의 피코몰(picomolar) 양의 활성을 검출하는 방법은 음식 또는 음료 시료내에 재표적화된 엔도펩티다제의 존재 또는 활성을 결정하는데 유용하며; 예를 들면, 재표적화된 엔도펩티다제에 노출된 또는 하나 이상의 보툴리누스 중독 증후를 가지는 인간 또는 동물의 시료를 검정하는데 유용하며; 다량의 재표적화된 엔도펩티다제의 생산 및 정제 과정 동안 활성을 지켜보는데 유용하며; 약제학적 또는 미용 용도에 이용된 제형화된 재표적화된 엔도펩티다제 생성물을 검정하는데 유용하며; 또는  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 항체의 중화 존부에 대해 개체의 혈액 혈청을 검정하는데 유용할 것이다.

[0157]

따라서, 한 구체예에서, 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료는 임의의 양의 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료다. 이 구체예의 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료는 약 100 ng 이하, 약 10 ng 이하, 약 1 ng 이하, 약 100 pg 이하, 약 10 pg 이하, 또는 약 1 pg 이하의 재표적화된 엔도펩티다제를 포함한다. 이 구체예의 다른 양태들에서, 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료는 약 1  $\mu$ M 이하, 약 100 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다제를 포함한다.

[0158]

본 명세서의 양태는, 부분적으로, BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25를 포함하는 SNAP-25 성분들을 치료된 세포로부터 분리하는 것을 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25를 포함하는 SNAP-25 성분"은 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 세포 성분을 말한다. 세포 용해 프로토콜, 스핀-컬럼 정제 프로토콜, 면역침강, 친화도 정제, 그리고 단백질 크로마토그래피를 포함하나 이에 한정되지 않는 SNAP-25 성분을 농축(enriching) 또는 분리시키는데 적당한 방법이 유용할 것이다.

[0159]

본 명세서의 양태는, 부분적으로, 고형 상 지지물에 연결된  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 포함한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "고형-상 지지물"은 "고형 상"과 동의어이며, 그리고 본 명세서에서 공개하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 고정시키는데 이용할 수 있는 임의의 매트릭스를 말한다. 고형 상 지지물의 비제한적 예는 예컨대, 튜브; 평판; 컬럼; 핀 또는 "딥스틱(dipsticks)"; 자석 입자, 비드 또는 기타 구형 또는 섬유성 크로마토그래피 매질, 예컨대, 아가로즈, 세파로즈, 규토 및 플라스틱; 그리고 쉬트 또는 막, 예컨대, 니트로셀룰로오즈 및 폴리비닐리덴플로라이드(PVDF)를 포함한다. 고형 상 지지물은 예컨대, 유리, 탄소, 폴리스티렌, 폴리비닐클로라이드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 나일론, 디아조셀룰로오즈, 또는 전분과 같은 다양한 물질을 이용하여 만들 수 있다. 선택된 고형 상 지지물은 가용성 또는 결합안된 물질로부터 바로 분리되게 하고, 그리고 일반적으로 예컨대, 과량의 시약, 반응 부산물, 또는 용매와 같은 결합안된 물질이 고형 상 지지물-결합된 검정 성분으로부터 분리되거나 또는 제거되도록(예컨대, 세척, 여과, 원심분리 등에 의해) 하는 물리적 성질을 가질 수 있다. 고형 상 지지물을 어떻게 만들고, 이용하는 지에 대한 비제한적인 예는 예컨대, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, supra, (2001)*; 및 *Current Protocol in Molecular Biology, supra, (2004)*에 설명하고 있으며, 각 문헌은 전문이 참고문헌에 통합된다.

[0160]

본 명세서의 양태는, 부분적으로, BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 애피토프에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체와 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체가 존재하는지를 탐지하는 것을 포함한다. 임의의 검출 시스템은 신호 대 잡음 비가 배경 신호로부터 항체-항원 복합체의 신호를 통계학적으로 유의적인 수준으로 구별할 수 있다는 단서하에 여기에서 공개된 면역 기반 방법의 양태를 실행하는데 이용할 수 있다. 면역 기반 검출 시스템의 비제한적인 예는 Western 블랏팅 및 도트-블랏팅과 같은 면역블랏 검정, 면역침강 검정, 효소-연결된 면역 흡착 검정(ELISA), 및 샌드위치 ELISA를 포함한다. 영상 또는 포스포르이미징(phosphor imaging (AU))으로 방사능사진촬영, 화학발광(CL), 전자화학발광(ECL), 생물발광(BL), 형광발광, 공명에너지 전달, 평면 평광, 발색 또는 유세포검정(FC)을 이용하여 신호를 검출할 수 있다. 면역 기반 검출 시스템의 설명은 예컨대, *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)*에서 공개하고 있으며, 이들 각 문헌은 전문이 참고문헌에 통합된다.

[0161]

샌드위치 ELISA (또는 샌드위치 면역검정)은 항원의 상이한 에피토프에 결합하는 두 개 항체에 기초한 방법이다. 관심 항원에 높은 결합 특이성을 가지는 포획(capture) 항체는 고형 표면에 결합한다. 그 다음 이 항원에 검출 항체로 지정되는 제 1 항체를 추가한다. 이 검출 항체는 포획 항체와는 상이한 항원의 에피토프에 결합한다. 따라서, 이 항원은 두 개 항체 사이에 "끼여있다(샌드위치형태)". 항원에 대한 항체 결합 친화도는 면역검정 민감도의 주요 결정자다. 이러한 항원 농도의 증가는 검출 항체의 양을 증가시키고, 이는 더 높은 측정된 반응으로 연결된다. 결합 정도를 정량화하기 위하여, 예컨대, 제 2 항체에 부착된 효소와 리포터 기질과 같은 상이한 리포터 시스템을 이용할 수 있으며, 여기서 이러한 효소적 반응은 검출 신호로 판독정보를 만든다. 생성된 신호는 시료 안에 있는 표적 항원의 양에 비례한다. 결합 사건을 측정하는데 이용된 리포터 기질은 검출 방식을 결정한다. 발색 검출을 위해서 분광 광도 평판 판독기를 이용한다. 화학발광 및 전자-화학발광 기질은 신호를 더 증폭시키고, 발광 판독기에서 판독될 수 있도록 개발되었다. 이러한 리포터는 또한 형광 판독일 수도 있는데, 검정의 효소 단계를 형광단으로 대체하고, 판독 정보는 형광 판독기를 이용하여 측정한다. ECL 샌드위치 ELISA를 실시하는데 필수적인 시약 및 프로토콜은 MSD 샌드위치 ELISA-ECL 검출 플랫포폼(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)을 포함하나 이에 한정하지 않는 시판되는 것을 이용할 수 있다.

[0162]

따라서, 한 구체예에서, BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 항체와 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 것은 면역-블랏 검정, 면역침강 검정, ELISA, 또는 샌드위치 ELISA를 이용하여 실행할 수 있다. 이 구체예의 양태들에서, AU, CL, ECL, 또는 BL 면역-블랏 검정; AU, CL, ECL, BL, 또는 FC 면역침강 검정; AU, CL, ECL, BL, 또는 FC ELISA; 또는 AU, CL, ECL, BL, 또는 FC 샌드위치 ELISA를 이용하여 이러한 검출을 실행한다.

[0163]

본 명세서의 양태는 단일플렉스(singleplex) 또는 다중플렉스(multiplex) 방식으로 실행될 수 있다. 단일플렉스 방식으로 실시된 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 면역 기반 방법은  $\alpha$ -SNAP-25 항체 및 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재만을 탐지한다. 다중플렉스 방식으로 실시된 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 면역 기반 방법은 두 개 이상의 항체-항원 복합체의 존재를 동시에 검출하는데; 이중 하나는  $\alpha$ -SNAP-25 항체 및 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체이며; 다른 하나는 제2, 제3, 제4 등의 상이한 단백질에 대한 항체-항원 복합체다. 제 2 단백질은 시료 간의 변이성을 최소화시킬 수 있는 내부 기준으로 이용하여, 검출된  $\alpha$ -SNAP-25/SNAP-25 항체-항원 복합체의 양을 제 2 단백질에 대해 검출된 항체-항원 복합체의 양으로 표준화시킬 수 있다. 이와 같이, 제 2 단백질은 보통 관리 유지(house-keeping) 단백질과 같이 세포에 의해 지속적으로 발현되는 것이다. 유용한 제 2 단백질의 비제한적 예는 예컨대, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제 (GAPDH), 신탁신(Syntaxin), 사이토킨을 포함한다. 다중플렉스 방식으로 면역 기반 검정을 실행하는 방법은 예컨대, *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 Cytokines Measurement in inflammation and Aging Research, J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 63(8): 879-884 (2008)에서 설명되고 있으며, 이들 각 문헌은 전문이 참고문헌에 통합된다.

[0164]

따라서, 한 구체예에서, 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 면역 기반 방법은  $\alpha$ -SNAP-25 항체 및 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재만을 검출하는 단일플렉스 방식으로 실행된다. 또 다른 구체예에서, 재표적화된 엔도펩-

티다제 활성을 검출하는 면역 기반 방법은  $\alpha$ -SNAP-25 항체 및 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하고, 그리고 동시에 SNAP-25이외의 단백질, 예컨대, GAPDH 또는 신탁신(Syntaxin)에 대한 최소한 하나의 기타 항체-항원 복합체를 동시에 탐지하는 다중플렉스 방식으로 실행하였다.

[0165] 본 명세서의 양태는 부분적으로 재표적화된 엔도펩티다제 면역 저항성을 결정하는 방법을 제공한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성"은 직간접적으로 포유동물의 면역반응이 치료법의 효능을 감소시키기 때문에 재표적화된 엔도펩티다제 치료법에 충분하게 반응하지 않는, 또는 재표적화된 엔도펩티다제 치료법의 감소된 유익한 효과를 나타내는 포유동물을 말한다. 감소된 효능의 비제한적인 예는 재표적화된 엔도펩티다제의 특이성 또는 활성을 감소 또는 억제시키는 방식으로 재표적화된 엔도펩티다제에 결합하는 최소한 하나의  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 중화항체의 존재일 수도 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "재표적화된 엔도펩티다제 치료법"은 재표적화된 엔도펩티다제를 이용하여 또는 의학적, 치료요법적, 치유력이 있는, 미용, 교정 또는 임의의 기타 유익한 효과를 가진 재표적화된 엔도펩티다제의 약물, 조제물 또는 혼합물의 1회 또는 그 이상의 단위 복용량을 투여하여 신경조정을 요하는 포유동물을 치료, 구제, 치유, 회복 또는 복귀 또는 바람직하지 못한 것을 중화시키는 임의의 기타 수단을 의미한다. 재표적화된 엔도펩티다제 치료법은 임의의 천연 또는 이의 변형된 단편을 임의의 체형에서 임의의 운반체 또는 활성 성분과 복합하여 이용하고, 임의의 투여 경로를 통하여 투여하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0166] 본 명세서의 양태는, 부분적으로,  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존부에 대해 테스트를 받게 되는 포유동물로부터 수거한 시험 시료를 제공한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "시험 시료"는 최소한 하나의  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 항체를 포함하는 또는 포함할 가능성이 있는 임의의 생물제제를 말한다.  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 항체는  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체 또는  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 비-중화 항체일 수 있다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 " $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체"는 생리학적 조건하에서 재표적화된 엔도펩티다제 치료법에서 재표적화된 엔도펩티다제의 효과를 발휘하는 것을 감소시키거나 또는 중단시키는 방식으로 재표적화된 엔도펩티다제의 일부분에 결합할 수 있는 임의의  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 항체를 말한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 " $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 비-중화 항체"는 엔도펩티다제의 일부분에 결합할 수 있지만, 생리학적 조건하에서 재표적화된 엔도펩티다제 치료법에서 재표적화된 엔도펩티다제가 효과를 발휘하는 것을 중단시키지는 못하는 임의의  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 항체를 말한다. 혈액, 혈장, 혈청 및 임파액을 포함하나 이에 한정되지 않는,  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 항체를 포함할 수 있는 임의의 그리고 모든 시료를 이 방법에 이용할 수 있다. 게다가, 재표적화된 엔도펩티다제에 대항하여  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 항체를 생성시킬 수 있는, 조류와 마우스, 쥐, 염소, 양, 말, 당나귀, 소, 영장류 및 인간을 포함하는 포유동물을 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 그리고 모든 유기체는 시료의 원천으로 삼을 수 있다. 채혈 및 혈청 준비를 위한 비제한적 예가 되는 특이적 프로토콜은 예컨대, *Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, Blood Collection in Healthcare (F.A. Davis Company, 2001); and Diana Garza & Kathleen Beagan-McBride, Phlebotomy Handbook: Blood Collection Essentials (Prentice Hall, 6th ed., 2002)*에서 설명하고 있다. 이러한 프로토콜은 당업계 숙련자의 범주내에 있는 그리고 여기에서 교시하는 것으로부터 일상적인 과정이다. 재표적화된 엔도펩티다제에 노출하기 전, 재표적화된 엔도펩티다제의 일회 치료 후, 다중 재표적화된 엔도펩티다제의 다수 치료 후, 재표적화된 엔도펩티다제 치료법에 대한 저항성이 개시되기 전, 또는 재표적화된 엔도펩티다제 치료법에 대한 저항성이 개시된 후, 유기체로부터 시험 시료를 수거할 수 있다.

[0167] 본 명세서의 양태는, 부분적으로, 대조 시료를 제공한다. 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "대조 시료"는 시험 시료의 존재 또는 부재를 알고 있으며, 음성 및 양성 대조 시료를 모두 포함하는 임의의 시료를 말한다.  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체에 있어서, 재표적화된 엔도펩티다제에 노출된 적이 없는 개체로부터 음성 대조 시료를 수득할 수 있으며, 음성 대조 시료는 시험 시료를 공급하지만, 재표적화된 엔도펩티다제 치료법을 받지 않는 동일 개체로부터 얻은 시료; 재표적화된 엔도펩티다제에 노출된 적이 없는 다른 개체로부터 얻은 시료; BoNT/A에 노출된 적이 없는 다수의 다른 개체로부터 수득한 취합된 시료를 포함하나 이에 한정하지 않는다.  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체에 있어서, 양성 대조 시료는 재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성을 나타내는 개체로부터 수득할 수 있고, 환자 기반 테스트 검정에서 양성인 테스트 개체; 생체내 생물학적 검정에서 테스트 양성인 개체; 그리고 예컨대, 재표적화된 엔도펩티다제 백신접종을 받은 개체와 같이, 과면역성을 보이는 개체를 포함하나 이에 한정하지 않는다.

[0168]  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 항체는 시료로부터 정제할 수 있다는 것을 더 예측한다.  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 항체는 단백질 A/G 크로마토그래피 및 친화도 크로마토그래피를 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 과정을

이용하여 시료로부터 정제할 수 있다. 시료로부터 항체를 정제하기 위한 특이적 프로토콜의 비제한적 예는 예컨대, *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); 및 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, supra, (2001)에서 설명하고 있으며, 이들은 참고문헌에 통합된다. 게다가, 항체 정제 방법 그리고 잘-규정된 시약, 조건 및 프로토콜의 비제한적 예는 *Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL*; 및 *Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA*을 포함하나 이에 한정되지 않는 상업적 공급사로부터 바로 이용할 수 있다. 이러한 프로토콜은 당업계 숙련자의 범위내에 있는 통상적인 과정들이다.

[0169] 따라서, 한 구체예에서, 시료는 혈액을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 이러한 시료는 마우스의 혈액, 쥐의 혈액, 염소의 혈액, 양의 혈액, 말의 혈액, 당나귀의 혈액, 소의 혈액, 영장류의 혈액 또는 인간의 혈액을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 시료는 혈장을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 시험 시료는 마우스의 혈장, 쥐의 혈장, 염소의 혈장, 양의 혈장, 말의 혈장, 당나귀의 혈장, 소의 혈장, 영장류의 혈장 또는 인간의 혈장을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 시료는 혈청을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 이러한 시료는 마우스의 혈청, 쥐의 혈청, 염소의 혈청, 양의 혈청, 말의 혈청, 당나귀의 혈청, 소의 혈청, 영장류의 혈청 그리고 인간의 혈청을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 시료는 임파액을 포함한다. 이 구체예의 양태에서, 시료는 마우스의 임파액, 쥐의 임파액, 염소의 임파액, 양의 임파액, 말의 임파액, 당나귀의 임파액, 소의 임파액, 영장류의 임파액 또는 인간의 임파액을 포함한다. 다른 구체예에서, 시료는 시험 시료다. 다른 구체예에서, 시료는 대조 시료다. 이 구체예의 양태들에서, 대조 시료는 음성 대조 시료 또는 양성 대조 시료다.

[0170] 본 명세서의 양태는, 부분적으로, 단계 (d)에서 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25의 검출된 양을 단계 (e)에서 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25의 검출된 양과 비교하는 것을 제공한다. 한 구체예에서, 시험 시료 안에 SNAP-25 절단 생성물의 양은 대조 시료 안에 있는 SNAP-25 절단 생성물의 양과 비교하여 더 많다. 이 구체예의 양태에서, 양성 대조 시료와 비교하여 시험 시료 안에 SNAP-25 절단 생성물의 양이 등가인 경우는 포유동물에서 재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성의 감소 또는 부재를 나타낸다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 음성 대조 시료와 비교하여 시험 시료 안에 SNAP-25 절단 생성물의 양과 비교하여 더 적다. 이 구체예의 양태에서, 양성 대조 시료와 비교하여 시험 시료 안에 SNAP-25 절단 생성물의 양이 등가이거나 또는 더 적다는 것은 포유동물에서 재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성의 증가 또는 존재를 나타낸다. 또 다른 구체예에서, 시험 시료 안에 SNAP-25 절단 생성물의 양은 대조 시료 안에 있는 SNAP-25 절단 생성물의 양과 비교하여 더 적다. 이 구체예의 양태에서, 양성 대조 시료와 비교하여 시험 시료 안에 SNAP-25 절단 생성물의 양이 등가이거나 또는 더 적다는 것은 포유동물에서 재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성의 증가 또는 존재를 나타낸다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 음성 대조 시료와 비교하여 시험 시료 안에 SNAP-25 절단 생성물의 양이 더 적다는 것은 포유동물에서 재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성의 증가 또는 존재를 나타낸다.

[0171] 시료안에  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존재를 탐지하는데 적당한 임의의 그리고 모든 검정 조건은 예컨대, 선형 검정 조건 및 비-선형 검정 조건과 같이 본 명세서에서 공개하는 방법에 유용하다. 한 구체예에서, 검정 조건은 선형이다. 이 구체예의 양태에서, 재표적화된 엔도펩티다제의 검정 양은 과량이다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 재표적화된 엔도펩티다제의 검정 양은 속도-제한적이다. 이 구체예의 또 다른 양태에서, 시험 시료의 검정 양은 속도-제한적이다.

[0172] 본 명세서의 양태는 또한 다음과 같이 설명될 수 있다:

[0173] 1. 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 방법, 이러한 방법은 a) 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제에 의한 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감하며; b) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; c) SNAP-25 성분을  $\alpha$ -SNAP-25 항체와 접촉시키는 단계, 여기서  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; 그리고 d)  $\alpha$ -SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계를 포함하고, 여기서 항체-항원 복합체의 검출은 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 나타낸다.

[0174] 2. 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 방법, 이러한 방법은 a) 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티

다제에 의한 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 민감하고; b) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; c) SNAP-25 성분을 고형 상 지지물에 연결된  $\alpha$ -SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계, 여기서  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; 그리고 d)  $\alpha$ -SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계를 포함하고, 여기서 항체-항원 복합체의 검출은 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 나타낸다.

[0175] 3. 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 탐지하는 방법, 이러한 방법 a) 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제에 의한 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 민감하고; b) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; c) SNAP-25 성분을 고형 상 지지물에 고정하는 단계; d) SNAP-25 성분을  $\alpha$ -SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계, 여기서  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; 그리고 e)  $\alpha$ -SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계를 포함하고, 여기서 항체-항원 복합체의 검출은 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 나타낸다.

[0176] 4. 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 방법, 이러한 방법은 a) 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있고; b) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; c) SNAP-25 성분을  $\alpha$ -SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계, 여기서  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; 그리고 d)  $\alpha$ -SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계를 포함하고, 여기서 항체-항원 복합체의 검출은 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 나타낸다.

[0177] 5. 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 탐지하는 방법, 이러한 방법은 a) 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있고; b) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; c) SNAP-25 성분을 고형 상 지지물에 연결된  $\alpha$ -SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계, 여기서  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; 그리고 d)  $\alpha$ -SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계를 포함하고, 여기서 항체-항원 복합체의 검출은 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 나타낸다.

[0178] 6. 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 탐지하는 방법, 이러한 방법은 a) 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있고; b) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; c) SNAP-25 성분을 고형 상 지지물에 고정하는 단계; d) SNAP-25 성분을  $\alpha$ -SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계, 여기서  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; 그리고 e)  $\alpha$ -SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계를 포함하고, 여기서 항체-항원 복합체의 검출은 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 나타낸다.

[0179] 7. 포유동물에서 재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성을 결정하는 방법으로, 이 방법은 a)  $\alpha$ -재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존부에 대해 테스트받는 포유동물로부터 수득된 시험 시료에 재표적화된 엔도펩티다제를 첨가하는 단계; b) 확립된 세포주로부터의 세포를 시험 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 민감하고; c) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; d) SNAP-25 성분을  $\alpha$ -SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계, 여기서  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A

분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; e) α-SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계; f) 시험 시료 대신 음성 대조 시료를 이용하여 단계 b-e를 반복하는 단계, 여기서 음성 대조 시료는 재표적화된 엔도펩티다제와 α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체를 포함하지 않는 것으로 알려진 혈청을 포함하며; 그리고 g) 단계 e에서 항체-항원 복합체의 검출된 양을 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양에 비해 단계 e에서 항체-항원 복합체의 검출된 양이 더 적다면 α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존재를 나타낸다.

[0180] 8. 포유동물에서 재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성을 결정하는 방법으로, 이 방법은 a) α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존부에 대해 테스트받는 포유동물로부터 수득된 시험 시료에 재표적화된 엔도펩티다제를 첨가하는 단계; b) 확립된 세포주로부터의 세포를 시험 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감하고; c) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; d) SNAP-25 성분을 고형 상 지지물에 연결된 α-SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계, 여기서 α-SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; e) α-SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계; f) 시험 시료 대신 음성 대조 시료를 이용하여 단계 b-e를 반복하는 단계, 여기서 음성 대조 시료는 재표적화된 엔도펩티다제와 α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체를 포함하지 않는 것으로 알려진 혈청을 포함하며; 그리고 g) 단계 e에서 항체-항원 복합체의 검출된 양을 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양에 비해 단계 e에서 항체-항원 복합체의 검출된 양이 더 적다면, α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존재를 나타낸다.

[0181] 9. 포유동물에서 재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성을 결정하는 방법으로, 이 방법은 a) α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존부에 대해 테스트받는 포유동물로부터 수득된 시험 시료에 재표적화된 엔도펩티다제를 첨가하는 단계; b) 확립된 세포주로부터의 세포를 시험 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 민감하고; c) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; d) SNAP-25 성분을 고형 상 지지물에 고정하는 단계; e) SNAP-25 성분을 α-SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계, 여기서 α-SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; f) α-SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계; g) 시험 시료 대신 음성 대조 시료를 이용하여 단계 b-f를 반복하는 단계, 여기서 음성 대조 시료는 재표적화된 엔도펩티다제와 α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체를 포함하지 않는 것으로 알려진 혈청을 포함하며; 그리고 h) 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양을 단계 g에서 항체-항원 복합체의 검출된 양과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 단계 g에서 항체-항원 복합체의 검출된 양에 비해 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양이 더 적다면 α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존재를 나타낸다.

[0182] 10. 포유동물에서 재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성을 결정하는 방법으로, 이 방법은 a) α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존부에 대해 테스트받는 포유동물로부터 수득된 시험 시료에 재표적화된 엔도펩티다제를 첨가하는 단계; b) 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있고; c) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; d) SNAP-25 성분을 α-SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계, 여기서 α-SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; e) α-SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계; f) 시험 시료 대신 음성 대조 시료를 이용하여 단계 b-e를 반복하는 단계, 여기서 음성 대조 시료는 재표적화된 엔도펩티다제와 α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체를 포함하지 않는 것으로 알려진 혈청을 포함하며; 그리고 g) 단계 e에서 항체-항원 복합체의 검출된 양을 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양에 비해 단계 e에서 항체-항원 복합체의 검출된 양이 더 적다면 α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존재를 나타낸다.

[0183] 11. 포유동물에서 재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성을 결정하는 방법으로, 이 방법은 a) α-재표적화된 엔도

펩티다제 중화 항체의 존부에 대해 테스트받는 포유동물로부터 수득된 시험 시료에 재표적화된 엔도펩티다제를 첨가하는 단계; b) 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있고; c) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; d) SNAP-25 성분을 고형 상 지지물에 연결된 α-SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계, 여기서 α-SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; e) α-SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계; f) 시험 시료 대신 음성 대조 시료를 이용하여 단계 b-e를 반복하는 단계, 여기서 음성 대조 시료는 재표적화된 엔도펩티다제와 α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체를 포함하지 않는 것으로 알려진 혈청을 포함하며; 그리고 g) 단계 e에서 항체-항원 복합체의 검출된 양을 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양에 비해 단계 e에서 항체-항원 복합체의 검출된 양이 더 적다면 α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존재를 나타낸다.

[0184] 12. 포유동물에서 재표적화된 엔도펩티다제 면역저항성을 결정하는 방법으로, 이 방법은 a) α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존부에 대해 테스트받는 포유동물로부터 수득된 시험 시료에 재표적화된 엔도펩티다제를 첨가하는 단계; b) 확립된 세포주로부터의 세포를 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 시료로 처리하는 단계, 여기서 확립된 세포주로부터의 세포는 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있고; c) 처리된 세포로부터 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 SNAP-25 성분을 분리하는 단계; d) SNAP-25 성분을 고형 상 지지물에 고정하는 단계; e) SNAP-25 성분을 α-SNAP-25 항체에 접촉시키는 단계, 여기서 α-SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물의 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하고; f) α-SNAP-25 항체 및 SNAP-25 절단 생성물을 포함하는 항체-항원 복합체의 존재를 탐지하는 단계; g) 시험 시료 대신 음성 대조 시료를 이용하여 단계 b-f를 반복하는 단계, 여기서 음성 대조 시료는 재표적화된 엔도펩티다제와 α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체를 포함하지 않는 것으로 알려진 혈청을 포함하며; 그리고 h) 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양을 단계 g에서 항체-항원 복합체의 검출된 양과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 단계 g에서 항체-항원 복합체의 검출된 양에 비해 단계 f에서 항체-항원 복합체의 검출된 양이 더 적다면 α-재표적화된 엔도펩티다제 중화 항체의 존재를 나타낸다.

[0185] 13. 제1항 내지 제3항 및 제7항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 세포는 재표적화된 엔도펩티다제의 약 500 nM 이하, 약 400 nM 이하, 약 300 nM 이하, 약 200 nM 이하, 약 100 nM 이하까지 재표적화된 엔도펩티다제 활성에 최약한 방법.

[0186] 14. 제4항 내지 제6항 및 제10항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 세포는 약 500 nM 이하, 약 400 nM 이하, 약 300 nM 이하, 약 200 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있는 방법.

[0187] 15. 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 시료는 약 100 ng 이하, 약 10 ng 이하, 약 1 ng 이하, 100 fg 이하, 10 fg 이하, 또는 1 fg 이하의 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 방법.

[0188] 16. 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 시료는 약 100 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하, 약 100 pM 이하, 약 10 pM 이하, 약 1 pM 이하, 약 0.5 nM 이하, 또는 약 0.1 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 방법.

[0189] 17. 제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항체-항원 복합체의 존재는 면역-블롯(immuno-blot) 검정, 면역침강법 검정, ELISA, 또는 샌드위치 ELISA에 의해 검출되는 방법.

[0190] 18. 제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은 적어도 3:1, 적어도 5:1, 적어도 10:1, 적어도 20:1, 적어도 50:1, 또는 적어도 100:1의 하한 점근치에 대한 신호 대 잡음 비를 갖는 방법.

[0191] 19. 제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은 적어도 10:1, 적어도 20:1, 적어도 50:1, 적어도 100:1, 적어도 200:1, 적어도 300:1, 적어도 400:1, 적어도 500:1, 또는 적어도 600:1의 고점근치에 대한 신호 대 잡음 비를 갖는 방법.

[0192] 20. 제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은, 예를 들어, 적어도 100 ng, 적어도 50

ng, 적어도 10 ng, 적어도 5 ng, 적어도 100 pg, 적어도 50 pg, 적어도 10 pg, 적어도 5 pg, 적어도 100 fg, 적어도 50 fg, 적어도 10 fg, 또는 적어도 5 fg의 재표적화된 엔도펩티다아제의 EC<sub>50</sub> 활성을 검출할 수 있는 방법.

[0193] 21. 제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은, 예를 들어, 적어도 10 nM, 적어도 5 nM, 적어도 100 nM, 적어도 50 nM, 적어도 10 nM, 적어도 5 nM, 적어도 1 nM, 적어도 0.5 nM, 또는 적어도 0.1 nM의 재표적화된 엔도펩티다아제의 EC<sub>50</sub> 활성을 검출할 수 있는 방법.

[0194] 22. 제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은, 예를 들어, 10 pg 이하, 9 pg 이하, 8 pg 이하, 7 pg 이하, 6 pg 이하, 5 pg 이하, 4 pg 이하, 3 pg 이하, 2 pg 이하, 1 pg 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOD를 갖는 방법.

[0195] 23. 제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은, 예를 들어, 100 nM 이하, 90 nM 이하, 80 nM 이하, 70 nM 이하, 60 nM 이하, 50 nM 이하, 40 nM 이하, 30 nM 이하, 20 nM 이하, 또는 10 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOD를 갖는 방법.

[0196] 24. 제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은, 예를 들어, 10 pg 이하, 9 pg 이하, 8 pg 이하, 7 pg 이하, 6 pg 이하, 5 pg 이하, 4 pg 이하, 3 pg 이하, 2 pg 이하, 1 pg 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 갖는 방법.

[0197] 25. 제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은, 예를 들어, 100 nM 이하, 90 nM 이하, 80 nM 이하, 70 nM 이하, 60 nM 이하, 50 nM 이하, 40 nM 이하, 30 nM 이하, 20 nM 이하, 또는 10 nM 이하의 재표적화된 엔도펩티다아제의 LOQ를 갖는 방법.

[0198] 26. 제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 방법은 완전 활성의 재표적화된 엔도펩티다아제를, 완전 활성의 재표적화된 엔도펩티다아제 A의 활성의 70% 이하, 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 또는 10% 이하를 갖는 부분 활성의 재표적화된 엔도펩티다아제로부터 구별할 수 있는 방법.

[0199] 27. 제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 SNAP-25 절단 생성물로부터의 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합으로부터의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 포함하는 에피토프에 결합하는 방법.

[0200] 28. 제27항에 있어서, 상기  $\alpha$ -SNAP-25 항체는  $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  미만의 SNAP-25 절단 생성물로부터의 BoNT/A 절단 부위 분리되기 쉬운 결합의 카르복실 말단 글루타민을 포함하지 않는 에피토프의 해리속도상수를 가지며; 상기  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 0.450 Nm 미만의 에피토프에 대한 평형해리상수를 갖는 방법.

[0201] 29. 제27항에 있어서, 상기 단리된  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 72, 서열번호: 74, 서열번호: 76, 서열번호: 80, 및 서열번호: 82로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및 서열번호: 84, 서열번호: 86, 서열번호: 88, 서열번호: 90, 및 서열번호: 92로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역을 갖는 방법.

[0202] 30. 제27항에 있어서, 상기 단리된  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 93의 V<sub>H</sub> CDR1, 서열번호: 94의 V<sub>H</sub> CDR1, 서열번호: 95의 V<sub>H</sub> CDR1, 서열번호: 118의 V<sub>H</sub> CDR1, 서열번호: 119의 V<sub>H</sub> CDR1, 또는 서열번호: 120의 V<sub>H</sub> CDR1을 적어도 포함하는 방법.

[0203] 32. 제27항에 있어서, 상기 단리된  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 96의 V<sub>H</sub> CDR2, 서열번호: 97의 V<sub>H</sub> CDR2, 서열번호: 98의 V<sub>H</sub> CDR2, 서열번호: 99의 V<sub>H</sub> CDR2, 서열번호: 121의 V<sub>H</sub> CDR2, 서열번호: 122의 V<sub>H</sub> CDR2, 또는 서열번호: 123의 V<sub>H</sub> CDR2을 적어도 포함하는 방법.

[0204] 33. 제27항에 있어서, 상기 단리된  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 100의 V<sub>H</sub> CDR3, 서열번호: 101의 V<sub>H</sub> CDR3, 서열번호: 102의 V<sub>H</sub> CDR3, 또는 서열번호: 124의 V<sub>H</sub> CDR3을 적어도 포함하는 방법.

[0205] 34. 제27항에 있어서, 상기 단리된  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 103의 V<sub>L</sub> CDR1, 서열번호: 104의 V<sub>L</sub> CDR1, 서열번호: 105의 V<sub>L</sub> CDR1, 서열번호: 106의 V<sub>L</sub> CDR1, 서열번호: 107의 V<sub>L</sub> CDR1, 서열번호: 125의 V<sub>L</sub> CDR1, 서열

번호: 126의  $V_L$  CDR1, 서열번호: 127의  $V_L$  CDR1, 서열번호: 128의  $V_L$  CDR1, 또는 서열번호: 129의  $V_L$  CDR1을 적어도 포함하는 방법.

[0206] 35. 제27항에 있어서, 상기 단리된  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 108의  $V_L$  CDR2, 서열번호: 109의  $V_L$  CDR2, 서열번호: 110의  $V_L$  CDR2, 서열번호: 111의  $V_L$  CDR2, 또는 서열번호: 112의  $V_L$  CDR2을 적어도 포함하는 방법.

[0207] 36. 제27항에 있어서, 상기 단리된  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 113의  $V_L$  CDR3, 서열번호: 114의  $V_L$  CDR3, 서열번호: 115의  $V_L$  CDR3, 서열번호: 116의  $V_L$  CDR3, 또는 서열번호: 117의  $V_L$  CDR3을 적어도 포함하는 방법.

[0208] 37. 제27항에 있어서, 상기 단리된  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 93, 서열번호: 121 및 서열번호: 100을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및 서열번호: 105, 서열번호: 110 및 서열번호: 115을 포함하는 경쇄 가변 구역을 포함하는 방법.

[0209] 38. 제27항에 있어서, 상기 단리된  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 147 또는 서열번호: 148의 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 방법.

[0210] 39. 제27항에 있어서, 상기 단리된  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 서열번호: 39, 서열번호: 40, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 또는 서열번호: 44 의 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는 방법.

#### 실시예

##### 실시예 I

###### 내생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 발현을 위한 후보 세포주의 스크리닝

[0214] 다음의 실시예는 세포 기반 효능 검정을 개발하기 위하여 요구되는 재표적화된 엔도펩티다제 흡수 능력을 보유하는 확립된 세포주를 어떻게 확인하는지를 설명한다.

###### 1. 후보 세포주의 보존 배양(Stock Culture)의 성장.

[0216] 세포주를 성장시키기 위하여, 테스트할 세포주로부터 적당한 밀도의 세포를 162  $\text{cm}^2$ 의 조직 배양 플라스크 배양 플라스크(30 mL의 적당한 성장 배지를 포함)(표 1 참고)에 도말하고, 세포가 원하는 밀도에 이를 때까지 5% 또는 10% 이산화탄소 하에서 37°C 배양기내에서 성장시켰다.

**표 1. 세포주 스크리닝에 이용된 배지.**

세포주	혈청 성장 배지 조성물
SiMa 및 SiMa 클론	RPMI 1640, 10% 태아 소 혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민
PC12	RPMI 1640, 5% 열에 의해 비활성화된 태아 소 혈청, 10% 말 혈청, 2 mM GlutaMAX™, 10 mM HEPES, 1 mM 피루베이트 나트륨염, 1% 페니실린-스트렙토마이신
N18 ND8/34 NG108-15	90 % DMEM, 10% 열에 의해 비활성화된 태아 소 혈청, 2 mM 글루타민, 2 mM 포도당
SK-N-DZ SK-N-F1 SK-N-SH	90% DMEM, 10% 열에 의해 비활성화된 태아 소 혈청, 4 mM 글루타민, 4 mM 포도당, 0.1 mM 비-필수 아미노산, 1.5 g/L NaHCO <sub>3</sub>
BE(2)-C SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM(11090-081, Gibco), Ham's F12 (11765-054, Gibco), 10% 열에 의해 비활성화된 태아 소 혈청, 2 mM 글루타민, 0.1 mM 비-필수 아미노산,
ND3, ND7, ND15	2 mM 글루타민 (Invitrogen, Cat #. 11885), 10 % 태아 소 혈청 (Invitrogen, Cat #. 16140), 및 1x 항생제 / 항진균제가 포함된 DMEM 배지
Neuro-2a	EMEM, 10% 열에 의해 비활성화된 태아 소 혈청, 2 mM 글루타민, 0.1 mM 비-필수 아미노산, 1.5 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 1 mM 피루베이트 나트륨염

###### 2. 세포 표면 상에서 표적 수용체를 발현하는 세포의 스크리닝.

[0219] 유세포 검정기 및/또는 리간드 결합 검정을 이용하여 원하는 표적 수용체의 존재에 대해 세포주를 스크리닝하였다. 이들 실시예는 원형질 막에서 오피오이드 또는 오피오이드 유사 수용체를 확인하기 위하여 시약을 이용하였지만, 하기에서 논의되는 방법들은 임의의 재표적화된 엔도펩티다제에 대한 동족 수용체를 확인하는데 이용할 수 있다.

**a. 유세포 검정기를 이용한 세포주의 확인.**

[0222] 세포 표면에서 재표적화된 엔도펩티다제에 대한 표적 수용체를 발현하는 확립된 세포주를 포함하는 세포를 확인하기 위하여, 유세포 검정기 검정을 실행하였다. 각 후보 세포주의 세포를 단락 1에서 설명한 것과 같이 성장시키고, 트립신 처리하고, 1×PBS, 0.5% BSA를 포함하는 착색(staining) 완충액으로 세척하고, 1200 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 펠렛화된 세포를 착색 완충액에 혼탁시키고, 약  $2.0 \times 10^6$  개의 세포를 테스트되는 각 수용체에 2개씩, 새로운 투브로 옮겼다. 오피오이드 또는 오피오이드 유사 수용체의 존재를 스크린하기 위하여, 약 2.0-5.0  $\mu$ L의  $\alpha$ -ORL-1 RA14133 (Neuromics, Edina, MN),  $\alpha$ -DOR 토끼 다클론성 항체 RA10101 (Neuromics, Edina, MN),  $\alpha$ -KOR 토끼 다클론성 항체 RA10103 (Neuromics, Edina, MN), 또는  $\alpha$ -MOR 토끼 다클론성 항체 RA10104 (Neuromics, Edina, MN)를 하나의 투브에 첨가하였고, 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 항온처리하였다. 두 번째 투브는 임의의 항체 없이 4°C에서 1시간 동안 항온처리하여, 음성 기준으로 삼았다. 항체 항온처리 후, 1.0 mL의 착색 완충액을 각 투브에 첨가하였고, 1200 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 세포 펠렛은 1.0 mL의 착색 완충액으로 1회 이상 세척하였다. 세포 펠렛은 200  $\mu$ L의 착색 완충액에 재현탁시켰고, 그리고 2.0  $\mu$ L의 염소 항-토끼 IgG FITC 항체를 각 투브에 첨가하였고, 암상태에서, 4°C에서 1시간 동안 항온처리하였다. 2차 항체로 항온처리 후, 1.0 mL의 착색 완충액을 각 투브에 첨가하였고, 1200 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 세포 펠렛은 1.0 mL의 착색 완충액으로 1회 이상 세척하였고, 세포 펠렛은 500  $\mu$ L의 착색 완충액에 재현탁시켰다. 유세포검정기를 이용하여 시료를 검정하였고, 데이터는 토끼 IgG FITC 착색 위 항-수용체 항체 착색의 오버레이로 나타내었다.

[0223] 이 결과에서 테스트된 세포주 중에서, ORL-1은 SiMa, SiMa P>33, 클론 H10, ND7, 및 SK-N-DZ 확립된 세포주를 포함하는 세포의 약 25% 내지 약 50%의 세포 표면에서 ORL-1이 발현되었고; SH-SY5Y 및 ND15 확립된 세포주를 포함하는 세포의 약 25% 내지 약 50% 사이의 세포 표면에서 발현되었고; 그리고 ND3, ND8, N18, 및 Neuro-2a 확립된 세포주를 포함하는 세포의 약 25% 미만의 세포 표면에서 발현되었다는 것을 나타낸다(표 2). 이 결과에서 KOR은 SH-SY5Y 및 ND7 확립된 세포주를 포함하는 세포의 약 50%의 세포 표면에서 발현되었고; SiMa 클론 H10, SiMa P>33, ND15, 및 Neuro-2a 확립된 세포주를 포함하는 세포의 약 25% 내지 약 50% 사이의 세포 표면에서 발현되었다는 것을 또한 나타낸다(표 2). 이 결과에서 MOR은 ND7, ND15, 및 SiMa P>33 확립된 세포주를 포함하는 세포의 약 50%의 세포 표면에서 발현되었고; SH-SY5Y, SiMa 클론 H10, ND8, 및 Neuro-2a 확립된 세포주를 포함하는 세포의 약 25% 내지 약 50% 사이의 세포 표면에서 발현되었고; 그리고 ND3 및 N18 확립된 세포주를 포함하는 세포의 약 25% 미만의 세포 표면에서 발현되었다는 것을 또한 나타낸다(표 2).  $\alpha$ -DOR 토끼 다클론성 항체 RA10101은 적절하게 작용하지 못하였고, 사용 가능한 데이터를 얻지 못하였다.

**b. 리간드 결합을 이용한 세포주의 확인.**

[0224] 세포 표면에서 재표적화된 엔도펩티다제에 대한 표적 수용체를 발현하는 확립된 세포주를 포함하는 세포를 확인하기 위하여, 리간드 결합 검정을 실행하였다. 테스트되는 후보 세포주의 세포를 부착을 촉진하기 위하여 약 4시간 동안 검정-깨끗한 바닥 96-웰 평판에 접종하였다. 오피오이드 또는 오피오이드 유사 수용체의 존재에 대해 스크리닝하기 위하여, 각 웰로부터 배지를 흡출하였고, 그리고 0 nM(처리안된 기준), 0.001 nM, 0.01 nM, 0.1 nM, 또는 1 nM의 FAM-노씨셉틴 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA); 또는 0nM(처리안된 기준), 0.001 nM, 0.01 nM, 0.1 nM, 또는 1 nM의 FAM-디노르핀 A (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA)을 포함하는 50  $\mu$ L의 리간드 용액으로 대체하였다. 5% 이산화탄소하에서, 37°C 배양기에서 1시간 동안 세포를 리간드 용액으로 항온처리하였다. 이 세포를 100  $\mu$ L의 1× PBS로 3회 세척함으로써 결합안된 리간드를 제거하였다. 평판은 Typhoon (Ex 488 및 Em 520 nm)에서 스캔하였고, 그 다음 RFU 신호에 대해 M5 Plate Reader (Ex 495 and Em 520 nm)에서 관독하였다. 결과에서 SiMa 클론 H10, SH-SY5Y, 및 SK-N-DZ 확립된 세포주를 포함하는 세포는 노씨셉틴에 결합하였고, 반면 SiMa 클론 H10을 포함하는 세포는 또한 디노르핀에 결합한 것을 나타낸다(표 2).

표 2. 세포 표면상에 표적 수용체를 발현시키는 세포주

표적 수용체	확인된				
	유세포분석			리간드 결합	
	50% 이상 발현	25% 내지 50% 발현	50% 미만 발현	노씨펩틴	Dynorphin A
ORL-1	AGN P33, SiMa, SiMa 클론 H10, ND7, SK-N-DZ	SH-SY5Y, ND15	ND3, ND8, N18, Neuro-2a	SiMa 클론 H10, SH-SY5Y, SK-N-DZ	—
DOR	ND	ND	ND	ND	ND
KOR	SH-SY5Y, ND7	SiMa 클론 H10, AGN P33, ND15, Neuro-2a	ND3, ND8, N18	—	SiMa 클론 H10
MOR	ND7, ND15, AGN P33	SH-SY5Y, SiMa 클론 H10, ND8, Neuro-2a	ND3, N18	ND	ND

[0226]

[0227] 유사한 방법을 이용하여, 재표적화된 엔도펩티다제에 대한 동족 수용체를 가지는 세포를 포함하는 세포주는 상기에서 설명된 것과 같이, 이러한 엔도펩티다제에 대한 표적화 도메인의 FAM-라벨링과 세포주의 스크리닝에 의해 확인할 수 있다.

[0228]

### 3. 재표적화된 엔도펩티다제 분자를 이용한 후보 세포주의 단일 단위 복용량 스크리닝.

[0229]

세포주가 적합한 재표적화된 엔도펩티다제 분자를 흡수할 수 있는지를 판단하기 위하여, 테스트될 세포주의 보존 배양물로부터 적당한 밀도의 세포를 적합한 혈청 성장 배지(표 1)를 포함하는 24-웰 조직 배양 플레이트의 웰에 도말하였다. 세포가 원하는 밀도에 이를 때 까지(대략 18 내지 24시간) 5% 또는 10% 이산화탄소 하에서 37°C 배양기내에서 성장시켰다. 오피오이드 재표적화된 엔도펩티다제의 흡수를 평가하기 위하여, 각 웰로부터 성장 배지를 흡출하고, 1) 오피오이드 재표적화된 엔도펩티다제가 없는 새로운 성장 배지(처리안된 세포주) 또는 2) 노씨펩틴 재표적화된 엔도펩티다제 (Noc/A) 30nM을 포함하는 새로운 성장 배지 또는 100 nM의 디노르핀 재표적화된 엔도펩티다제 (Dyn/A) (처리된 세포주)를 포함하는 새로운 성장 배지로 대체하였다. 하룻밤 항온처리 후, 성장 배지를 흡출시키고, 각 웰을 200 μL의 1×PBS로 세척하여 세포를 세척하였다. 세포를 수확하기 위하여, 1×PBS를 흡출시키고, 50 μL의 2×SDS 적하(Lighting) 완충액을 첨가하여 세포를 용해시키고, 용해물은 깨끗한 테스트 튜브로 옮기고, 5분간 시료를 95°C로 가열하였다.

[0230]

절단안된 SNAP-25 기질과 절단된 SNAP-25 생성물 모두의 존재를 탐지하기 위하여, 각 수확된 시료의 분획량을 Western 블랏으로 검정하였다. 이러한 검정에서, 수확된 시료의 분획량 12 μL을 변성, 환원 조건하에서 NuPAGE® Novex 12% Bis-Tris 사전주형된 폴리아크릴아미드 겔을 이용한(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) MOPS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리하였다. 겔로부터 분리된 웨프티드는 TRANS-블랏® SD 반-건조 전기영동 전달 세포 장치 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용한 Western 블랏팅에 의해 폴리비닐리덴플루오르화물 (PVDF) 막 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)으로 이동시켰다. Tris-완충액 염 (TBS) (25 mM 2-아미노-2-하이드록시메틸-1,3-프로판디올 염산(Tris-HCl)(pH 7.4), 137 mM 염화 나트륨, 2.7 mM 염화 칼륨), 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트), 2% 소의 혈청 알부민 (BSA), 5% 탈지분유를 포함하는 용액에서 실온, 2시간 동안 항온처리하여 PVDF 막을 차단시켰다. 1차 항체로써 α-SNAP-25 마우스 단클론성 항체 (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD)의 1:5,000 희석물 ; 또는 2) 1차 항체로써 S9684 α-SNAP-25 토끼 다클론성 항혈청(Sigma, St. Louis, MO)의 1:5,000 희석물을 포함하는 TBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트), 2% BSA, 및 5% 탈지 분유에서 4°C, 하룻밤 동안 차단된 막을 항온처리하였다. α-SNAP-25 마우스 단클론성 항체 및 토끼 다클론성 항체 모두다 절단안된 SNAP-25 기질 및 SNAP-25 절단 생성물을 모두 검출하여, 각 세포주에서 전체적인 SNAP-25 발현을 평가하고, 재표적화된 엔도펩티다제 처리 후, 재표적화된 엔도펩티다제 흡수 양을 평가하기 위한 매개변수로써 절단된 SNAP-25의 비율을 평가할 수 있다. 1차 항체 프로브된 블랏은 TBS, TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)에서 매회 15분씩 3회 세척하였다. 1) 2차 항체로써 말의 양고추냉이 과산화효소에 콘쥬게이트된 염소 다클론성 항-마우스 면역글로불린 G, 중쇄 및 경쇄(IgG, H+L) 항체(Zymed, South San Francisco, CA)의 1:10,000 희석물; 또는 2) 2차 항체로써 말의 양고추냉이 과산화효소에 콘쥬게이트된 염소 다클론성 항-토끼 면역글로불린 G, 중

쇄 및 경쇄(IgG, H+L) 항체(Zymed, South San Francisco, CA)를 포함하는 TBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트), 2% BSA, 및 5% 탈지 분유에서 실온, 2시간 동안 세척된 막을 항온처리하였다. 2차 항체 프로브된 블랏은 TBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)에서 매회 15분씩 3회 세척하였다. ECL Plus™ Western 블랏 검출 시스템 (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)을 이용하여 라벨된 SNAP-25 생성물의 신호 검출을 시작화하였고, 막을 이미지화하였으며, 절단된 비율은 Typhoon 9410 Variable Mode Imager 및 Imager Analysis 소프트웨어(GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)로 정량화하였다. 픽셀 크기(100 내지 200의 픽셀) 및 PMT 전압 세팅(350 내지 600, 보통 400)의 선택은 개별 블랏에 따라 달라진다.

[0231] SNAP-25 절단 생성물의 검출에 근거하여, 다음의 세포주는 30nM 흡수를 나타낸었고: Noc/A: BE(2)-C, N18TG2, Neuro-2a, SiMa, SK-N-BE(2)-C, 및 SK-N-DZ (표 3)반면, 다음 세포주는 100nM 흡수를 나타내었다: Dyn/A: N18TG2, Neuro-2a, PC12, 및 SiMa. 이들 일부 민감성 세포주들은 더 낮은 복용량의 화합물 및/또는 최대 복용량 반응으로 테스트하였다.

표 3. 재-표적화된 Noc/A 및 Dyn/A를 이용하여 후보 세포주의 단일-약량 스크리닝

세포주	설명	원천	30 nM Noc/A 흡수	100 nM Dyn/A 흡수
BE(2)-C	인간 신경아세포종	ATCC CRL-2268	유	NT
N18TG2	마우스 신경아세포종	DSMZ ACC 103	유	유
ND3	마우스 신경아세포종/1차 신생 쥐 DRG 하이브리드	ECACC 92090901	NDA	NDA
ND7/23	마우스 신경아세포종/1차 쥐 DRG 하이브리드	ECACC 92090903	무	무
ND8	마우스 신경아세포종/1차 신생 쥐 DRG 하이브리드	ECACC 92090904	NDA	NDA
ND15	마우스 신경아세포종/1차 신생 쥐 DRG 하이브리드	ECACC 92090907	무	무
Neuro-2a	마우스 신경아세포종	ATCC CCL-131	유	유
NG108-15	마우스 신경아세포종/쥐 신경교종 하이브리드	ECACC 88112302	무	NT
PC12	쥐 크롬친화세포종	ATCC CRL-1721	NT	유
SH-SY5Y	인간 신경아세포종	ATCC CRL-2266	무	NT
SiMa	인간 신경아세포종	DSMZ ACC 164	유	유
SK-N-BE(2)-C	인간 신경아세포종	ATCC CRL-2271	유	NT
SK-N-DZ	인간 신경아세포종	ATCC CRL-2149	유	NT
SK-N-F1	인간 신경아세포종	ATCC CRL-2142	무	NT
SK-N-SH	인간 신경아세포종	ECACC 86012802	무	NT

NT: 테스트안됨

NDA: 이러한 세포주에서 검출가능한 양의 SNAP-25가 탐지되지 않음

[0232] 유사한 방법을 이용하여 다른 재표적화된 엔도펩티다제에 대한 동족 수용체를 가지는 세포를 포함하는 세포주를 재표적화된 엔도펩티다제 흡수에 대해 평가할 수 있다.

#### 실시예 II

[0235] 내생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 발현에 대한 후보 클론 세포주의 스크리닝

[0236] 1. 모 SiMa 세포주로부터 후보 클론 세포주의 단일 복용량 재표적화된 엔도펩티다제 스크리닝.

[0237] Zhu Hong et al.,의 동반 특허 출원, *Cell Lines Useful in Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A*

Activity Assay, 미국 특허 출원 번호 61/160,199는 *Ester Fernandez-Salas, et al.*, *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assay*, 미국 특허 출원 12/403,531에서 설명한 것과 같이, 모 SiMa 세포주로부터 유도된 클론 세포주를 설명하며, 이를 각각은 전문이 참고문헌에 통합된다. 이러한 클론 세포주들이 적합한 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수할 수 있었는지를 판단하기 위하여, ECL 샌드위치 ELISA 검정을 이용하여 각 세포주를 스크리닝하였다.

[0238] 재표적화된 엔도펩티다제로 처리된 용해물을 준비하기 위하여, 테스트될 세포주의 보존 배양물로부터 적당한 밀도의 세포를 100  $\mu$ L의 적합한 혈청 성장 배지 (표 1)를 포함하는 96-웰 조직 배양 플레이트의 웰에 하룻밤동안 도말하였다. 접종된 세포의 배지를 각 웰로부터 흡출시키고, 30 nM의 Noc/A 재표적화된 엔도펩티다제 또는 80 nM의 Dyn/A 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 새로운 배지로 대체하였다. 24 시간 항온처리 후, 성장 배지를 흡출하고, 각 웰을 200  $\mu$ L의 1×PBS으로 행굼으로써 세포를 세척하였다. 세포를 수확하기 위하여, 1×PBS를 흡출하였고, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100을 포함하는 30  $\mu$ L의 용해 완충액을 각 웰에 첨가하여 세포를 용해시켰고, 그리고 평판은 500 rpm에서 4°C, 30분간 회전하는 쉐이커에서 항온처리하였다. 평판은 4000 rpm에서 4°C 20분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 펠렛화하였고, 검출 단계를 실행하기 위하여 상청액은 포획 항체 피복된 96-웰 평판으로 이동하였다.

[0239]  $\alpha$ -SNAP-25<sub>197</sub> 포획 항체 용액을 준비하기 위하여, 하이브리도마 세포주 2E2A6 (실시예 XI)의 복수에 포함된  $\alpha$ -SNAP-25<sub>197</sub> 마우스 단클론성 항체는 표준 단백질 A 정제 프로토콜을 이용하여 정제하였다.

[0240]  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 용액을 준비하기 위하여, 제조업자의 지시에 따라 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 다클론성 항체 S9684 (Sigma, St. Louis, MO)는 루테늄(II)-트리스-비페리딘-(4-메틸솔포네이트) NHS 에스테르 라벨링 시약 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)에 콘쥬게이트하였다. 30  $\mu$ L의 중류수로 재구성된 MSD SULFO-TAG™ 저장 용액을 2 mg/mL  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체 200  $\mu$ L에 첨가하여 콘쥬게이션 반응을 실행하고, 그리고 어두운 상태, 실온에서 2시간 동안 반응물을 항온처리하였다. 라벨된 항체는 표준 스핀 컬럼 프로토콜을 이용하여 정제하였고, 표준 발색 단백질 검정을 이용하여 단백질 농도를 결정하였다. 리터당 몰 농도를 결정하기 위하여 분광광도계로를 이용하여  $\alpha$ -SNAP-25 항체/MSD SULFO-TAG™ 콘쥬게이트의 흡수도는 455 nm에서 측정하였다. 필요할 때까지 검출 항체 용액은 4°C에서 보관하였다. 사용안된 분획량은 -20°C에서 장기보관하였다.

[0241]  $\alpha$ -SNAP-25<sub>197</sub> 포획 항체를 포함하는  $\alpha$ -SNAP-25 고형 상 지지물을 제조하기 위하여, 대략 5  $\mu$ L의 적합한  $\alpha$ -SNAP-25<sub>197</sub> 단클론성 항체 용액 (1×PBS 중 20  $\mu$ g/mL)을 96웰의 MSD High Bind 평판의 각 웰에 첨가하고 그리고 용액에서 액체를 증발시키기 위하여 2-3시간 동안 생물학적으로 안정한 캐비넷에서 대기 전조시킨다. 차단된 평판을 밀봉하였고, 필요할 때까지 검출 항체 용액은 4°C에서 보관하였다.

[0242] ECL 샌드위치 ELISA에 의해 절단된 SNAP-25 생성물의 존재를 탐지하기 위하여, 2% Amersham 차단 시약 (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) 및 10% 염소 혈청 (VWR, West Ch에스테르, PA)을 포함하는 차단 완충액 150  $\mu$ L를 실온에서 2시간 동안 첨가함으로써 포획 항체 결합된 웰을 차단하였다. 차단 완충액을 흡출하였고, 재표적화된 엔도펩티다제로 처리한 세포로부터 25  $\mu$ L의 용해물을 각 웰에 첨가하였고, 평판을 하룻밤 동안 4°C에서 항온 처리하였다. 세포 용해물을 흡출하고, 각 웰을 200  $\mu$ L의 1×PBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)으로 3회 행궈냄으로써 평판 웰을 3회 세척하였다. 세척 후, 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트) 중 2% Amersham 차단 시약을 포함하는 5  $\mu$ g/mL  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 용액 25  $\mu$ L를 각 웰에 첨가하였고, 웰을 밀봉하고, 교반하면서 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다.  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 항온처리 후, 웰은 200  $\mu$ L의 1×PBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)을 이용하여 3회 세척하였다. 세척 후, 150  $\mu$ L의 1×Read 완충액 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)을 각 웰에 첨가하였고, SECTOR™ Imager 6000 Image Reader (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)를 이용하여 평판을 판독하였다. ECL 화상기를 이용하여 미가공 데이터를 수거하였다.

[0243] 결과에서 모 SiMa 세포주 그리고 클론 세포주 H10은 Noc/A 재표적화된 엔도펩티다제의 양호한 흡수를 보였다는 것을 알 수 있다(표 4). 추가로, 이러한 결과들은 많은 세포주가 Dyn/A 재표적화된 엔도펩티다제를 흡수하였다 는 것을 나타낸다 (표 4). 3가지 클론 세포주(1E11, AF4, 및 DC4)는 Dyn/A 재표적화된 엔도펩티다제의 양호한 흡수를 나타내었고; 11개 클론 세포주(1E3, 2D2, 2D6, 3D8, 5C10, 5F3, BB10, BF8, CG8, CG10, 및 DE7)는 Dyn/A 재표적화된 엔도펩티다제의 중간 수준의 흡수를 나타내었고; 그리고 세포주 (3B8, 2B9, CE6, YB8, 4C8, 2F5, AC9, CD6, DD10, YF5)들은 최소한의 Dyn/A 재표적화된 엔도펩티다제 흡수를 나타내었다. 이를 후보 세포주

의 일부를 상응하는 재표적화된 엔도펩티다제와 함께 완전한 복용량-반응 검정에서 테스트하였다.

표 4. 재-표적화된 Noc/A 및 Dyn/A을 이용하여 후보 클론성 세포주의 단일-약량 스크리닝

세포주	30 nM Noc/A 흡수	80 nM Dyn/A 흡수
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	+
CE6	NT	+
DD10	NT	+
YB8	NT	+
YF5	NT	+
1E3	NT	++
2D2	NT	++
2D6	NT	++
3D8	NT	++
5C10	NT	++
5F3	NT	++
BF8	NT	++

[0244]

표 4. 재-표적화된 Noc/A 및 Dyn/A을 이용하여 후보 클론성 세포주의 단일-약량 스크리닝

세포주	30 nM Noc/A 흡수	80 nM Dyn/A 흡수
BB10	NT	++
CG8	NT	++
CG10	NT	++
DE7	NT	++
1E11	NT	+++
AF4	NT	+++
DC4	NT	+++

NT: 테스트안됨

-: 흡수없음; +: 최소 흡수; ++: 중간 흡수; +++: 양호한 흡수

[0245]

2. 후보 세포주의 완전한 복용량 반응 스크리닝.

- [0247] 상기에서 확인된 확립된 세포주를 적합한 재표적화된 엔도펩티다제의 완전한 복용량 반응을 이용하여 평가하였다. 상이한 세포주의 세포들을 96-웰 평판에 도말하였고, 다양한 농도의 Noc/A (0, 0.14 nM, 0.4 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM, 및 100 nM) 또는 다양한 농도의 Dyn/A (0.017 nM, 0.05 nM, 0.15 nM, 0.45 nM, 1.4 nM, 4.1 nM, 12 nM, 37 nM, 111 nM, 333 nM, 및 1000 nM)에 24시간 동안 노출시켰다. 그 다음 재표적화된 엔도펩티다제를 함유하는 배지를 제거하였고, 새로운 완전한 배지로 대체하였다. 평판은 SNAP-25를 절단하도록 37°C, 5% CO<sub>2</sub>하에서 추가 24시간 동안 항온처리하였다. 세포는 용해 완충액에서 용해되었고(표 5), 찌꺼기를 제거하기 위하여 평판을 원심분리하였다. 용해물을 Western 블랏 검정 또는 샌드위치 ELISA에 이용하였다.
- [0248] Western 블랏 검정을 위하여, 실시예 I에서 설명한 것과 같이 고유의 SNAP-25 및 SNAP-25 절단 생성물 모두 존재하에서 시료를 검정하였다.
- [0249] 샌드위치 ELISA를 위하여, 2E2A6 단클론성 항체가 피복된 ELISA 평판을 실온에서 2시간 동안 150 $\mu$ l 차단 완충액으로 차단하였다. 차단 완충액을 제거한 후, 25 $\mu$ l의 세포 용해물을 각 웰에 첨가하였고, 4°C에서 2시간 동안 평판을 항온처리하였다. PBS-T로 평판을 3회 세척하고, 그리고 PBS-T 중 2% 차단 시약내 5  $\mu$ g/mL 농도의 SULFO-TAG NHS-에스테르 라벨된 검출 항-SNAP25 pAb 항체 25 $\mu$ l를 웰의 바닥 코너에 첨가하였다. 평판을 밀봉하였고, 실온에서 1시간 동안 교반 후, PBS-T로 3회 세척하였다. 세척이 완료된 후, 웰당 150 $\mu$ l의 1× Read 완충액을 첨가하였고, SI6000 Image 판독기에서 평판을 판독하였다. 테스트된 각 세포주의 민감도를 결정하기 위하여, 각 세포주의 EC<sub>50</sub> 값을 계산하였다. 표 5에 Noc/A 재표적화된 엔도펩티다제에 대한 이들 값을 요약하였다. PC12 및 클론 AF4에서만 재표적화된 엔도펩티다제 Dyn/A의 완전한 복용량 반응을 실시하였다. 두 가지 경우에서, 이 검정은 상위 점근선에 도달하지 못하였고, EC<sub>50</sub>을 계산할 수 없었다. 이들 두 세포주에서 AF4 클론에 대한 신호를 생산하는 더 낮은 복용량은 12 nM이었다.

표 5. 재-표적화된 Noc/A 및 Dyn/A를 이용하여 후보 세포주의 충분한-약량 스크리닝				
세포주	설명	원천	EC <sub>50</sub> Noc/A 흡수	EC <sub>50</sub> Dyn/A 흡수
AGN P33	인간 신경아세포종	—	5-10 nM	NT
BE(2)-C	인간 신경아세포종	ATCC CRL-2268	NT	NT
N18TG2	마우스 신경아세포종	DSMZ ACC 103	NT	NT
N18	마우스 신경아세포종	ECACC 88112301	>100 nM	NT
ND3	마우스 신경아세포종/1차 신생 쥐 DRG 하이브리드	ECACC 92090901	NDA	NT
ND7/23	마우스 신경아세포종/1차 쥐 DRG 하이브리드	ECACC 92090903	>100 nM	NT
ND8	마우스 신경아세포종/1차 신생 쥐 DRG 하이브리드	ECACC 92090904	NDA	NT
ND15	마우스 신경아세포종/1차 신생 쥐 DRG 하이브리드	ECACC 92090907	>100 nM	NT
Neuro-2a	마우스 신경아세포종	ATCC CCL-131	30 nM	NT
NG108-15	마우스 신경아세포종/쥐 신경교종 하이브리드	ECACC 88112302	NT	NT
PC12	쥐 크롬친화세포종	ATCC CRL-1721	NT	>1000 nM
SH-SY5Y	인간 신경아세포종	ATCC CRL-2266	NT	NT
SiMa	인간 신경아세포종	DSMZ ACC 164	30 nM	NT
SiMa 클론 AF4	인간 신경아세포종	—	NT	>300 nM
SiMa 클론 H1	인간 신경아세포종	—	>100 nM	NT
SiMa 클론 H10	인간 신경아세포종	—	20 nM	NT
SK-N-BE(2)-C	인간 신경아세포종	ATCC CRL-2271	NT	NT
SK-N-DZ	인간 신경아세포종	ATCC CRL-2149	0.5-2 nM	NT
SK-N-F1	인간 신경아세포종	ATCC CRL-2142	>100 nM	NT
SK-N-SH	인간 신경아세포종	ECACC 86012802	>100 nM	NT

NT: 테스트 안됨

NDA: 이러한 세포주에서 검출 가능한 양의 SNAP-25가 탐지되지 않음

[0250]

유사한 방법을 이용하여, 다른 재표적화된 엔도펩티다제에 대해 동족 수용체를 가지는 세포를 포함하는 클론 세포주를 스크리닝하고, 재표적화된 엔도펩티다제 흡수에 대해 평가할 수 있다.

[0252]

실시예 III

[0253]

후보 세포주에서 재표적화된 엔도펩티다제 흡수에 대한 성장 조건들의 평가

[0254]

다음의 실시예는 확립된 세포주에서 재표적화된 엔도펩티다제 흡수를 최대화하는 배양 조건, 성장 및 분화를 어떻게 판단하는지를 설명한다.

[0255]

1. 후보 세포주에서 재표적화된 엔도펩티다제 흡수에 대한 세포 분화 및 영양요구성 인자들의 효과

[0256]

세포 분화 또는 성장 배지에 영양요구성 인자들의 존재가 재표적화된 엔도펩티다제 흡수를 개선시키는지를 판단하기 위하여, Noc/A의 양호한 흡수를 나타내는 세포주들을 상이한 배지 조성물로 테스트하였다. 테스트될 SiMa P>30 세포주의 보존 배양물로부터 적당한 밀도의 세포를 RPMI1640, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민을 포함하는 무혈청 배지 100 $\mu$ l에 B27 및 N2가 보충된, 또는 RPMI1640, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민을 포함하는 무혈청 배지 100 $\mu$ l에 B27, N2, 및 NGF (신경 성장 인자, 100 ng/mL)가 보충된 96-웰

조직 배양 평판의 웰에 도말하였다. 이들 세포들을 세포가 분화될 때까지(성장 억제 및 신경 돌기 연장과 같은 표준의 그리고 일반적인 형태학적 기준으로 평가하였을 때; 대략 1 내지 2일 소요), 5% 이산화탄소 하에서 37°C 배양기에서 배양하였다. 기준으로, 테스트될 세포주의 보존 배양물로부터 적당한 밀도의 세포를 NGF (100 ng/mL)와 함께, 또는 이를 포함하지 않은 100 $\mu$ l의 적합한 성장 배지(표 1)를 포함하는 96웰 조직 배양 평판의 웰에 도말하였다. 이러한 미분화된 기준 세포는 세포가 원하는 밀도에 도달할 때까지(대략 18 내지 24 시간), 5% 이산화탄소 하에서 37°C 배양기에서 배양하였다. 분화된 배양물 그리고 미분화된 기준 배양물 모두로부터 배지를 각 웰로부터 흡출시키고, Noc/A가 포함안된(0nM (처리안된 시료) 또는 다양한 농도의 Noc/A (0.14nM, 0.4nM, 1.23nM, 3.7nM, 11.1nM, 33.3nM, 및 100 nM)를 포함하는 새로운 배지로 대체하였다. 처리 24시간 후, 세포를 세척하였고, 생산되는 SNAP25<sub>197</sub> 양을 증가시키기 위하여 재표적화된 엔도펩티다제 없는 배지에서 24시간 동안 항온처리하였다. 그 다음 세포를 세척하였고, 실시예 II에서 설명한 것과 같이, ECL 샌드위치 ELISA 검정을 위하여 수확하였다.

[0257]

영양요구성 인자들의 효과는 SK-N-DZ 세포주에서 테스트하였다. SK-N-DZ 세포를 72시간 동안 8가지 상이한 SM 배지(표 6)에서 각 웰당 25,000개 세포 밀도로, 폴리-D-리신 피복된 96개 웰 평판에 도말하였다. 세포를 0, 0.3 nM, 3 nM, 및 30 nM의 복용량에서 Noc/A와 함께 동일한 8가지 배지로 처리하였다. 처리후 24 시간 후, 세포를 세척하였고, 생산되는 SNAP-25<sub>197</sub> 양을 증가시키기 위하여 재표적화된 엔도펩티다제 없는 배지에서 24시간 동안 항온처리하였다. 그 다음 세포를 세척하였고, 실시예 I에서 설명한 것과 같이, Western 블랏 검정을 위하여 수확하였다.

[0258]

분화는 SiMa >P30 세포주에서 Noc/A 흡수에 효과가 없었지만, SK-N-DZ 세포주에서는 흡수를 개선시킨 것 같았다. 기준 배지는 최적의 조합인 영양요구성 인자들 N2 및 B27를 포함하는 RPMI1640과 함께 SK-N-DZ 세포주에서 Noc/A 흡수에 상당한 효과를 가졌다. 배지에서 NGF의 존재는 테스트된 두 가지 세포주에서 흡수를 개선시키지 못한 것 같았다.

표 6. 후보 세포주의 Noc/A 흡수에서 영양성 인자들과 세포 분화의 효과.

미분화된	분화된	EC <sub>50</sub> Noc/A 흡수	
		AGN P33	SK-N-DZ
DMEM, 10% FBS	—	NT	> 30 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27	—	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, NGF	—	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, RA	—	NT	>30 nM
RPMI1640, 10% FBS	—	NT	10 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27	—	7.2 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, NGF	—	9.1 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, RA	—	NT	10 nM
—	RPMI1640, N2, B27	10.2 nM	1 nM
—	RPMI1640, N2, B27, NGF	9.8 nM	0.6 nM

NGF: 신경 성장 인자; RA: 레티노산

NT: 테스트안됨

[0259]

유사한 방법을 이용하여, 다른 재표적화된 엔도펩티다제에 대하여 동족 수용체를 가지는 세포를 포함하는 클론 세포주의 성장 및 분화 조건들도 평가할 수 있다.

[0261]

실시예 IV

외생적 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 발현하는 확립된 세포주의 개발

[0263]

다음의 실시예는 재표적화된 엔도펩티다제에 대한 외생적 수용체를 발현하는 확립된 세포주를 어떻게 만드는지를 설명한다.

[0264]

1. 후보 세포주를 포함하는 세포로 표적 수용체의 형질감염.

[0265]

재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A는 오피오이드 수용체 유사-1 (ORL-1)의 천연 리간드인 노씨셉틴 표적화 도메인을 포함한다. ORL-1의 오픈 리딩 프레임을 포함하는 발현 구조체를 얻기 위하여, 발현 구조체 pReceiver-M02/ORL-1은 GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD)에서 구하였다.

[0266]

대안적으로, 표준 과정(BlueHeron® Biotechnology, Bothell, WA)을 이용하여 ORL-1 아미노산 서열 (예컨대, 서열번호: 25 또는 서열번호: 26의 아미노산 서열)에 근거한 폴리뉴클레오티드 분자를 합성할 수 있다. 20 내지 50개 염기 길이의 올리고뉴클레오티드를 표준 포스포르아미디트 합성을 이용하여 합성한다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 이중 표준 듀플렉스로 하이브리드될 수 있고, 전장의 폴리뉴클레오티드 분자를 어셈블리하기 위하여 듀플렉스는 서로 결찰된다. 이러한 폴리뉴클레오티드 분자는 표준 분자 생물학 방법을 이용하여 pUCBHB1 벡터의 SmaI 부위에 클론시켜 pUCBHB1/ORL-1를 만든다. Big Dye Terminator™ Chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 및 ABI 3100 서열화기(Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 서열화함으로써 합성된 폴리뉴클레오티드 분자를 확인한다. 원활 경우, 대장균(*Escherichia coli*) 균주에서 발현을 개선시키기 위하여 ORL-1 아미노산 서열 (예컨대, 서열번호: 25 또는 서열번호: 26의 아미노산 서열)에 기반을 둔 발현 최적화된 폴리뉴클레오티드 분자를 합성할 수 있다. ORL-1를 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자는 다음을 위하여 변형될 수 있다: 1) 대장균(*Escherichia coli*) 균주의 고유 폴리뉴클레오티드 분자들에 존재하는 전형적인 동의 코돈을 포함하도록; 2) 대장균(*Escherichia coli*) 균주에서 볼 수 있는 고유 폴리뉴클레오티드 분자의 평균 G+C 함량에 상당히 더 근접한 G+C 함량을 포함하도록; 3) 폴리뉴클레오티드 분자에서 볼 수 있는 폴리모노뉴클레오티드 부분을 감소시키도록; 및/또는 4) 폴리뉴클레오티드 분자내에서 볼 수 있는 내부 조절 또는 구조적 부위를 제거하도록. 예컨대, *Lance E. Steward et al., Optimizing Expression of Active Bpti;inum Toxin Type A*, 미국 특허공개 2008/0057575 (2008년 3월 6일); 그리고 *Lance E. Steward et al., Expression of Active Bpti;inum Toxin Type E*, 미국 특허공개 2008/0138893 (2008년 6월 12일). 서열 최적화가 완료된 후, 표준 포스포르아미디트 합성을 이용하여 20 내지 50개 염기 길이의 올리고뉴클레오티드를 합성한다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 이중 표준 듀플렉스로 하이브리드될 수 있고, 전장의 폴리뉴클레오티드 분자를 어셈블리하기 위하여 듀플렉스는 서로 결찰된다. 이러한 폴리뉴클레오티드 분자는 표준 분자 생물학 방법을 이용하여 pUCBHB1 벡터의 SmaI 부위로 클론되어 pUCBHB1/ORL-1가 만들어진다. DNA 서열화에 의해 합성된 폴리뉴클레오티드 분자를 확인한다. 원하는 경우, 예컨대, 효모 균주, 곤충 세포계 또는 포유동물 세포주와 같은 상이한 유기체에 발현 최적화를 실시할 수 있다. 예컨대, *Steward*, 미국 특허공개 2008/0057575, *supra*, (2008); 및 *Steward*, 미국 특허공개 2008/0138893, *supra*, (2008). ORL-1을 인코드하는 예시적인 폴리뉴클레오티드 분자들은 서열번호: 61 및 서열번호: 62를 포함한다.

[0267]

ORL-1을 인코드하는 발현 구조체를 제작하기 위하여, 1) ORL-1의 오픈 리딩 프레임을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자를 잘라내고; 그리고 2) 이 폴리뉴클레오티드 분자를 pcDNA3 벡터(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)에 작동가능하도록 연결시킬 수 있는 제한 엔도뉴클레아제로 pUCBHB1/ORL-1 구조체를 절단할 것이다. 이 삽입물은 T4 DNA 리게이즈 과정을 이용하여 pcDNA3 벡터 안으로 하위 클론시키고, 이 벡터는 적합한 제한 엔도뉴클레아제로 절단하여 pcDNA3/ORL-1을 생성시킨다. 전기 천공 방법을 이용하여 결찰 혼합물을 전기-컴피턴트 대장균 BL21(DE3) 세포 (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD)안으로 형질도입시키고, 이 세포를 50 $\mu$ g/mL의 암피실린을 포함하는 1.5% Luria-Bertani 한천 평판(pH 7.0)상에 도말하고, 하룻밤 성장을 위하여 37°C 배양기내에 둘 것이다. 발현 구조체를 포함하는 세균은 암피실린 저항성 콜로니로 확인할 수 있을 것이다. 후보 구조체는 알칼리 용해 플라스미드 미니-준비 과정을 이용하여 분리할 것이며, 삽입물의 존재와 방향을 확인하기 위하여 제한 엔도뉴클라제 절단 매핑으로 검정할 것이다. 이러한 클로닝 전략으로 ORL-1을 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 pcDNA3 발현 구조체를 만들 것이다.

[0268]

재표적화된 엔도펩티다제 Dyn/A는  $\kappa$ -오피오이드 수용체 (KOR)의 천연 리간드인 디노르핀 표적화 도메인을 포함한다. ORL-1의 오픈 리딩 프레임을 포함하는 발현 구조체를 얻기 위하여, 발현 구조체 pReceiver-M02/KOR-1은 GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD)에서 구하였다. 대안으로, 발현 구조체 pcDNA3.1/KOR을 만들기 위하여 상기에서 설명한 것과 유사한 방법을 이용하여 KOR을 인코드하는 발현 구조체를 합성하고 서브클로닝할 수 있다. 예시적인 KOR 아미노산 서열은 서열번호: 29 및 서열번호: 30을 포함하며; KOR을 인코드하는 예시적인 폴리뉴클레오티드 분자들은 서열번호: 65 및 서열번호: 66을 포함한다.

[0269]

기타 재-표적 엔도펩티다제 수용체를 인코드하는 발현 구조체, 예컨대, pcDNA3.1/DOR 또는 pcDNA3.1/MOR, pcDNA3.1/갈라닌 수용체 1, pcDNA3.1/갈라닌 수용체 2, 또는 pcDNA3.1/갈라닌 수용체 3을 만들기 위하여 유사한 클로닝 전략을 이용할 수 있다. 예시적인 DOR 아미노산 서열은 서열번호: 27 및 서열번호: 28을 포함하고; 예시적인 MOR 아미노산 서열은 서열번호: 31을 포함하고; 예시적인 갈라닌 수용체 1 아미노산 서열은 서열번호: 136, 서열번호: 137, 및 서열번호: 138을 포함하고; 예시적인 갈라닌 수용체 2 아미노산 서열은 서열번호: 139를 포함하고; 그리고 예시적인 갈라닌 수용체 3 아미노산 서열은 서열번호: 140을 포함한다. DOR을 인코드하는 예시적인 폴리뉴클레오티드 분자들은 서열번호: 63 및 서열번호: 64을 포함하고; MOR을 인코드하는 예시적인 폴

리뉴클레오티드 분자들은 서열번호: 67을 포함하고; 갈라닌 수용체 1을 인코드하는 예시적인 폴리뉴클레오티드 분자들은 서열번호: 141, 서열번호: 142, 및 서열번호: 143을 포함하고; 갈라닌 수용체 2를 인코드하는 예시적인 폴리뉴클레오티드 분자들은 서열번호: 144를 포함하고; 그리고 갈라닌 수용체 3을 인코드하는 예시적인 폴리뉴클레오티드 분자들은 서열번호: 145를 포함한다.

[0270] 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 인코드하는 발현 구조체를 도입하기 위하여, 재표적화된 엔도펩티다제 수용체를 인코드하는 발현 구조체를 세포주에 형질감염시켰다. 오피오이드 또는 오피오이드 유사 수용체로 세포주를 형질감염시키기 위하여,  $T_{175}$  콜라겐 IV 피복된 플라스크에  $1 \times 10^7$ 의 세포 밀도로 접종하고, 세포가 원하는 밀도에 도달할 때까지 5% 이산화탄소 하에서 37°C 배양기에서 성장시켰다. 실온에서 5분간 항온처리된 200 $\mu$ l의 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 포함하는 OPTI-MEM Reduced Serum Medium 4ml를 20 $\mu$ g의 pReceiver-M02/ORL-1 또는 20 $\mu$ g의 pReceiver-M02/KOR-1을 포함하는 OPTI-MEM Reduced Serum Medium 4ml에 첨가하여 4.2ml의 형질감염 용액을 준비한다. 이러한 형질감염은 대략 20분간 실온에서 항온처리하였다. 배지는 8 mL의 새로운 무혈청 그리고 무-항생제 배지로 대체하였고, 형질감염 용액을 세포에 첨가하였다. 그 다음 대략 16-18 시간 동안 5% 이산화탄소하에서 37°C 배양기내에서 세포를 배양하였다. 형질감염 배지는 새로운 성장 배지로 대체하였고, 그리고 5% 이산화탄소하에서 37°C 배양기내에서 세포를 배양하였다. 24시간 후, 성장 배지는 성장 배지내 1mg/ml의 농도로 항생제 G418를 포함하는 새로운 성장 배지(선택 배지)로 대체하였고, 세포를 7일간 배양하였다. 선택 배지는 총 4주간 매주 교체하였다(또는 90% 세포가 죽었고, 그리고 매주 배지 교체 동안 죽은 세포를 제거하였다).

[0271] ORL-1 수용체로 형질감염된 후보 세포주는 SiMa >P30, ND15, ND7, NG108-T15 및 SK-N-DZ 세포주를 포함하였다. KOR-1 수용체로 형질감염된 후보 세포주는 SiMa, SiMa >P30, ND15, ND7, NG108-T15 및 SK-N-DZ 세포주를 포함하였다. 형질감염된 NG108-T15 세포는 G418에서 선별 생존하지 못하였다.

[0272] 2. 재표적화된 엔도펩티다제 분자들을 이용한 안정한 형질감염된 세포주의 단일 복용량 및 복용량 반응 스크리닝.

[0273] 화학물로 처리 전, 기존 선별로부터 형질감염된 그리고 선별된 후보 세포주의 세포들은 96-웰 폴리-D-리신 또는 콜라겐 IV 피복된 평판에서 N2 및 B27 보충물, 그리고 NGF (50-100 ng/ml)을 포함하는 배지 RPMI1640에서 웰당  $1 \times 10^5$  개의 세포 밀도로 20  $\pm$  4 시간동안 도말하였다. 그 다음, ORL-1 수용체로 안정적으로 형질감염된 세포들은 동일 배지에서 30 nM 농도의 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A로 24  $\pm$  2 시간 동안 처리하였고, 단 SK-N-DZ 세포주는 10 nM 농도에서 처리되었다. 세포를 120 $\mu$ l 용해 완충액에서 용해하였고, 그리고 실시예 I에서 상술한 것과 같이 실행된 Western 블랏 검정을 위하여 20  $\mu$ l의 용해물은 2 $\times$  SDS 완충액에 혼합하였다. 모든 세포주는 ORL-1 수용체로 형질감염되었을 때, 재표적화된 Noc/A 화합물의 흡수 증가를 나타내었다(표 7).

표 7. 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A로 테스트된 ORL-1으로 안정적으로 형질감염된 세포주들			
세포주	설명	30 nM에서 절단된 SNAP25의 비율%	
		형질감염 안된	형질감염된
AGN P33	인간 신경아세포종	20%	40%
SK-N-DZ	인간 신경아세포종	25% @ 10 nM	40% @ 10 nM
ND7	마우스 신경아세포종 및 쥐 DRG 세포 하이브리드	10%	42%
ND15	마우스 신경아세포종 및 쥐 DRG 세포 하이브리드	8%	20%
NG108-T15	마우스 신경아세포종/쥐 신경교종 하이브리드	생존 세포 없음	생존 세포 없음

[0274]

[0275] 화학물로 처리 전, 기존 선별로부터 형질감염된 그리고 선별된 후보 세포주의 세포들은 96-웰 폴리-D-리신 또는 콜라겐 IV 피복된 평판에서 10% FBS 및 N2 그리고 B27 보충물을 포함하는 배지 RPMI1640에서 웰당  $1 \times 10^5$  개의 세포 밀도로 20  $\pm$  4 시간동안 도말하였다. 그 다음, KOR-1 수용체로 안정적으로 형질감염된 세포들은 동일 배지에서 100 nM 농도의 재표적화된 엔도펩티다제 Dyn/A로 24  $\pm$  2 시간 동안 처리하였다. 세포를 120 $\mu$ l 용해 완충액에서 용해하였고, 실시예 I에서 상술한 것과 같이 실행된 Western 블랏 검정을 위하여 20  $\mu$ l의 용해물은 2 $\times$

SDS 완충액에 혼합하였다. 모든 세포주는 인간 KOR-1 수용체로 형질감염되었을 때, 재표적화된 Dyn/A 화합물의 흡수 증가를 나타내었다.

**[0276] 3. 연속 희석에 의해 높은 민감도를 나타내는 안정적으로 형질감염된 클론 세포주의 선별**

다음의 실시예는 재표적화된 엔도펩티다제 작용에 민감한 또는 재표적화된 엔도펩티다제 흡수 능력을 보유한 안정적으로 형질감염된 확립된 세포주로부터 클론 세포를 어떻게 확인하는지를 설명한다.

상기에서 설명하고 있는 선별된 세포의 단일 세포 클로닝을 위하여, 제한된 희석 세포주 클로닝 방법을 이용하였다. 세포를 트립신처리하고, 카운트하고,  $100\mu\text{l}$ 당 0.5-1개 세포를 얻기 위하여 희석하였고, 폴리-D-리신 피복된 96-웰의 5개 평판의 웰당  $100\mu\text{l}$ 의 선별 배지에 도말하였다. 웰의 바닥에 콜로니가 형성될 때까지 세포를 2주 이상 배양하였다. 단일 세포로부터 기인된 양성 콜로니를 표시하였다. 현미경 카메라를 이용하여 단일-세포 유도된 클론의 사진을 찍었다. 단일 클론이 있는 웰의 세포들을 추가 1주간 성장시키고, 클로닝 시작후 약 4주에 24웰 평판으로 옮겼다.

클론 선별을 위하여, 양성 클론을 스크리닝하는데 이용되는 주요 매개변수는 고유 SNAP-25 및 절단된 SNAP-25를 모두 인지하는 항체를 이용한 Western 블랏 검정을 이용하여 측정된, SNAP-25 절단의 최대 양이다. 클론 ORL-1을 과다발현하는 클론은 가능한 충분한 세포를 이용할 수 있게 된 직후, 10 nM 및 30 nM 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A으로 테스트하였다(표 8). KOR-1을 과다발현하는 클론들은 100 nM 재표적화된 엔도펩티다제 Dyn/A으로 하룻밤동안 테스트하였다(표 9). 게다가, KOR-1을 과다발현하는 클론들은 실시예 I에서 설명한 것과 같이, 디노르핀 결합 검정으로 테스트하였다.

표 8. 재-표적화된 엔도펩ти다제 Noc/A로 테스트된 ORL-1으로 안정적으로 형질감염된 후보 클론  
세포주의 단일-약량스크리닝

세포주	클론 번호	10 nM Noc/A 흡수	30 nM Noc/A 흡수	2차 스크리닝 @ 1 nM 절단된 %)
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
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

[0280]

표 8. 재-표적화된 엔도펩ти다제 Noc/A로 테스트된 ORL-1으로 안정적으로 형질감염된 후보 클론  
세포주의 단일-약량스크리닝

세포주	클론 번호	10 nM Noc/A 흡수	30 nM Noc/A 흡수	2차 스크리닝 @ 1 nM 절단된 %)
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
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

표 8. 재-표적화된 엔도펩티다제 Noc/A로 테스트된 ORL-1으로 안정적으로 형질감염된 후보 클론  
세포주의 단일-약량 스크리닝

세포주	클론 번호	10 nM Noc/A 흡수	30 nM Noc/A 흡수	2차 스크리닝 @ 1 nM 절단된 %)
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: 결정안됨; NT: 테스트안됨

-: 흡수없음; +: 최소 흡수; ++: 중간 흡수; +++: 양호한 흡수

표 9. 재-표적화된 엔도펩티다제 Dyn/A를 이용하여 KOR-1으로 안정적으로 형질감염된 후보 클론 세포주의 단일-약량스크리닝

세포주	클론 번호	100 nM Dyn/A 흡수	100 nM Dyn 결합	미래 테스트에 선택됨
SiMa	2	-	-	안됨
SiMa	6	+	+	안됨
SiMa	8	+	+	안됨
SiMa	12	+++	++	선택됨
SiMa	14	++	++	안됨
SiMa	20	+	++	안됨
SiMa	25	++	++	안됨
AGN P33	1	+++	+	선택됨
AGN P33	3	++	+	안됨
AGN P33	5	++	+	선택됨
AGN P33	6	++	+	안됨
AGN P33	7	+++	+	선택됨
AGN P33	8	++	+	선택됨
AGN P33	9	+++	+	선택됨
AGN P33	10	+++	+	선택됨
AGN P33	11	++	+	안됨
AGN P33	12	+++	+	선택됨
AGN P33	14	+	+	안됨
AGN P33	16	++	+	안됨
AGN P33	17	+++	+	선택됨
AGN P33	21	+	++	안됨
ND7	A1	+	+	안됨
ND7	A2	-	-	안됨
ND7	A3	-	-	안됨
ND7	A4	-	-	안됨
ND7	A5	-	-	안됨

[0283]

표 9. 재-표적화된 엔도펩티다제 Dyn/A를 이용하여 KOR-1으로 안정적으로 형질감염된 후보 클론  
세포주의 단일-약량스크리닝

세포주	클론 번호	100 nM Dyn/A 흡수	100 nM Dyn 결합	미래 테스트에 선택됨
ND7	A6	-	-	안됨
ND7	A7	-	-	안됨
ND7	A8	-	-	안됨
ND7	A9	-	-	안됨
ND7	A10	-	-	안됨
ND7	A11	-	-	안됨
ND7	A12	+++	+++	선택됨
ND7	B1	-	-	안됨
ND7	B2	-	-	안됨
ND7	B3	-	-	안됨
ND7	B4	-	-	안됨
ND7	B5	+	+	선택됨
ND7	B6	-	-	안됨
ND7	B7	-	-	안됨
ND7	B8	-	-	안됨
ND7	B9	-	-	안됨
ND7	B10	-	-	안됨
ND7	B11	-	-	안됨
ND7	B12	-	-	안됨
ND7	C1	-	-	안됨
ND7	C2	-	-	안됨
ND7	C3	-	-	안됨
ND7	C4	-	-	안됨
ND7	C5	-	-	안됨
ND7	C6	+	+	안됨
ND7	C7	-	-	안됨
ND7	C8	-	-	안됨

표 9. 재-표적화된 엔도펩ти다제 Dyn/A 를 이용하여 KOR-1 으로 안정적으로 형질감염된 후보 클론  
세포주의 단일-약량스크리닝

세포주	클론 번호	100 nM Dyn/A 흡수	100 nM Dyn 결합	미래 테스트에 선택됨
ND7	C9	-	-	안됨
ND7	C10	-	-	안됨
ND7	C11	-	-	안됨
ND7	C12	-	-	안됨
ND7	D1	-	-	안됨
ND7	D2	-	-	안됨
ND7	D3	-	-	안됨
ND7	D4	-	-	안됨
ND7	D5	-	-	안됨
ND7	D6	++	++	선택됨
ND7	D7	++	++	선택됨
ND7	D8	-	-	안됨
ND7	D9	-	-	안됨
ND7	D10	-	-	안됨
ND7	D11	-	-	안됨
ND7	D12	-	-	안됨
ND7	E1	-	-	안됨
ND7	E2	-	-	안됨
ND7	E3	-	-	안됨
ND7	E4	-	-	안됨
ND7	E5	-	-	안됨
ND7	E6	-	-	안됨
ND7	E7	-	-	안됨
ND7	E8	-	-	안됨
ND7	E9	-	-	안됨
ND7	E10	-	-	안됨
ND7	E11	-	-	안됨

표 9. 재-표적화된 엔도펩티다제 Dyn/A를 이용하여 KOR-1으로 안정적으로 형질감염된 후보 클론 세포주의 단일-약량 스크리닝

세포주	클론 번호	100 nM Dyn/A 흡수	100 nM Dyn 결합	미래 테스트에 선택됨
ND7	E12	++	++	선택됨
ND7	F1	-	-	안됨
ND7	F2	-	-	안됨
ND7	F3	-	-	안됨
ND7	F4	-	-	안됨
ND15	A1	-	-	안됨
ND15	A2	-	-	안됨
ND15	A3	+	-	안됨
ND15	A4	+	-	안됨
ND15	A5	-	-	안됨
ND15	A6	++	-	안됨
ND15	A7	++	-	안됨
ND15	A8	++	-	안됨
ND15	A9	+	-	안됨
ND15	A10	+	-	안됨
ND15	A11	-	-	안됨
ND15	A12	-	-	안됨
ND15	B1	-	-	안됨
ND15	B2	++	-	안됨
ND15	B3	-	-	안됨
ND15	B4	-	-	안됨
ND15	B5	+++	-	유
ND15	B6	+	-	안됨
ND15	B7	-	-	안됨
ND15	B8	-	-	안됨
ND15	B9	-	-	안됨
ND15	B10	-	-	안됨

표 9. 재-표적화된 엔도펩티다제 Dyn/A를 이용하여 KOR-1으로 안정적으로 형질감염된 후보 클론 세포주의 단일-약량 스크리닝

세포주	클론 번호	100 nM Dyn/A 흡수	100 nM Dyn 결합	미래 테스트에 선택됨
ND15	B11	-	-	안됨
ND15	B12	-	-	안됨
ND15	C1	-	-	안됨
ND15	C2	+++	+	선택됨
ND15	C3	-	-	안됨
ND15	C4	-	-	안됨
ND15	C5	+	NT	안됨
ND15	C6	+++	NT	선택됨
SK-N-DZ	#11	NT	NT	ND

ND: 결정안됨; NT: 테스트안됨

-: 흡수없음; +: 최소 흡수; ++: 중간 흡수; +++: 양호한 흡수

[0287]

[0288]

#### 4. 재표적화된 엔도펩티다제를 이용하여 안정적으로 형질감염된 클론 세포주의 복용량 반응 스크리닝.

[0289]

재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A에 대한 민감도 및 효능을 판단하기 위하여, 단락 3에서 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A의 양호한 흡수를 보이는 안정적으로 형질감염된 후보 클론 세포주들을 완전한 복용량 반응 실험으로 테스트하였다. 화합물 처리 전, 96-웰 폴리-D-리신 또는 콜라겐 IV 피복된 평판에서 N2 및 B27 보충물, 그리고 NGF (50–100 ng/mL)을 포함하는 배지 RPMI1640으로  $1 \times 10^5$ 의 세포 밀도로 20 ± 4 시간 동안 세포를 도말하였다. 모 AGN P33 세포주와 ND7 클론 세포주의 세포들을 동일한 배지에서 24시간 동안 0, 0.03 nM, 0.08 nM, 0.14 nM, 0.23 nM, 0.37 nM, 0.74 nM, 0.22 nM, 0.67 nM, 및 20 nM의 Noc/A으로 처리하였고, 그리고 SNAP-25의 절단을 허용하는 재표적화된 엔도펩티다제 없는 배지에서 24시간 동안 항온처리하였다. 모 AGN P33 세포주의 세포는 또한 동일한 배지에서 24시간 동안 0, 0.03 nM, 0.08 nM, 0.14 nM, 0.23 nM, 0.37 nM, 0.74 nM, 0.22 nM, 0.67 nM, 및 20 nM의 Noc/A으로 처리하였고, 그리고 SNAP-25의 절단을 허용하는 재표적화된 엔도펩티다제 없는 배지에서 24시간 동안 항온처리하였다. 배지를 제거하였고, 세포를 세척하였고, 그리고 실시예 III에서 상술한 것과 같이, ECL 샌드위치 ELISA 검정을 위하여 세포를 용해하였다. AGN P33 모 및 ORL-1 수용체로 안정적으로 형질감염된 및 클론 세포주에 대한 데이터는 표 10에 요약하였다. 클론 #2 및 #6은 모 세포주보다 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A에 대하여 더 민감하고 더 나은 효능을 가진 것으로 설명되었다. 더욱이, 새로운 클론 세포주의 증가된 민감도는 복용량-반응에 더 낮은 용도를 사용할 수 있도록 하며, 새로운 클론 세포주들이 더 민감하다는 것을 확인시킨다.

표 10. AGN P33 배경 세포주에서 ORL-1을 과다발현하는 가장 민감한 3가지 클론의 EC<sub>50</sub> 값과 신호-대 노이즈 비율(S/N)의 요약 표.

	부모	클론 2	클론 6	클론 8
S/N 비율 0.03 nM/BK		41	26	1.8
S/N 비율 20 nM/BK		259	522	33.1
S/N 비율 0.14 nM/BK				
S/N 비율 100 nM/BK				
EC <sub>50</sub> (nM)	6.8 ± 1.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.07	0.3 ± 0.2

[0290]

[0291]

ND7 모 및 ORL-1 수용체로 안정적으로 형질감염된 및 클론 세포주에 대한 데이터는 표 11에 요약하였다. 모든 테스트된 클론은 모 세포주 ND7보다 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A에 대하여 더 민감하고 더 나은 효능을 가진 것으로 설명되었다. 클론 4B7, 1E6, 및 1C11은 10pM 미만의 EC<sub>50</sub> 값으로 가장 민감하였다.

표 11. ND7 배경 세포주에서 ORL-1을 과다발현하는 가장 민감한 63가지 클론의 EC<sub>50</sub> 값과 신호-대 노이즈 비율(S/N)의 요약 표.

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

[0292]

[0293]

표 12는 상이한 배경에서 ORL-1 수용체를 과다발현하는 클론 세포주의 생성 및 테스트로 수득한 결과를 요약하였다.

표 12 : Noc/A으로 테스트된 인간 ORL-1 수용체를 과다발현시키는 클론 세포주의 요약

배경 세포주	종	Noc/A의 완전한 약량으로 테스트된 안정적인 세포주	EC <sub>50</sub> (nM)
AGN P33	인간 신경아세포종	3 개	0.6-2.5
ND7	주 신경아세포종 및 DRG 하이브리드	6 개	3.7-8
SK-N-DZ	인간 신경아세포종	없음 (추가 연구를 위하여 선택된 7 개 안정적인 클론)	N/A

[0294]

실시예 V

모 SK-N-DZ 세포주로부터 클론 세포주의 개발.

다음 실시예는 엑소사이토시스의 재표적화된 엔도펩티다제 억제에 민감한 또는 재표적화된 엔도펩티다제 흡수 능력을 보유한 모의 확립된 세포주로부터 클론 세포를 어떻게 확인하는지를 설명한다.

### 1. 클론 세포주의 분리.

SK-N-DZ 세포주의 특징화 과정 동안, 이러한 확립된 세포주를 포함하는 세포는 최소한 5가지 상이한 세포 표현형으로 구성된다는 것을 알았다. 이러한 표면형적으로-별개의 세포 유형중 어느 것이 엑소사이토시스의 재표적화된 엔도펩티다제 억제에 대해 세포주의 민감성을 담당하는지를 판단하기 위하여, 각 표현형적으로-별개의 세포 유형에 대해 단일 콜로니 분리체를 얻기 위하여 두 가지 상이한 제한-희석 스크린을 실시하였다.

SK-N-DZ 보관물로부터 적정한 밀도의 세포를 DMEM, 10% 태아 소 혈청 (열에 의해 비활성화된), 0.1 mM 비-필수 아미노산, 10 mM HEPES, 1 mM 피루베이트 나트륨, 100 U/ml 폐니실린, 100 $\mu$ g/ml 스트렙토마이신이 포함된, T175 콜라겐 IV 피복된 플라스크 안에서 성장시켰다. 2차 계대 후, 세포를 트립신-처리하여 세포 혼탁액을 만들고, 세포 농도를 측정하였다. 이러한 세포 혼탁액으로부터 약  $4.0 \times 10^6$  개의 세포들은 50 mL 투브로 옮기고, 세포들을 10 mL 주사기를 이용하여 18.5 가우지 바늘을 통하여 반복된 활발한 축출을 통하여 단일 세포로 분리하였다. 이러한 분리된 단일-세포 혼탁액의 세포는 15 mL의 새로운 성장 배지를 추가하여  $0.2 \times 10^6$  세포/mL로 희석하였고, 2.5 $\mu$ l의 희석물을 50 mL의 새로운 성장 배지에 추가하여 10개의 세포/mL 농도를 만들었다. 이러한 최종 희석 저장물로부터, 100 $\mu$ l의 성장 배지를 96웰 콜라겐 IV 피복된 평판의 각 웰에 첨가하였고, 세포를 4주간 5% 이산화탄소 하에서 37°C 배양기내에서 고정(undisturbed) 성장시켰다. 검정을 위하여, 96웰 평판 4개를 설치하였다. 4주 후, 각 웰을 현미경 검사하여 성장하는 단일 콜로니를 확인하였고, 확인된 각 콜로니에 100 $\mu$ l의 새로운 성장 배지를 각 웰에 첨가하였고, 세포를 2주간 5% 이산화탄소 하에서 37°C 배양기내에서 고정(undisturbed) 성장시켰다. 추가 2주간 성장 시킨 후, 성장한 단일 콜로니를 트립신-처리하였고, 연속 성장을 위하여 새로운 96웰 평판으로 옮겼다. 콜로니는 시각적 관찰에 근거하여 약 1,000개 세포로 성장시킨 후, 세포는 트립신-처리하였고, 각 세포-혼탁액은 24-웰 콜라겐 IV-피복된 평판으로부터 새로운 웰로 옮겼다. 5% 이산화탄소 하에서 37°C 배양기내에서, 필요하다면 매 2-3일마다 새로운 성장 배지를 보충하면서 세포를 성장시켰다. 배양물이 약 60% 이상 합류될 때까지 세포를 성장시키고, 이때 세포를 트립신-처리하였고, 각 세포-혼탁액은 24 웰 평판에서 세포 합류에 근거하여 25cm<sup>2</sup> 콜라겐 IV-피복된 플라스크로 옮겼다. 5% 이산화탄소 하에서 37°C 배양 기내에서, 필요하다면 매 2-3일마다 새로운 성장 배지를 보충하면서 세포를 성장시켰다. 플라스크내 세포가 70-

80% 합류되면, 엑소사이토시스의 Noc/A 억제에 대한 민감성을 판단하기 위하여 클론 세포주를 테스트할 때까지 세포를 액화 질소에 냉동 보관하였다. 두 가지 스크린으로부터 초기 설정된 384개 콜로니 분리체중 생존능 및 성장 기준에 근거하여 24개 클론 세포주를 선택하였고, 후속 스크리닝 과정을 위해 확장하였다. 이들중, 12개의 신속하게 성장하는 세포주를 확인하였다.

[0301] 2. 재표적화된 엔도펩티다제를 이용하여 클론 세포주로부터 세포의 재표적화된 엔도펩티다제 활성 민감도에 대한 1차 스크린.

[0302] 클론 세포주의 세포가 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A 활성에 민감한지를 결정하기 위하여, 엔도펩티다제 활성을 결정하는 면역 기반 방법을 이용하여 1차 스크린을 실시하였다.

[0303] 13개 SK-N-DZ 클론 (#3, #4, #5, #8, #9, #10, #13, #15, #16, #17, #18, #22, 및 #23) 그리고 SK-N-DZ 모 세포를 EMEM, 10% FBS, 1× B27, 및 1×N2의 96웰 평판에서 도말하였고(웰당 세포수는 모름), 하룻밤 항온처리하였다. 24시간 동안 세포를 1 nM Noc/A로 처리하였다. 20분간 세포를 100 $\mu$ l의 용해 완충액으로 용해시키고, 20분간 4000 rpm에서 원심분리하였다. 50 $\mu$ l의 2×SDS 시료 완충액을 50 $\mu$ l의 세포 용해물에 첨가하였고, 95°C에서 5분간 가열하였다. 10 $\mu$ l의 단백질 시료를 12% NuPage 겔상에 라인마다 적하시키고, 실시예 I에서 설명한 것과 같이 Western 블랏 검정을 실시하였다. 전체 SNAP-25 및 절단된 SNAP-25의 평가에서 클론 #3, #8, #15, 및 #22는 Noc/A 흡수에 있어서 최소한 모 세포만큼 양호하였다. 완전한 복용량 반응 치료 및 ECL 샌드위치 ELISA 검정은 세포를 증가시킨 후 실시하였다.

[0304] 3. 재표적화된 엔도펩티다제를 이용하여 클론 세포주의 1차 반응 스크리닝.

[0305] 클론 세포주의 세포가 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A 활성에 민감한지를 결정하기 위하여, 엔도펩티다제 활성을 결정하는 면역 기반 방법을 이용하여 2차 스크린을 실시하였다.

[0306] 이러한 클론된 SK-N-DZ 세포주를 추가 비교하기 위하여, ECL 샌드위치 ELISA 검정을 실시하였다. 5개 클론 (#3, #9, #15, #16, #22)과 SK-N-DZ 모 세포를 RPMI 1640, 10% FBS, 1×B27, 및 1×N2 배지 (NGF 없음)에서 세포주당 웰당 25,000개 세포로 1주일간에 걸쳐 96웰 폴리-D-리신 피복된 평판에 도말하였다. 24시간 동안 세포는 0 내지 20 nM (0 nM, 0.03 nM, 0.08 nM, 0.24 nM, 0.74 nM, 2.22 nM, 6.67 nM, 20 nM) 복용량의 Noc/A로 처리하였다. 실시예 I에서 설명한 것과 같이, 절단된 SNAP-25<sub>197</sub>은 ECL ELISA 검정으로 정량화하였다.

[0307] 표 13은 5개의 클론과 이들 모 세포주에 대한 EC<sub>50</sub> 값과 노이즈에 대한 신호를 보여준다. #3, #9, 및 #15로 명명된 3개 클론은 더 낮은 EC<sub>50</sub> 값을(< 1 nM) 나타내었고, 클론 #16 및 #22는 모 세포주의 값 (~ 2 nM)과 비교하였을 때, 유사한 EC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 그러나, 절단된 SNAP-25로부터 전체 신호는 클론 #3, #22, 및 모 세포에서 더 높았다. 클론 #9, #16, 및 #15는 나머지 세포주와 비교하였을 때 전체 신호가 더 낮았다.

표 13. 제한된-희석 클로닝에 의해 SK-N-DZ 세포로부터 수득된 5개 클론의 EC<sub>50</sub> 값과 신호-대 노이즈 비율(S/N)의 요약 표.

	부모	3	9	19	16	22
S/N 비율0.03 nM/BK	2	3	2	2	2	3
S/N 비율20 nM/BK	19	27	12	8	14	20
EC <sub>50</sub> (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

[0308]

[0309] SK-N-DZ 클론에서 Noc/A 처리 조건을 최적화하였으며, 클론 #3, #15, 및 #22, 그리고 모 이질성 SK-N-DZ 세포주를 비교하는 검정을 실시하였다. 표 14는 비교 결과를 나타내며, 그리고 검정 최적화로 인하여 검정에서 노이즈에 대해 신호가 상당히 개선되었다는 것을 설명한다. 클론 #3 및 #22는 우수한 민감도 및 효능을 가지기 때문에 추가 검정 개발을 위해 선택하였다.

**표 14. 최적화 조건을 이용하여 SK-N-DZ 세포로부터 수득된 3개 클론의 EC<sub>50</sub> 값과 신호-대 노이즈 비율(S/N)의 요약 표.**

	부모	3	15	22
S/N 비율 0.03 nM/BK	15	8	5	10
S/N 비율 20 nM/BK	107	89	33	60
EC <sub>50</sub> (nM)	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.09

[0310]

[0311] 실시예 V

[0312]

재표적화된 엔도펩티다제 흡수에 대한 클론 세포주의 특징화 및 비교

[0313]

다음 실시예는 이질성 집단을 포함하는 확립된 세포주로부터 기인된 클론 세포주 또는 표적 수용체의 형질감염과 후속적으로 세포주의 클로닝에 의한 클론을 어떻게 특징화시키고, 비교하는지를 설명한다.

[0314]

재표적화된 엔도펩티다제 흡수의 특이성 또는 선택성을 평가하기 위하여, 표적화 도메인이 없는 재표적화된 엔도펩티다제를 이용하여 비-특이적 흡수 검정을 실시하였다. 오피오아이드 재표적화된 엔도펩티다제의 경우, AGN P33 클론 #6 세포주 (ORL-1 수용체를 인코드하는 발현 구조체로 안정적으로 형질변환된 세포를 포함) 및 SK-N-DZ 클론 세포주 #3 및 #22 (내생적 ORL-1 수용체를 발현하는 세포를 포함)의 세포를 96웰 폴리-D-리신 피복된 평판에서 N2 및 B27 보충제, 그리고 NGF (50 ng/mL)을 포함하는 RPMI 1640 무혈청 배지에 웰당 150,000개의 세포로 접종하였고, 화합물 처리 전, 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 37°C에서 20 ± 4 시간동안 배양하였다. 세포는 동일한 배지에서 0-20 nM 또는 0-40 nM 범위의 8-용량의 Noc/A로 처리하거나 또는 0 내지 400 nM 또는 0 내지 40 nM 범위의 8-용량의 LH<sub>N</sub>/A로 22시간 동안 처리하였다. 배지를 제거하였고, 세포를 세척하였고, 용해하였고, 샌드위치 ELISA 검정 준비에서 찌꺼기를 제거하기 위하여 원심분리하였다. 2E2A6 단클론성 항체 피복된 ELISA 평판은 실온에서 1시간 동안 150μl 차단 완충액으로 차단하였다. 차단 완충액을 제거한 후, 30μl의 세포 용해물을 각 웰에 첨가하였고, 평판은 2시간 동안 4°C에 항온처리하였다. 평판을 PBS-T로 3회 세척하였고, PBS-T중 2% 차단 시약에 5μg/ml 농도의 SULFO-TAG NHS-에스테르 라벨된 검출 α-SNAP25 다클론성 항체 30μl를 웰의 바닥 코너에 추가하였다. 평판은 밀봉하였고, 실온에서 1시간 동안 교반한 후, PBS-T로 3회 세척하였다. 세척이 완료된 후, 웰당 150μl의 1× Read 완충액을 첨가하였고, SI6000 Image 판독기에서 평판을 판독하였다. 음성 기준 LH<sub>N</sub>/A에 대한 Noc/A 흡수를 비교한 결과를 표 15와 표 16에 나타낸다. 이러한 결과들은 이들 두 세포주에서 Noc/A와 LH<sub>N</sub>/A 흡수 간에 분리가 잘 되어 있음을 나타내고, 이는 Noc/A의 특이적 흡수를 설명한다.

**표 15. SK-N-DZ 클론 #3에 대한 비-특이적 흡수, 4가지 독립적인 실험 요약**

nM	비-특이적 흡수 %	SEM (평균의 표준 오차)
0	2	0.5
1	6	0.5
2	8	0.5
5	10	1
15	19	0.9
44	33	1.5
133	65	2.4
400	93	2.3

[0315]

표 16. hORL-1 #6 세포에 대한 비-특이적 흡수, 3가지 독립적인 실험 요약

nM	비-특이적 흡수%	SEM (평균의 표준 오차)
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

[0316]

표 17은 3가지 세포주의 특징 및 비교 결과를 요약한 것이다. SK-N-DZ 클론 세포주 #3 및 #22는 초기 eDRG에 동일한 민감도를 보유하고, 재표적화된 엔도펩티다제 Noc/A에 대한 확실한 검정을 개발하기 위한 노이즈 대 신호의 우수한 비율을 가진다. AGN P33 클론 세포주 #6는 또한 비-특이적 흡수가 낮고, 적당한 민감도를 가진 우수한 후보다.

표 17.

매개변수	SK-N-DZ 클론 3	SK-N-DZ 클론 22	AGN P33 클론 6	eDRG
세포주 종	인간 클론	인간 클론	인간 클론	쥐 1차
세포 수용체발현	인간 ORL1 내생성	인간 ORL1 내생성	인간 ORL1 형질감염된	쥐 ORL1 내생성
역학적 범위	0.03 내지 20 nM 분량 반응	0.03 내지 20 nM 분량 반응	0.04 내지 40 nM 분량 반응	0.17 내지 20 nM 분량 반응
민감도 (EC <sub>50</sub> )	EC <sub>50</sub> = 0.75±0.1 (N=10)	EC <sub>50</sub> = 0.8±0.2 (N=9)	EC <sub>50</sub> = 2.4 ± 0.2 (N=21)	EC <sub>50</sub> = 0.8 ± 0.15 (N=6)
ULOQ	20 nM	20 nM	20 nM	10-20 nM
S/N ULOQ/ 배경	98 ± 15 (N=10)	86 ± 17 (N=9)	385 ± 32 (N=19)	~300
S/N LLOQ/ 배경	12 ± 2 (N=11)	10 ± 2 (N=9)	29 ± 7 (N=18)	N/A
Specificity vs LH <sub>N/A</sub>	≥ 2 logs (N=4)	≥ 2 logs (N=4)	≥ 2 logs (N=3)	N/A
SNAP-25 발현	내생성	내생성	내생성	내생성
노씨셀틴 Var와 경쟁.	완전한 경쟁(n=4)	완전한 경쟁(n=4)	부분 경쟁(n=4)	N/A
Ab 항-노씨셀틴에 의한 억제	완전한 경쟁(n=4)	완전한 경쟁(n=4)	완전한 경쟁(n=4)	N/A
항-868 Ab에 의한 억제	부분 경쟁(N=3)	부분 경쟁(N=3)	부분 경쟁(N=3)	N/A

[0318]

재표적화된 엔도펩티다제 흡수의 민감도를 평가하기 위하여, 리간드 포화 결합 검정을 실시하였다. 대부분 리간드와 이들의 결합 부위의 상호작용은 결합 친화도로 특징화할 수 있다(NIH Assay Guidance). 일반적으로, 높은 친화도 결합은 낮은 친화도 결합의 경우보다 리간드의 수용체 결합 부위에서 리간드의 체류 시간이 더 길다. 리간드 (L) (약물과 같은)와 단백질 (P) 사이에 결합 친화도 예컨대, 리간드가 특정 단백질에 얼마나 단단하게 결합하는지를 설명하는데 해리 상수를 흔히 이용한다. 평형 포화 결합 실험은 다양한 방사능리간드 농도에서 전체적인 그리고 비-특이적 결합(NSB)를 측정한다. 방사능리간드에 대한 평형 해리 상수 또는 친화도, K<sub>d</sub>와 수용체 결합 부위의 최대 수, B<sub>max</sub>는 비-선형 회귀 검정을 이용하여 특이적 결합(전체-NSB)으로부터 계산할 수 있다. 하기 식에서 볼 수 있는 것과 같이 한-부위 결합 쌍곡선 비-선형 회귀 검정(예컨대, GraphPad Prism)을 이용하여 특이적 결합에 대한 K<sub>d</sub>를 계산할 수 있고, 여기서 B<sub>max</sub>는 결합 부위의 최대 수(pmol/mg, 또는 pmol/세포, 또는 부위/세포)이며, 그리고 K<sub>d</sub> (nM, pM, 등)는 최대 결합의 절반에 도달하는데 필요한 방사능리간드의 농도다:

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

[0320]

[0321] 오피오이드 재표적화된 엔도펩티다제의 경우, AGN P33 클론 #6 세포주 (ORL-1 수용체를 인코드하는 발현 구조체로 안정적으로 형질변형된 세포를 포함하는), SK-N-DZ 모 세포주, 및 SK-N-DZ 클론 세포주 #3, #15, 그리고 #22 (내생적 ORL-1 수용체를 발현하는 세포를 포함하는)의 세포들을 48-웰 폴리-D-리신 피복된 평판 상의 1× N2 및 1× B27 보충제를 포함하는 RPMI 1640 무혈청 배지에 웰당 200,000개 세포로 도말하였고, 5% CO<sub>2</sub> 배양기, 37°C에서, 하룻밤동안 배양하였다. 배지를 제거하였고, 세포와 전체 결합을 평가하기 위하여 이용하는 웰에 150 $\mu$ l의 Tris 결합 완충액을 추가하였고, 비-특이적 결합을 평가하는데 이용하는 웰에 100 $\mu$ l Tris 결합 완충액을 추가하였다. 또는 50  $\mu$ L의 4× 최종 농도의 차가운 노씨셉틴을 비-특이적 결합 웰에 추가하였고 (SK-N-DZ 세포주에 2.5  $\mu$ M, 그리고 AGN P33 클론 세포주 #6에 1  $\mu$ M), 50  $\mu$ L의 4× 최종 농도의 <sup>3</sup>H-노씨셉틴을 전체 결합 웰 및 비-특이적 결합 웰에 최종 용적이 200 $\mu$ l가 되도록 추가하였다 (SK-N-DZ 세포주에 0 nM, 0.05 nM, 0.1 nM, 0.2 nM, 0.4 nM, 0.8 nM, 1.6 nM, 3.1 nM, 6.3 nM, 12.5 nM, 25 nM, 및 50 nM을 추가, 그리고 AGN P33 클론 세포주 #6에 0, 0.01 nM, 0.02 nM, 0.039 nM, 0.078 nM, 0.156 nM, 0.313 nM, 0.625 nM, 1.25 nM, 2.5 nM, 5.0 nM, 및 10 nM을 추가). 30분간 37°C에서 항온처리한 후, 웰은 0.5 mL의 차가운 세척 완충액으로 2회 세척하였다. 그 다음 세포는 200 $\mu$ l의 2N NaOH에서 변성시키고, 그리고 5 mL의 섬광 유체를 포함하는 20mL 섬광 바이알로 이동시켰다. 미가공 데이터를 이용하여 복용량-반응 곡선을 플롯하였고, 각 시료에 대한 K<sub>d</sub>를 계산하였다. 수득된 미가공 데이터를 SigmaPlot v10.0으로 옮겼고, 한 부위 포화 피트(One Site Saturation fit)를 이용하여 리간드 결합의 방정식 범주하에 복용량-반응 곡선을 정의하였다. 그래프 리포트를 만들었고, 다음의 매개변수를 포함하였다: R<sup>2</sup>(상관 계수), B<sub>max</sub>, 및 K<sub>d</sub> ± SE (계수 ± 표준 오차). 전체 결합, 특이적 결합, 및 비-특이적 결합 그래프는 SK-N-DZ 클론 세포주 #3, #15, 및 #22, 그리고 AGN P33 클론 세포주 #6 세포에서 실시된 검정으로부터 구하였다. SK-N-DZ 클론 세포주 #3 및 #22는 <sup>3</sup>H-노씨셉틴의 농도-의존적 그리고 포화 결합을 보였다. 동일한 실험 조건하에서, SK-N-DZ 클론 세포주 #15는 <sup>3</sup>H-노씨셉틴의 복용량-의존적 반응을 나타내지만, 50nM의 최대 복용량에서 포화되지 않았다. 내생적 ORL-1을 발현하는 SK-N-DZ 세포주와 비교하였을 때, AGN P33 클론 세포주 #6의 세포는 낮은 비-특이성 결합과 <sup>3</sup>H-노씨셉틴에 대해 더 높은 친화도 결합을 가졌다 (최대 복용량은 SK-N-DZ에서 10nM 대 50nM이었다).

[0322]

SK-N-DZ 클론 세포주 #3, #22, #15 그리고 AGN P33 클론 세포주 #6의 포화 결합 곡선을 이용하여 상이한 3일 동안 실시된 세포주당 3가지 독립 실험으로부터 K<sub>d</sub> 및 B<sub>max</sub> 값을 평가하였다. 이들 4개 세포주의 순위는 다음과 같다: AGN P33 클론 세포주 #6 (K<sub>d</sub>=1.86 nM 및 B<sub>max</sub>=2.9 fmol/세포) > SK-N-DZ 클론 세포주 #3 (K<sub>d</sub>=14 nM 및 B<sub>max</sub>=0.6 fmol/세포) ≥ SK-N-DZ 클론 세포주 #22 (K<sub>d</sub>=17 nM 및 B<sub>max</sub>=0.6 fmol/세포) >> SK-N-DZ 클론 세포주 #15 (K<sub>d</sub>>50 nM). SK-N-DZ 클론 세포주 #15에 대한 포화된 복용량-반응을 얻기 위하여, <sup>3</sup>H-노씨셉틴의 더 높은 복용량 범위를 이용할 필요가 있다. 표 16은 3개의 SK-N-DZ 클론 세포주, #3, #15, #22, 그리고 AGN P33 클론 세포주 #6 안정한 세포주에서 특이적 원형질 막 노씨셉틴-결합 부위의 특징에 대한 데이터를 요약한다. 데이터는 다음을 보여주었다: 1) AGN P33 클론 세포주 #6에서 매우 낮은 비-특이적 결합과 함께 높은 친화도 부위 (K<sub>d</sub>, 1.8 nM, 및 B<sub>max</sub> 2.9 fmol/세포); 2) 노씨셉틴-결합은 내생적 수용체를 발현시키는 SK-N-DZ 고유 세포에서 실시할 수 있다; 3) AGN P33 클론 세포주 #6은 SK-N-DZ 세포주보다 노씨셉틴에 대해 약 10배 더 큰 친화도를 가졌다; 4) 세포 기반 효능 검정에서 볼 수 있는 것과 같이, SK-N-DZ 클론 세포주 #3 및 #22 (K<sub>d</sub> 14-17 nM, B<sub>max</sub> 0.6 fmol/세포)은 SK-N-DZ 클론 세포주 #15보다 세포당 더 많은 수용체 부위를 가졌다 (동일한 복용량 범위에서 포화안됨).

표 18. 4가지 선두 세포주에 대한  $^3\text{H}$ -노씨펩틴 포화 결합 분석 요약 (n=3 별개 실험)

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

[0323]

[0324] 재표적화된 엔도펩티다제 흡수의 민감도를 평가하기 위하여, mRNA 수준에서 발현되는 재표적화된 엔도펩티다제 수용체의 양을 RT-PCR을 이용하여 평가하였다. 세포에서 발현되는 수용체의 양은 테스트용으로 이용되는 세포주의 특징의 주요 양태이며, 그리고 이것은 재표적화된 엔도펩티다제에 대한 민감도와 관련있다. 발현된 재표적화된 엔도펩티다제 수용체의 양은 다른 잠재적 세포주의 스크리닝하고, 그리고 표적 수용체를 발현하지 않는 세포주를 제거하는 도구가 될 수도 있다. 수용체 발현을 측정하는 한 가지 방법은 실시간 PCR(RT-PCR)을 이용하여 재표적화된 엔도펩티다제 수용체 mRNA의 양을 정량화하는 것이다.

[0325]

오피오이드재표적화된 엔도펩티다제의 경우, 무혈청 배지 또는 혈청 함유 배지에서 성장한 비-형질감염된 모 SiMa 세포주의 세포, AGN P33 클론 세포주 #6의 세포, 모 SK-N-DZ 세포주의 세포, 그리고 SK-N-DZ 클론 세포주 #3 및 #22의 세포로부터 RNA를 분리하였다. mRNA는 cDNA로 전환시키고, 그리고 ORL-1을 증폭시키고, ORL-1에 대한 다음의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 각 세포주에 존재하는 상대적인 양을 결정하기 위하여 실시간 측정하였다: 포워드 프라이머 5'-CACTCGGCTGGTGCTGGTGG-3' (서열번호: 148) 및 리버스 프라이머 5' - AATGGCCACGGCAGTCTCGC-3' (서열번호: 149). 반응물에 존재하는 이중 가닥 DNA(PCR 생성물)의 양에 대한 형광을 내는 SYBR® 그린을 이용하여 DNA를 정량화한다. 사이클 수에 대한 형광의 양을 플로팅하여 각 반응에 대한 로지스틱 곡선(logistic curve)을 얻는다. 반응이 곡선의 선형 상에 빨리 도달할수록 반응물내에 ORL-1 수용체 cDNA는 더 많다. 효소가 추가되지 않는 기준 RT 반응을 이용하여 오염이 있는지를 판단하였다. 이 반응에는 효소가 없기 때문에 cDNA가 만들어지지 않을 것이다. RNA 주형을 이용해서 PCR 생성물이 만들어질 수 없기 때문에, -RT 반응에서 PCR 곡선이 나타난다면, 유일한 가능성은 게놈 DNA 오염이다. -RT 반응에서, PCR 플롯이 나타나지 않기 때문에, 최소한의 게놈 DNA 오염이 있다는 것을 확인하였다(데이터 나타내지 않음). 표 18은 세포주와 이들의 CT값을 열거한다. CT는 설정된 역치 이상으로 신호를 내기 위하여 상응하는 PCR 반응에서 취하는 PCR 사이클의 횟수다. 세포주에서 ORL-1 수용체 mRNA의 양은 이들의 대응하는 CR 값을 보면서 서로 비교할 수 있다. CT 값에 따라, AGN P33 클론 세포주 #6의 세포가 무혈청 배지에서 모 SiMa 세포주의 세포보다 더 많은 ORL-1 mRNA를 가졌고(Ave CT: 28.6 vs. 17.3) 그리고 혈청 배지에서도 더 많았다(Ave CT: 26.1 vs. 16.5). 또한, AGN P33 클론 세포주 #6의 계대 6과 계대 16에서의 세포로부터 수득한 mRNA에서 최소한의 차이가 나타났다. 또한 모 SK-N-DZ 세포주 vs. 클론 세포주 #3 및 #22의 CT값 및 플롯에서도 최소한의 차이가 있다. 이러한 결론은 혈청 배지와 무혈청 배지에서 성장한 세포에서 사실이며, Noc/A에 대한 세포 기반 효능 검정에서 관찰된 이들 세포주의 유사성을 반영한다.

표 19. 세포주에서 ORL-1의 평균 CT 값

배지	세포주	CT 평균
무-콜청배지	SiMa 부모 p26	28.6
	SiMa hORL-1 클론 #6 p6	17.3
	SiMa hORL-1 클론 #6 p16	17.3
완전 배지	SiMa 부모 p26	26.1
	SiMa hORL-1 클론 #6 p6	16.4
	SiMa hORL-1 클론 #6 p16	16.6
무-콜청배지	SK-N-DZ	26.3
	SK-N-DZ 클론 #3	25.9
	SK-N-DZ 클론 #22	26.6
완전 배지	SK-N-DZ	26.2
	SK-N-DZ 클론 #3	25.8
	SK-N-DZ 클론 #22	26.4

[0326]

## 실시예 VII

[0327]

BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 자유 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합하는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체의 개발

[0328]

다음의 실시예는 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체를 어떻게 만드는지를 설명한다.

[0329]

1.  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의 생성.

[0330]

BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는 단클론성  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 개발하기 위하여, SNAP-25 절단 생성물 항원으로 13개-잔기 웨티드 CDSNKTRIDEANQ<sub>COOH</sub> (서열번호: 38)를 기획하였다. 이 웨티드는 유연한 링커 부분과 KLH에 콘쥬게이트를 위한 N 말단 시스테인 잔기 그리고 인간 SNAP-25(서열번호: 5)의 아미노산 186-197과 카르복실화된 C 말단 글루타민(서열번호: 38)을 포함한다. 잘 선택된, 독특한 웨티드 서열에 대한 단클론 항체의 생성은 에피토프 특이성에 대한 기준을 제공하여, 상당히 연관된 이소폼 모둠(pool)중에서 특정 하위 집단 단백질을 확인할 수 있도록 한다. Blast 연구에서 이러한 웨티드는 SNAP-25에만 높은 상동성을 가지고, 그리고 뉴런 세포에 다른 단백질과는 교차-반응성이 거의 없는 것으로 나타났다. 수치료법 색인(hydropathy index), 단백질 표면 개연성, 유연성 부위들 그리고 선호하는 2차 구조, 이어서 적절한 방향 및 선택된 웨티드 서열의 제공을 판단하기 위하여 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 이 서열을 면밀히 조사하였다. 이 웨티드를 합성하고, 면역원성을 증가시키기 위하여 Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)에 콘쥬게이트시켰다. 6마리 Balb/c 마우스를 이 웨티드로 면역화시키고, 약 8주 이내에 3회 면역화 후, 테스트를 위하여 채혈하였다. 혈액은 4°C에서 60분간 항온처리하여 응고되도록 하였다. 응고된 혈액은 10,000× g, 4°C에서 10분간 원심분리하여, 세포 찌꺼지를 펠렛화하였다. 생성된 혈청 시료는 50 $\mu$ l 분취량으로 분배하여, 필요할 때까지 -20°C에 보관하였다.

[0331]

본 명세서에서 공개하는 다른 SNAP-25 항원에 근거한 유사한 방법을 이용하여 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체를 개발한다. 예를 들면, 서열번호: 45의 SNAP-25 항원을 서열번호: 48의 SNAP-25 항원을 대신하여 KLH에 콘쥬게이트시킬 수 있다. 또 다른 예로서, 서열번호: 38의 SNAP-25 항원으로부터 인간 SNAP-25의 아미노산 186-197을 서열번호: 32, 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 39, 서열번호: 40, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 또는 서열번호: 44로 대체할 수 있다.

## 2. $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의 존재에 대한 스크리닝.

[0333] BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의 존재를 판단하기 위하여, 추출한 마우스 혈청을 이용하여 비교 ELISA 및 세포 기반 결단 검정을 실시하였다. 비교 ELISA를 위하여, 두 가지 융합 단백질을 제작하였다: 서열번호: 48의 BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-197</sub>와 서열번호: 49의 BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-206</sub>. BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-197</sub>은 서열번호: 5의 아미노산 134-197을 포함하는 SNAP-25의 아미노 말단에 연결된 서열 번호:50의 자연적으로-바이오티닐화된 16개 아미노산 BirA 웨티드로 구성된다. BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-206</sub>은 서열번호: 5의 아미노산 134-206을 포함하는 SNAP-25의 아미노 말단에 연결된 서열 번호:50의 자연적으로-바이오티닐화된 16개 아미노산 BirA 웨티드로 구성된다. 이러한 두 가지 기질은 BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-197</sub> 및 BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-206</sub> 10 $\mu$ g/mL 농도로 1×PBS내에 혼탁하였다. BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-197</sub> 및 BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-206</sub>는 대략 100 $\mu$ l의 적합한 기질 용액을 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 평판을 항온처리함으로써, 별도의 평판에 피복하였다. 세척된 평판을 6마리의 면역화된 마우스(마우스 1, 마우스 2, 마우스 3, 마우스 4, 마우스 5, 및 마우스 6)중 하나로부터 유도된 항체-함유하는 혈청으로 1:10 내지 1:100 희석된 1×TBS 중 0.5% BSA에서 1시간 동안 37°C에서 항온처리하였다. 초기 항체 프로브된 평판은 200 $\mu$ l TBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)에서 각 5분씩 4회 세척하였다. 세척된 평판은 2차 항체로 말 양고추냉이 과산화효소 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)에 콘쥬게이트된 염소 다클론성 항-마우스 IgG 항체의 1:10,000 희석을 포함하는 1×TBS에서 37°C, 1시간 동안 항온처리하였다. 2차 항체-프로브된 평판을 200 $\mu$ l TBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)에서 4회 세척하였다. 라벨된 SNAP-25 생성물의 발색 검출은 ImmunoPure TMB 기질 키트(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)를 이용한 발색 검출에 의해 볼 수 있었다. BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-197</sub> 피복된 평판에서 황색의 발생(BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-206</sub> 피복된 평판에서는 발생되지 않음)은  $\alpha$ -SNAP-25 항체가 SNAP-25<sub>197</sub> 결단 생성물을 선호적으로 인지한다는 것을 나타내었다. 결과에서 면역화에 이용된 6마리 마우스중 세 마리 마우스(마우스 2, 마우스 3, 및 마우스 4)는 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 대해 더 높은 역가 및 더 큰 특이성을 가진다는 것을 나타내었다.

[0335] ELISA 경쇄 활성 검정을 이용하여 이러한 결과를 확인하였다. 96웰 Reacti-Bind Streptavidin 피복된 평판 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)은 대략 100 $\mu$ l의 다음의 기질 용액을 추가하여 준비하였다: Rows A-C는 상이한 12가지 농도로 100 $\mu$ l의 BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-197</sub>를 피복하였다; Rows D-H는 10 $\mu$ g/mL에서 100 $\mu$ l의 BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-206</sub>로 피복하였다. 기질 용액을 흡출하고, 200 $\mu$ l TBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)으로 각 웰을 3회 세척함으로써 평판들을 세척하였다. BoNT/A의 희석액은 BoNT/A 항온처리 완충액 (50 mM HEPES, pH 7.4, 1% 태아 소 혈청, 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM 디티오프리톨)에서 37°C, 20분간 사전-환원시키고, 그리고 100 $\mu$ l의 사전-환원된 BoNT/A를 기질-피복된 평판에 첨가하였고, 90분간 37°C에서 항온처리하였다. BoNT/A 처리된 평판들은 BoNT/A 항온처리 완충액을 흡출시키고, 각 평판을 200 $\mu$ l TBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)으로 3회 헹굼으로써 세척하였다. 테스트된 항체를 포함하는 혈청 1:10 내지 1:100 희석물을 포함하는 1× TBS 중 0.5% BSA에서 37°C, 1시간 동안 세척된 평판을 항온처리하였다. 초기 항체 프로브된 평판을 200 $\mu$ l TBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)에서 매회 각 5분씩 4차례 세척하였다. 세척된 평판을 2차 항체로 말 양고추냉이 과산화효소 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)에 콘쥬게이트된 염소 다클론성 항-마우스 IgG 항체의 1:10,000 희석물을 포함하는 1×TBS에서 37°C, 1시간 동안 항온처리하였다. 2차 항체-프로브된 평판을 200 $\mu$ l TBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)에서 4회 세척하였다. 라벨된 SNAP-25 생성물의 발색 검출은 ImmunoPure TMB 기질 키트(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)를 이용하여 발색 검출함으로써 볼 수 있었다. SNAP-25<sub>197</sub> 결단 생성물의 존재와 관련된 황색 발생은 6마리 면역화된 마우스 모두(마우스 1, 마우스 2, 마우스 3, 마우스 4, 마우스 5, 및 마우스 6)로부터 유도된 항체를 함유하는 혈청을 이용한 BoNT/A 처리된 시료에서는 탐지되지만, 처리안된 기준에서는 탐지되지 않는다. 따라서, 비교 ELISA 검정은 면역화를 위하여 이용된 마우스 가운데 3마리 마우스(마우스 2, 마우스 3, 및 마우스 4)는 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 대해 더 높은 역가 및 더 큰 특이성을 가진다는 것을 나타내었다.

[0336]

세포 기반 절단 검정을 위하여, 적당한 밀도의 PC12 세포를 3 mL의 적합한 혈청 배지를 포함하는 60mm 조직 배양 평판에 도말하였다(표 1). 세포가 적합한 밀도에 도달할 때까지 5% 이산화탄소하에 37°C 배양지내에서 세포를 성장시켰다. 500μl 형질감염 용액은 실온에서 5분간 항온처리된 15μl의 LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)을 포함하는 OPTI-MEM 환원된 혈청 배지 250μl를 10μg의 pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 발현 구조체(서열번호: 51)를 포함하는 250μl의 OPTI-MEM 환원된 혈청 배지에 첨가하여, 준비하였다. pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 발현 구조체는 pQBI-25 발현 벡터(Qbiogene Inc., Carlsbad, CA)를 포함하는데, 이의 프로모터 요소들은 서열번호: 52의 GFP-BoNT/A 경쇄를 인코드하는 폴리뉴클레오티드에 기능을 하도록 연결된다. 이러한 형질감염 혼합물은 실온에서 대략 20분간 항온처리하였다. 배지는 보충없는 새로운 배지로 대체하였고, 500μl 형질감염 용액을 세포에 추가하였다. 그 다음 대략 6 내지 18시간 동안 5% 이산화탄소하에서 37°C 배양기에서 세포를 항온처리하였다. 실시예 II에서 설명한 것과 같이, 세포를 세척하였고, 수거하였다. 절단된 SNAP-25<sub>197</sub> 생성물의 존재를 탐지하기 위하여, 각 수거된 시료로부터 분획을 실시예 II에서 설명한 것과 같이 Western 블랏으로 검정하는데, 단, 이용된 일차 항체는 항체를 포함하는 혈청의 1:1,000 희석물이며, 이용된 2차 항체는 마우스 α-IgG 말 양고추냉이 과산화효소의 1:20,000이었다(Pierce Biotechnology, Rockford, IL). SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물에 대응하는 단일 밴드가 3마리 마우스(마우스 2, 마우스 3, 및 마우스 4)로부터 유도된 항체를 포함하는 혈청을 이용한 BoNT/A 처리된 시료에서는 탐지되었지만, 처리안된 기준에서는 탐지되지 않았다. 따라서, 세포 기반 절단 검정에서 면역화를 위하여 이용된 마우스 가운데 3마리 마우스(마우스 2, 마우스 3, 및 마우스 4)는 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 대해 더 높은 역할 및 더 큰 특이성을 가진다는 것을 나타내었다.

[0337]

### 3. 하이브리도마의 생산.

[0338]

BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 단클론성 항체를 생산하는 하이브리도마를 만들기 위하여, 최종 "부스터" 면역화후 3일 뒤에 마우스 2로부터 비장을 수거하였고, 표준 하이브리도마 프로토콜을 이용하여 비장 세포를 골수종 세포 P3-X63 Ag8.653와 융합시켰다. 이들 세포는 5개의 96웰 평판에 도말하였고, HAT 배지를 이용하여 하이브리드를 선택하였다. 융합후 8-14일 이내, 두 개의 별개 평판에 퍼복된 BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-197</sub> 및 BirA-HisTag®-SNAP-25<sub>134-206</sub> 펫터드를 이용한 비교 ELISA를 이용하여 대략 480개 모 클론의 제 1 스크리닝을 실시하였다. 비교 ELISA는 절단된 SNAP-25<sub>197</sub>에 특이적인 항체를 생산하는 하이브리도마를 확인하기 위한 신속한 스크리닝 방법을 제공하였다. 상위 18개 클론은 상기에서 설명한 세포 기반 절단 검정과 LC/A 형질감염된 세포의 면역 착색을 이용한 추가 스크리닝을 받았다. (표 20).

표 20. α-SNAP-25 단클론 항체를 포함하는 상청액 분석

클론	비교 ELISA				세포-기반 분석	
	OD SNAP-25 <sub>197</sub>	OD SNAP-25 <sub>206</sub>	비율 <sub>197/206</sub>	비율 <sub>206/197</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
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	-	-

[0339]

- [0340] 클론 1D3, 1G10, 2E2, 3C1, 3C3, 및 3E8은 이들 클론에 의해 생성된 조건화 배지는 SNAP-25<sub>206</sub> 절단안된 기질에 비교하여 SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물에 대해 최소한 4:1의 비율<sub>197/206</sub>을 가지는 선호적인 결합 특이성을 가지는 α-SNAP-25 항체를 보유하고 있기 때문에 제한 희석에 의해 추가 클론되었고, 세포 기반 절단 검정 및 GFP-LC/A으로 형질감염된 PC12 세포의 면역 착색을 이용하여 SNAP-25<sub>197</sub>-절단 생성물을 탐지하였다. 유사하게, 클론 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 및 4G6은 이들 클론에 의해 생성된 조건화 배지는 SNAP-25<sub>197</sub> 절단안된 기질에 비교하여 SNAP-25<sub>206</sub> 절단 생성물에 대해 최소한 1.5:1의 비율<sub>206/197</sub>을 가지는 선호적인 결합 특이성을 가지는 α-SNAP-25 항체를 보유하고 있기 때문에 제한 희석에 의해 추가 클론되었고, 세포 기반 절단 검정을 이용하여 SNAP-25<sub>206</sub>-절단 안된 기질을 탐지하였다. 이러한 단일-세포 유도된 클론은 비교 ELISA, 세포 기반 절단, 및 면역착색을 이용하여 다시 스크리닝하여 이들의 친화도 및 특이성을 확인하였고, 표준 과정을 이용하여 항체를 이소타입화하였다. 클론 1D3B8 (IgM.k), 1G10A12 (IgG3.k), 2C9B10 (IgG3.k), 2E2A6 (IgG3.k), 2F11B6 (IgM.k), 3C1A5 (IgG2a.k), 및 3C3E2 (IgG2a.k)으로부터 복수(ascites)를 만들었다. 클로닝 프로세스 동안 클론 3E8은 항체 생산을 중단하였고, 더 이상 평가할 수 없었다.
- [0341] 4. α-SNAP-25 단클론성 항체의 결합 특이성 평가.
- [0342] BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 선택적으로 결합할 수 있는 α-SNAP-25 단클론성 항체의 결합 특이성을 평가하기 위하여, 클론 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5, 및 3C3E2의 복수는 세포 기반 활성 검정, 면역세포화학 및 면역침강을 이용하여 SNAP-25 절단 생성물을 탐지하는데 이용하였다.
- [0343] 세포 기반 활성 검정을 위하여, Western 블랏 검정으로 절단안된 SNAP-25<sub>206</sub> 기질 및 절단된 SNAP-25<sub>197</sub> 생성물을 탐지하는 α-SNAP-25 항체를 포함하는 복수의 능력을 검정함으로써, 결합 특이성을 결정하였다. 적당한 밀도의 PC12 세포를 3 mL의 적합한 혈청 배지를 포함하는 60mm<sup>2</sup> 조직 배양 평판에 도말하였고, 세포가 적합한 밀도에 도달할 때까지 5% 이산화탄소에 37°C 배양지내에서 세포를 성장시켰고, 상기에서 설명한 것과 같이, pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 발현 구조체 (형질감염안된 세포)가 없는 형질감염 용액 또는 pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 발현 구조체 (형질감염된 세포)를 포함하는 형질감염 용액으로 형질감염시켰다. 실시예 I에서 설명한 것과 같이, 세포를 세척하였고, 수거하였다. 절단안된 SNAP-25<sub>206</sub> 기질 및 절단된 SNAP-25<sub>197</sub> 생성물 모두의 존재를 탐지하기 위하여, 각 수거된 시료의 분획을 실시예 1에서 설명한 것과 같이 Western 블랏으로 검정하였는데, 단 이용된 일차 항체는 α-SNAP-25 단클론성 항체를 포함하는 복수의 1:100 희석물이며, 이용된 2차 항체는 말 양고추냉이 과산화효소에 콘쥬게이트된 α-마우스 IgG의 1:20,000이었다(Pierce Biotechnology, Rockford, IL). 게다가, 3가지 시판되는 이용가능한 마우스 α-SNAP-25 단클론성 항체도 테스트하였다. 제조업자가 절단안된 SNAP-25<sub>206</sub> 기질 및 절단된 SNAP-25<sub>197</sub> 생성물을 모두 탐지한다고 표시되어 있는 α-SNAP-25 항체, SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD)은 제조업자의 지시에 따라 15,000 희석으로 이용하였다. 제조업자가 절단 안된 SNAP-25<sub>206</sub> 기질 및 절단된 SNAP-25<sub>197</sub> 생성물을 모두 탐지한다고 표시되어 있는 α-SNAP-25 항체, MC-6050 (Research & Diagnostic 항체, Las Vegas, NV)은 제조업자의 지시에 따라 1:100 희석으로 이용하였다. 제조업자가 절단된 SNAP-25<sub>197</sub> 생성물만을 탐지한다고 표시되어 있는 α-SNAP-25 항체, MC-6053 (Research & Diagnostic 항체, Las Vegas, NV)은 제조업자의 지시에 따라 1:100 희석으로 이용하였다.
- [0344] 표 21은 SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물만을 탐지하는 α-SNAP-25 항체를 포함하는 복수를 나타낸다. 세포 기반 절단 검정에서 클론 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, 및 3C3E2로부터 만들어진 복수는 SNAP-25<sub>206</sub> 절단안된 기질에 비교하여 이러한 절단 생성물의 선택적 인식을 허용하는 SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물에 대해 높은 결합 특이성을 가지는 α-SNAP-25 단클론성 항체를 합성한다는 것이 나타났다. 상업적 항체 SMI-81은 SNAP-25<sub>206</sub> 절단안된 기질을 탐지하지만, SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물을 아주 조금 인지하였다(표 21). 놀라운 것은, 상업적 항체 MC-6050은 SNAP-25<sub>206</sub> 절단안된 기질만을 탐지하였고, SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물은 인지하지 못하였다(표 21). 더욱 놀라운 것은, 상업적 항체 MC-6050은 SNAP-25<sub>206</sub> 절단안된 기질만을 탐지하였고, 비록 제조업자가 이 항체는 SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물을 선택적으로 탐지한다고 광고하지만, SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물을 인지하지 못하였다(표 21). 따라서, 이 검정에서 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, 및 3C3E2는 SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물에 대해 적당한 선택성을 나타내지

만, 1G10A12 및 2F11B6은 선택성을 가지지 못한다는 것을 보여주었다. 게다가, 상업적 항체 SMI-81, MC-6050 및 MC-6053은 모두 NAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물을 선택적으로 탐지하지 못하였기 때문에, 본 출원에서 공개하는 면역 기반 방법에는 부적합하다.

[0345] 면역세포화학 검정을 위하여, 면역 착색에 의해 절단안된 SNAP-25<sub>206</sub> 기질과 절단된 SNAP-25<sub>197</sub> 생성물을 탐지하는  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 포함하는 복수의 능력을 검정함으로써 결합 특이성을 판단하였다. 예컨대, *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)* 참고. 적당한 밀도의 PC12 세포를 도말하였고, 성장시키고, 그리고 상기에서 설명한 것과 같이, pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 발현 구조체 (형질감염안된 세포)가 없는 형질감염 용액 또는 pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 발현 구조체 (형질감염된 세포)를 포함하는 형질감염 용액으로 형질감염 시켰다. 세포를 1×PBS에서 세척하였고, 그리고 실온에서 30분간 5 mL의 PAF에서 고정시켰다. 고정된 세포는 포스페이트 완충액 염으로 세척하였고, 1×PBS 중 5 mL의 0.5% Triton® X-100 (폴리에틸렌 글리콜 옥틸페놀 에테르)에서 항온처리하였고, 1×PBS에서 세척하였고, 6분간 -20°C에서 5mL 메탄올에서 투과시켰다(permeabilize). 투과된(Permeabilized) 세포를 실온에서 30분간 5 mL의 100 mM 글리신에서 차단시켰고, 1×PBS에서 세척하였고, 그리고 실온에서 30분간 1×PBS 중 5 mL의 0.5% BSA에서 차단시켰다. 차단된 세포는 1×PBS에서 세척하였고, 그리고 테스트되는 하이브리도마 클론 세포주의 복수 1:10 희석물을 포함하는 1×PBS 중 0.5% BSA에서 실온에서 2시간 동안 항온처리하였다. 세척한 세포를 2차 항체로 ALEXA® FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)에 콘쥬게이트된 염소 다클론성 항-마우스 면역글로불린 G, 중쇄 및 경쇄 (IgG, H+L) 항체 1:200 희석물을 포함하는 1×PBS에서 실온에서 2시간 동안 항온처리하였다. 2차 항체-프로브된 세포는 1×PBS에서 매회 5분간 3회 세척하였다. 현미경 관찰을 위해 VECTASHIELD® Mounting Media (Vector Laboratories, Burlingame, CA)에 얹고, 커버슬립을 덮어서 세척된 세포를 준비하였다. 신호 검출의 영상은 적합한 레이저 세팅을 이용한 Leica 공총점 현미경으로 수득하였다. 표 21은  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 포함하는 복수가 SNAP-25<sub>197</sub>-절단 생성물을 특이적으로 탐지 하였다는 것을 나타낸다. 면역세포화학 검정은 SNAP-25<sub>206</sub> 절단안된 기질에 대해 이러한 절단 생성물의 선호적 인식을 허용하는 SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물에 대한 높은 결합 특이성을 가지는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체를 합성한다는 것을 나타내었다.

[0346] 면역침강 검정을 위하여, 절단안된 SNAP-25<sub>206</sub> 기질 및 절단된 SNAP-25<sub>197</sub> 생성물을 침강시키는 정제된  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체인 단백질 A(HiTrap™ Protein A HP Columns, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ)의 능력을 검정함으로써 결합 특이성을 판단하였다. 예컨대, *Chapter 8 Storing and Purifying Antibodies, pp. 309-311, Harlow & Lane, supra, 1998a* 참고. 적당한 밀도의 PC12 세포를 도말하였고, 성장시키고, 그리고 상기에서 설명한 것과 같이, pQBI-25/GFP 발현 구조체 (기준 세포; 서열번호: 53)를 포함하는 형질감염 용액 또는 pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC 발현 구조체 (실험 세포)를 포함하는 형질감염 용액으로 형질감염 시켰다. pQBI-25/GFP 발현 구조체는 발현 벡터를 포함하고, 이의 프로모터 요소들은 서열번호: 54의 GFP를 인코드하는 폴리뉴클레오티드에 기능적으로 연결된다. 하룻밤 항온처리 후, 성장 배지를 흡출시키고, 각 웰을 200 $\mu$ l의 1×PBS로 행궈냄으로써 세포를 세척하였다. 세포를 수거하기 위하여, PBS를 흡출시켰고, 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGDT, 10% 글리세롤, 1% Triton® X-100 (폴리에틸렌 글리콜 옥틸페놀 에테르)를 포함하는 면역침강 용해완충액과 1×COMPLETE™ 프로테아제 억제제 각테일(Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN)을 첨가하고, 1시간 동안 4°C에서 항온처리함으로써, 세포를 용해시켰다. 용해된 세포를 3,000 x g, 4°C에서 10분간 원심분리시켜, 세포 씨꺼기를 제거하였고, 상청액을 깨끗한 퓨브로 옮기고, 단백질 농도가 대략 1 mg/mL이 되도록 희석하였다. 대략 5 $\mu$ g의 정제된 단클론성 항체를 0.5 mL의 희석된 상청액에 추가하였고, 2시간 동안 4°C에서 항온처리하였다. 1차 항체 항온처리후, 대략 50 $\mu$ l의 고정된 단백질 G (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)를 희석된 상청액에 추가하였고, 1시간 동안 4°C에서 항온처리하였다. 항온처리한 상청액은 0.5 mL의 면역침강 용해 완충액을 첨가하여 매회 30분간 3회 세척하였고, 300 x g, 4°C에서 1분간 원심분리하여, 고정된 단백질 G를 펠렛화하였고, 그리고 상청액은 버렸다. 세척 후, 펠렛을 30 $\mu$ l의 1×SDS 로딩 완충액에 재현탁하고, 시료를 5분간 95°C로 가온하였다. 절단안된 SNAP-25<sub>206</sub> 기질과 절단된 SNAP-25<sub>197</sub> 생성물의 모든 존재를 탐지하기 위하여, 각 수거된 시료의 분획을 실시예 I에서 설명한 것과 같이 Western 블랏으로 검정하였는데, 단, 이용된 일차 항체는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체 혈청의 1:1,000 희석물이었고(실시예 V 참고) 그리고 이용된 2차 항체는 토끼  $\alpha$ -IgG 말 양고추냉이 과산화효소의 1:20,000 희석물이었다(Pierce Biotechnology, Rockford, IL). 표 21은  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 포함하는 복수가 면역침강 검정에 의해 SNAP-25<sub>197</sub>-절단 생성물을 특이적으로 끌어내렸다는 것을 나타낸다. 면역침강 검정에서 클론 2E2A6 및 3C1A5으로부터 생산된 복수는 SNAP-25<sub>206</sub> 절단안된 기질에 대해 이러한

절단 생성물의 선호적 인식을 허용하는 SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물에 대한 높은 결합 특이성을 가지는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체를 합성한다는 것을 나타내었다.

**표 21.  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체를 포함하는 클론 복수의 분석**

클론	세포-기반 분석		면역세포화학		면역침강	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
1D3B8	++	-	++	-	테스트안함	테스트안함
1G10A12	++	++	테스트안함	테스트안함	테스트안함	테스트안함
2C9B10	++	-	++	-	테스트안함	테스트안함
2E2A6	++	-	++	-	++	-
2F11B6	+	+	+	+	테스트안함	테스트안함
3C1A5	++	-	++	-	++	-
3C3E2	+	-	테스트안함	테스트안함	테스트안함	테스트안함
MC-6050	-	+	테스트안함	테스트안함	테스트안함	테스트안함
MC-6053	-	+	테스트안함	테스트안함	테스트안함	테스트안함
SMI-81	-/+	++	테스트안함	테스트안함	테스트안함	테스트안함

### 5. $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의 결합 친화도 평가.

SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물 또는 SNAP-25<sub>206</sub> 절단안된 기질에 대한 높은 결합 특이성을 보이는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의 결합 친화도를 결정하기 위하여, 카르복시메틸 렉스트란 (CM5) 센서 칩(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)을 이용한 BIAcore 3000 기구에서 결합 친화도 검정을 실시하였다. 10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM 염화 나트륨, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) 계면활성제 P20를 포함하는 HBS-EP 완충액에서 25°C, 10  $\mu$ l/min의 유속에서 이동을 실행하였다. 서열번호: 5의 아미노산 134-197 (SNAP-25<sub>134-197</sub>) 또는 서열번호: 5의 아미노산 134-206 (SNAP-25<sub>134-206</sub>)을 포함하는 SNAP-25 웨პ티드를 표준 아민 커플링을 이용하여 CM5 센서 칩의 표면에 공유적으로 부착하였다. 간단히 설명하면, 0.2M 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 및 0.05M N-하이드록시숙시니미드 혼합물의 7분 주사에 의해 CM5 칩을 활성화시켰고; 그 다음 SNAP-25 웨პ티드를 분당 10  $\mu$ l 유속으로 20분간 10 mM 아세테이트 나트륨(pH 4.0) 안에서 주사하였고; 그리고 반응안된 숙시니미드 에스테르는 1 M 에탄올 아민 하이드로클로라이드, pH 8.5의 7분 주사에 의해 차단시켰다. 칩상에서 고정된 SNAP-25<sub>134-197</sub> 또는 SNAP-25<sub>134-206</sub>의 양은 반응 단위에서 100-150배 증가에 의해 반영되었다(약 0.10-0.15ng/mm<sup>2</sup>). 클론 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, 및 3C3E2으로부터 생산된 복수 또는 정제된 단클론 항체, 그리고, 상업적으로 이용가능한  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 포함하는 항체 시료를 10분의 연합 시간 및 20분의 해리 시간을 허용하도록 CM5 칩 표면을 통과시켰다. 10 mM 글리신-HCl (pH 2.5)을 분당 15  $\mu$ l의 유속으로 1분 주사함으로써 주행 간에 표면이 재생되었다. BIAevaluation 3.0 소프트웨어를 이용하여 1:1 동역학 결합 모델에 센스그램(Sensorgram) 곡선을 설정하였다.

결과는 2E2A6 및 3C1A5는 모두 SNAP-25 절단안된 기질보다 절단된 SNAP-25<sub>197</sub> 생성물에 대해 더 특이적임을 나타낸다(표 22). MC-6050 및 MC-6053의 결합 친화도과 비교하여, 1D3B6은 이러한 상업적 항체와 비교하여 SNAP-25 절단 생성물에 대해 약 10배 더 큰 평형 해리 상수를 가졌다(표 22). 흥미로운 것은, 2E2A6은 이러한 상업적 항체와 비교하여 SNAP-25 절단 생성물에 대해 약간 더 낮은 평형 해리 상수를 가졌다(0.405 nM vs. 0.497 및 0.508)(표 22). 이러한 상업적  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 어느 것도 SNAP-25 절단 생성물 (표 21)을 선택적으로 인지하지 못하였기 때문에, 이러한 선택성을 얻기 위한 임계치인 약 0.5 nM 미만의 평형 해리 상수가 나타났다. 유사하게, MC-6050 및 MC-6053의 결합 친화도과 비교하여, 2E2A6은 최소한 약 1배 더 느린 오프 레이트/해리 상수를 가졌다( $6.74 \times 10^{-5}$  vs  $8.82 \times 10^{-4}$  s<sup>-1</sup> 및  $1.18 \times 10^{-3}$  s<sup>-1</sup>) (표 22). 추가로, SNAP-25 절단 생성물에 대하여 선택적 결합을 얻기 위한 임계치인 약  $8.82 \times 10^{-4}$  미만의 오프 레이트/해리 상수가 부분적으로 나타났다. 이러한 결과는  $5.78 \times 10^{-5}$  s<sup>-1</sup>의 오프 레이트/해리 상수를 가지는 1D3B8과 일치한다(표 22).

표 22.  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체 결합 친화력 분석

SPR 매개변수	1D3B8		2E2A6	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>a</sup>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>b</sup>
Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1.06 x 10 <sup>6</sup>	—	1.70 x 10 <sup>6</sup> (1.66 x 10 <sup>5</sup> )	— (—)
Kd (s <sup>-1</sup> )	5.78 x 10 <sup>-5</sup>	—	1.53 x 10 <sup>-4</sup> (6.74 x 10 <sup>-5</sup> )	— (—)
KD (nM)	0.050	—	0.090 (0.405)	— (—)
SPR 매개변수	3C1A5		2C9B10	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>c</sup>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>d</sup>
Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2.17 x 10 <sup>5</sup>	—	1.15 x 10 <sup>4</sup>	—
Kd (s <sup>-1</sup> )	2.88 x 10 <sup>-4</sup>	—	3.11 x 10 <sup>-4</sup>	—
KD (nM)	1.33	—	27.1	—
SPR 매개변수	MC-6050		MC-6053	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1.78 x 10 <sup>6</sup>	3.06 x 10 <sup>2</sup>	2.32 x 10 <sup>6</sup>	1.06 x 10 <sup>2</sup>
Kd (s <sup>-1</sup> )	8.82 x 10 <sup>-4</sup>	6.07 x 10 <sup>-3</sup>	1.18 x 10 <sup>-3</sup>	2.56 x 10 <sup>-5</sup>
KD (nM)	0.497	19,800	0.508	240

<sup>a</sup> 10 분의 연합 시간 후 CM5 센서 칩의 표면에 최대 125 nM 의  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체 1D3B8 을  
통과시켰을 때 결합이 관찰되지 않았다.  
<sup>b</sup> 10 분의 연합 시간 후 CM5 센서 칩의 표면에 최대 10  $\mu$ M 의  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체 2E2A6 을  
통과시켰을 때 결합이 관찰되지 않았다.  
<sup>c</sup> 10 분의 연합 시간 후 CM5 센서 칩의 표면에 최대 100 nM 의  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체 3C1A5 를  
통과시켰을 때 결합이 관찰되지 않았다.  
<sup>d</sup> 10 분의 연합 시간 후 CM5 센서 칩의 표면에 최대 100 nM 의  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체 2C9B10 를  
통과시켰을 때 결합이 관찰되지 않았다.

[0351]

[0352] 6개의 상이한 항체를 비교하기 위하여, BIA 평가 4.1 소프트웨어의 프로그램을 이용하여 각각에 대한 온-레이트(ka) 및 오프-레이트(kd)를 표준화하였다. 온-레이트 비교를 위하여, 재생 부분 및 주사 스파이크(injection spikes)를 제거함으로써 우선 데이터를 개별적으로 다듬었고, 그 다음 0 내지 100 등급으로 표준화하였다. 오프-레이트 비교를 위하여, 데이터를 주사 중단/정점에 대해 표준화하였다. 2C9B10은 다른 항체들보다 더 느린 온-레이트를 가졌으며(도 7A), MC-6053은 다른 항체들보다 훨씬 빠른 오프-레이트를 가졌다(도 7B)는 것을 이러한 검정에서 보여주었다. MC-6053의 빠른 오프-레이트는 이 항체가 세척 단계 동안 기질 항체에 결합된 상태로 유지하기 어려울 것이기 때문에 본 명세서에서 공개하는 방법에 잘 맞지 않음을 나타낸다.

#### 6. 단리된 $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체로부터 에피토프의 서열화.

[0353] BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 선택적으로 결합할 수 있는 단리된  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체의 에피토프를 결정하기 위하여, 하이브리도마 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 및 3C3E2에 의해 생산되는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체의 가변 중쇄(V<sub>H</sub>) 및 가변 경쇄(V<sub>L</sub>)를 인코드하는 폴리뉴클레오티드 분자를 서열화하였다. 표준 프로토콜을 이용하여 각 하이브리도마로부터 mRNA를 추출하였고, 정제하였으며, 그리고 올리고 dT 항-센스 프라이머 또는 유전자-특이적 (뮤린 IgG1 CH 및 kappa CL) 항-센스 프라이머를 이용하여 cDNA로 역 전사시켰다. 특이적 뮤린 및 인간 불변 도메인 프라이머를 이용하여 cDNA 생성 후 PCR을 이용하여 cDNA를 증폭시켜, 항체의 이소타입을 결정하였다. 축퇴 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 프라이머를 이용하여 cDNA로부터 가변 도메인을 증폭하였다. 5'RACE의 경우, cDNA의 3'단부에 동종플리미 dCTP 꼬리를 추가하였다. 그 다음 중쇄 및 경쇄는 올리고 dG 센스 프라이머 및 유전자 특이적 (CH/KC) 항-센스 프라이머로 증폭하였다. PCR 생성물은 신호 웹티드의 서열, 항-센스 프라이머까지 가변 도메인 및 불변 도메인을 포함한다. PCR 생성물을 겔 정제하여 작은 단편을 제거하고, 서열화를 위하여 블런트 또는 TA 벡터로 클론하였다. 각 쇄에 대해 5개

의 독립 클론을 서열화하고,  $V_H$  및  $V_L$  쇄의 배열 및 콘센서스 서열을 결정하였다.  $V_H$  및  $V_L$  아미노산 서열을 결정하는데 이용되는 방법들은 예컨대, Roger A. Sabbadini, et al., *Novel Bioactive Lipid Derivatives and Method of Making and Using Same*, 미국 특허공개 2007/0281320; 및 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.* 3743-3752에서 설명하고 있으며, 각각은 전문이 참고문헌에 통합된다. 게다가, 항체의 가변 중쇄 ( $V_H$ ) 및 가변 경쇄 ( $V_L$ )를 서열화하고, CDR 부분을 확인하기 위한 상업적 서비스를 이용할 수 있다. 예컨대, Fusion Antibodies Ltd., Northern Ireland 참고. 한 가지 경우에서, 3C1A5  $V_L$  부분의 경우, 고해상 2DE 전기영동에 의해 친화도 정제된 항체를 분리시키고, 그 다음 단백질가수분해 절단 후, 단백질을 고해상 nanoLC-MSMS를 이용한 펩티드 단편화 평거프린트 검정을 받게함으로써, 아미노산 서열을 또한 결정하였다.

[0355]

본 명세서에서 공개한 하이브리도마에 의해 생산된  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의  $V_H$  및  $V_L$  쇄를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열은 다음과 같다: 1D3B8  $V_H$  (서열번호: 71), 2C9B10  $V_H$  (서열번호: 73), 2E2A6  $V_H$  (서열번호: 75), 3C1A5  $V_H$  (서열번호: 77), 3C3E2  $V_H$  변이체 1 (서열번호: 79), 3C3E2  $V_H$  변이체 2 (서열번호: 81), 3C3E2  $V_H$  변이체 3 (서열번호: 132), 1D3B8  $V_L$  (서열번호: 83), 2C9B10  $V_L$  (서열번호: 85), 2E2A6  $V_L$  (서열번호: 87), 3C1A5  $V_L$  (서열번호: 89), 및 3C3E2  $V_L$  (서열번호: 91). 본 명세서에서 공개한 하이브리도마에 의해 생산된  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의  $V_H$  및  $V_L$  쇄를 포함하는 아미노산 서열은 다음과 같다: 1D3B8  $V_H$  (서열번호: 72), 2C9B10  $V_H$  (서열번호: 74), 2E2A6  $V_H$  (서열번호: 76), 3C1A5  $V_H$  (서열번호: 78), 3C3E2  $V_H$  변이체 1 (서열번호: 80), 3C3E2  $V_H$  변이체 2 (서열번호: 82); 3C3E2  $V_H$  변이체 2 (서열번호: 133), 1D3B8  $V_L$  (서열번호: 84), 2C9B10  $V_L$  (서열번호: 86), 2E2A6  $V_L$  (서열번호: 88), 3C1A5  $V_L$  (서열번호: 90), 및 3C3E2  $V_L$  (서열번호: 92). 하이브리도마 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, 및 3C3E2에 의해 생산된  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의  $V_H$  및  $V_L$  CDR 도메인을 포함하는 아미노산 서열은 표 23에서 제공한다.

표 23.  $\alpha$ -SNAP-25 단클론 항체로부터  $V_H$  및  $V_L$  도메인의 CDR 서열

CDR	서열	다음에서 확인됨	서열 번호:
$V_H$ 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
$V_L$ CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
$V_L$ CDR 1	KSSQSLLYTNKGKTYLT	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	YASQSI	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

[0356]

본 명세서에서 공개한 하이브리도마에 의해 생산된  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의  $V_H$  CDR 도메인 변이체를 포함하는 아미노산 서열의 비제한적 예는 1D3B8의 경우  $V_H$  CDR1 변이체 서열번호: 118; 2C9B10, 2E2A6 및 3C1A5  $V_H$ 의 경우  $V_H$  CDR1 변이체 서열번호: 119; 3C1A5  $V_H$  및 3C3E2 변이체 3의 경우  $V_H$  CDR1 변이체 서열번호: 120; 1D3B8 및 2E2A6의 경우  $V_H$  CDR2 변이체 서열번호: 121; 2C9B10 및 3C1A5  $V_H$ 의 경우  $V_H$  CDR2 변이체 서열번호: 122; 3C1A5  $V_H$  및 3C3E2 변이체 3의 경우  $V_H$  CDR2 변이체 서열번호: 123; 1D3B8 및 2C9B10의 경우  $V_H$  CDR3 변이체 MDY; 2E2A6 및 3C1A5  $V_H$ 의 경우  $V_H$  CDR3 변이체 MGY; 그리고 3C1A5  $V_H$  및 3C3E2 변이체 3의 경우  $V_H$  CDR3 변이체 서열번호: 124를 포함한다. 본 명세서에서 공개한 하이브리도마에 의해 생산된  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의  $V_L$  CDR 도메인 변이체를 포함하는 아미노산 서열의 비제한적 예는 1D3B8의 경우  $V_L$  CDR1 변이체 서열번호: 125; 2C9B10의 경우  $V_L$  CDR1 변이체 서열번호: 126; 2E2A6의 경우  $V_L$  CDR1 변이체 서열번호: 127; 3C1A5의 경우  $V_L$  CDR1 변이체 서열번호: 128; 3C3E2의 경우  $V_L$  CDR1 변이체 서열번호: 129; 1D3B8의 경우  $V_L$  CDR2 변이체 KVS; 2C9B10의 경우  $V_L$  CDR2 변이체 NAK; 2E2A6의 경우  $V_L$  CDR2 변이체 LVS; 3C1A5의 경우  $V_L$  CDR2 변이체 YAT; 그리고 3C3E2의 경우  $V_L$  CDR2 변이체 YAS를 포함한다.

[0358]

### 실시예 VIII

[0359]

BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 자유 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체의 개발

[0360]

다음의 실시예는 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의  $P_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 에피토

프에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 다클론 항체를 어떻게 만드는지를 설명한다.

[0361] BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 자유 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체의 개발하기 위하여, SNAP-25 절단 생성물을 항원으로 10개-잔기 웨티드 CGGGRIDEANQ (서열번호: 46)를 기획하였다. KLH에 콘쥬게이트시키기 위한 N 말단 시스테인 잔기, 인간 SNAP-25 (서열번호: 5)의 아미노산 191-197에 연결된 G-스페이서 유연한 스페이서(GGG)를 포함하는 이 웨티드는 카르복실화된 C 말단 글루타민을 가진다. Blast 조사에서 이 웨티드는 SNAP-25에만 높은 상동성을 가지고, 뉴런 세포에 있는 다른 단백질과의 교차 반응 가능성은 거의 없는 것으로 나타났다. 수치료법 색인(hydropathy index), 단백질 표면 개연성, 유연성 부위들 그리고 선호하는 2차 구조, 이어서 적절한 방향 및 선택된 웨티드 서열의 제공을 판단하기 위하여 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 이 서열을 또한 면밀히 조사하였다. 이 웨티드를 합성하고, 면역원성을 증가시키기 위하여 Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)에 콘쥬게이트시켰다. 동물을 면역화하기 전, 세포 용해물에 존재하는 단백질에 대해 면역반응성이 없는 동물을 확인하기 위하여 Western 블랏에서 후보 세포주의 세포 용해물에 대해 고유 토끼를 우선 스크리닝하였다. 두 가지 사전-스크리닝된 토끼를 이 웨티드로 면역화시키고, 약 8주 이내에 3회 면역화 후, 테스트를 위하여 토끼로부터 채혈하였다. 혈액은 4°C에서 60분간 항온처리하여 응고되도록 하였다. 응고된 혈액은 10,000× g, 4°C에서 10분간 원심분리하여, 세포 찌꺼지를 펠렛화하였다. 생성된 혈청 시료는 50 $\mu$ l 분취량으로 분배하여, 필요할 때까지 -20°C에 보관하였다.

[0362] 본 명세서에서 공개하는 다른 SNAP-25 항원에 근거한 유사한 방법을 이용하여 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 다클론 항체를 개발한다. 예를 들면, 서열번호: 47의 SNAP-25 항원을 서열번호: 46의 SNAP-25 항원을 대신하여 KLH에 콘쥬게이트시킬 수 있다. 또 다른 예로서, 서열번호: 38의 SNAP-25 항원으로부터 인간 SNAP-25의 아미노산 191-197를 서열번호: 33, 서열번호: 34, 서열번호: 35, 서열번호: 36, 서열번호: 37, 서열번호: 39, 서열번호: 40, 서열번호: 41, 서열번호: 42, 서열번호: 43, 또는 서열번호: 44로 대체할 수 있다.

## 2. $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체의 존재에 대한 스크리닝.

[0364] BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체의 존재를 판단하기 위하여, 실시예 III에서 설명한 것과 같이 추출한 토끼 혈청을 이용하여 비교 ELISA 및 세포 기반 절단 검정을 실시하였다. 양쪽 토끼의 혈청 모두 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체를 포함하였다.  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 다클론성 항체는 NTP 22 및 NTP 23으로 명명하였다.

## 3. $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체의 정제.

[0366] BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체를 정제하기 위하여, 서열번호: 46의 SNAP-25 항원을 포함하는 친화도 컬럼을 이용하여 토끼 혈청으로부터 NTP 22 및 NTP 23 항체를 정제하였다.

## 4. $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체의 결합 특이성 평가.

[0368] BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 항원에 선택적으로 결합할 수 있는  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체의 결합 특이성을 평가하기 위하여, 정제된 NTP 22 및 NTP 23  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체를 이용하여 실시예 III에서 설명한 것과 같이, 세포 기반 활성 검정, 면역세포화학 및 면역침강을 이용하여 절단 생성물을 탐지하였다. 세포 기반 절단 검정, 면역세포화학 검정 및 면역침강 검정 모두에서 NTP 22 및 NTP 23  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체는 절단안된 SNAP-25와 교차 반응하지 않는 것으로 나타났다. 따라서, NTP 22 및 NTP 23은 모두 SNAP-25<sub>206</sub> 절단안된 기질에 비교하여 이러한 절단 생성물의 선호적인 인식을 허용하는 SNAP-25<sub>197</sub> 절단 생성물에 대한 높은 결합 특이성을 가진다. 항원에 대한 친화도는 실시예 III에서 설명하는 것과 같이, BiAcore에서 SPR을 이용하여 결정할 수 있다.

## 실시예 IX

### 샌드위치 ELISA를 위한 성분 및 조건 준비

[0371] 다음의 실시예는 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 특이적인  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체를 이용하여 SNAP-25 절단 생성물을 탐지함으로써, 재표적화된 엔도펩티다제 활

성을 검출하는 면역 기반 방법의 실행에 유용한 샌드위치 ELISA를 실행하는데 필수적인 성분 및 조건들을 어떻게 확인하고, 준비하는지를 설명한다.

### 1. 재표적화된 엔도펩티다제로 처리된 세포로부터 세포 용해물의 준비.

[0372] 검정을 위한 재표적화된 엔도펩티다제 처리된 세포 용해물을 수득하기 위하여, Neuro-2a의 보존 배양물로부터 적당한 밀도의 세포를 최소 필수 배지, 2 mM GlutaMAX™ I 와 Earle 염, 1 x B27 보충제, 1 x N2 보충제, 0.1 mM 비-필수 아미노산, 10 mM HEPES를 포함하는 무혈청 배지 50mL를 포함하는 T175 플라스크안에 접종하였다. 이러한 세포들은 성장 억제 및 신경돌기 연장과 같은 표준의 그리고 통상적인 형태학적 기준에 의해 평가할 때, 세포가 분화될 때까지(대략 2-3일) 5% 이산화탄소하에 37°C 배양기에서 배양하였다. 기준으로, Neuro-2a의 보존 배양물로부터 적당한 밀도의 세포를 적합한 성장 배지 50mL를 포함하는 T175 플라스크에 접종하였다(표 1). 이러한 미분화된 기준 세포는 50% 핵심에 도달할 때까지(대략 18시간) 5% 이산화탄소하에 37°C 배양기에서 성장시켰다. 분화된 배양물 및 미분화된 기준 배양물의 배지 모두를 각 웰로부터 흡출시키고, OnM (처리안된 시료) 또는 10 nM의 재표적화된 엔도펩티다제를 포함하는 새로운 배지로 대체하였다. 하룻밤 동안 항온처리 후, 세포를 세척하였고, 새로 준비한 Triton X-100 용해 완충액 (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100)에서, 일정하게 교반시키면서, 4°C에서 30분간 용해시킴으로써, 세포를 수화하였다. 벤치-탑 원심 분리기를 이용하여 찌꺼기를 제거하기 위하여 용해된 세포를 4°C, 4000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 세포 용해물의 단백질 농도는 Bradford 검정으로 측정하였다.

### 2. 샌드위치 ELISA 성분의 준비 및 확인.

[0375] 적합한 포획 항체-검출 항체 쌍을 확인하기 위하여, ECL 샌드위치 ELISA 검정은 상이한 11개  $\alpha$ -SNAP-25 포획 항체와 상이한 7개  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 (표 12)를 포함하는 포획 및 검출 항체 쌍의 26개 상이한 조합에서 실시하였다. 이용된  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 본 명세서에서 공개된 2E2A6 및 3C1A5  $\alpha$ -SNAP-25 마우스 단클론성 항체, SMI-81, MC-6050, 그리고 본 명세서에서 공개된 MC-6053  $\alpha$ -SNAP-25 마우스 단클론성 항체, NTP 23  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 단클론성 항체, S9684  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 단클론성 항체 (Sigma, St. Louis, MO), H-50  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 단클론성 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), C-18  $\alpha$ -SNAP-25 염소 단클론성 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), N-19  $\alpha$ -SNAP-25 염소 단클론성 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), 그리고 SP12  $\alpha$ -SNAP-25 마우스 단클론성 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)이었다.

[0376] 포획 항체 용액을 준비하기 위하여, 하이브리도마 세포주 2E2A6 및 3C1A5의 복수에 포함된  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체 그리고  $\alpha$ -SNAP-25 MC-6050 및 MC-6053 단클론성 항체는 표준 단백질 A 정제 프로토콜을 이용하여 정제하였다. 모든 다른  $\alpha$ -SNAP-25 항체는 정제된 항체로 구입하였다.

[0377] 검출 항체 용액을 준비하기 위하여, 적합한  $\alpha$ -SNAP-25 항체를 제조업자의 지시에 따라(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD), 루테늄(II)-트리스-비페리딘-(4-메틸술포네이트) NHS 에스테르 라벨링 시약(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)에 콘쥬게이트하였다. 중류수 재구성된 MSD SULFO-TAG™ 저장 용액 30 $\mu$ L를 200 $\mu$ L의 2 mg/mL  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체에 추가하고, 어두운 상태, 실온에서 2시간 동안 반응물을 항온처리함으로써 콘쥬게이션 반응을 실시하였다. 라벨된 항체는 표준 스픈 컬럼 프로토콜을 이용하여 정제하였고, 그리고 표준 비색 단백질 검정을 이용하여 단백질 농도를 결정하였다.  $\alpha$ -SNAP-25 항체/MSD SULFO-TAG™ 콘쥬게이트의 흡수도는 분광광도계를 이용하여 455nm에서 측정하여, 리터당 몰 농도를 결정하였다. 검출 항체 용액은 필요할 때 까지 4°C에 보관하였다.

[0378] SNAP-25 절단 생성물에 특이적인 포획 항체를 포함하는 고형 상 지지물을 준비하기 위하여, 대략 5 $\mu$ L의 적합한  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체 용액 (1×PBS 중 20 $\mu$ g/mL)을 96-웰 MSD High Bind 평판의 각 웰에 추가하고, 용액을 액체 기화시키기 위하여 2-3시간 동안 생물학적 안정성 캐비넷 안에서 공기 건조되도록 둔다. 포획 항체-결합된 웰에 2% Amersham 차단 시약 (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) 및 10% 염소 혈청 (VWR, West Ch에스테르, PA)을 포함하는 150 $\mu$ L 차단 완충액을 첨가하여 실온에서 2시간 동안 차단시켰다. 차단된 평판을 밀봉하였고, 필요할 때 까지 4°C에 보관하였다.

[0379] ECL 샌드위치 ELISA 검정에 의해 절단된 SNAP-25 절단 생성물의 존재를 탐지하기 위하여, 보관된 평판으로부터 차단 완충액을 웰로부터 흡출시켰고, 상기에서 설명하는 것과 같이 재표적화된 엔도펩티다제로 처리된 세포의 용해물 25 $\mu$ L를 각 웰에 첨가하였고, 하룻밤 동안 4°C에서 항온처리하였다. 세포 용해물을 흡출시키고, 각 웰을 200 $\mu$ L 1×PBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)으로 3회 행궈냄으로써 평판 웰

을 3차례 세척하였다. 세척 후, 1×PBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트) 중 2% Amersham 차단 시약을 포함하는 5 $\mu$ g/mL 검출 항체 용액 25 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하였고, 평판을 밀봉하였고, 밀봉된 평판은 교반하면서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 검출 항체 항온처리 후, 200 $\mu$ l 1×PBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)으로 웰을 3회 세척하였다. 세척 후, 150 $\mu$ l의 1× Read 완충 액 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)을 각 웰에 첨가하였고, SECTOR™ Imager 6000 Image Reader (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)를 이용하여 평판을 판독하였다. 각 항체-쌍에 대하여 10nM 복용량에서 수득한 신호를 각 항체 쌍에 대하여 0nM에서 수득한 신호로 나누어 비율을 계산하였다(표 24). 이러한 결과는 테스트된 26개 상이한 항체 쌍 조합중에 오직 3개의 항체쌍만 테스트된 고 복용량에 대해 10:1 이상의 신호-대-노이즈 비율을 가졌다는 것을 나타낸다: 쌍 번호 1 (2E2A6 마우스 mAb 및 S9684 토끼 pAb), 쌍 번호 4 (3C1A5 마우스 mAb 및 S9684 토끼 pAb), 그리고 쌍 번호 18 (S9684 토끼 pAb 및 2E2A6 마우스 mAb). 추가 검정 개발용으로 항체 쌍 1을 선택하였다.

표 24.  $\alpha$ -SNAP-25 항체 조합의 스크리닝

항체 쌍 번호	포획 항체	탐지 항체	SNAP-25 절단 산물의 탐지	SNAP-25 절단안된 기질의 탐지	신호/노이즈 비율 (10 nM/0 nM)
1	2E2A6 마우스 mAb	S9684 토끼 pAb	유	무	26.6:1
2	2E2A6 마우스 mAb	N-19 염소 pAb	유	무	7.3:1
3	2E2A6 마우스 mAb	H-50 토끼 pAb	유	무	0.9:1
4	3C1A5 마우스 mAb	S9684 토끼 pAb	유	무	12.1:1
5	3C1A5 마우스 mAb	N-19 염소 pAb	유	무	1.9:1
6	3C1A5 마우스 mAb	H-50 토끼 pAb	유	무	0.9:1
7	C-18 염소 pAb	S9684 토끼 pAb	무	무	0.8:1
8	C-18 염소 pAb	N-19 염소 pAb	무	무	0.9:1
9	C-18 염소 pAb	H-50 토끼 pAb	무	무	0.9:1
10	H-50 토끼 pAb	2E2A6 마우스 mAb	유	무	0.9:1
11	H-50 토끼 pAb	C-18 염소 pAb	무	무	1.0:1
12	N-19 염소 pAb	2E2A6 마우스 mAb	유	무	0.9:1
13	N-19 염소 pAb	C-18 염소 pAb	무	무	1.1:1
14	NTP 23 토끼 pAb	N-19 염소 pAb	유	무	1.2:1
15	NTP 23 토끼 pAb	C-18 염소 pAb	무	무	1.1:1
16	NTP 23 토끼 pAb	SP12 마우스 pAb	유	무	1.3:1
17	NTP 23 토끼 pAb	H-50 토끼 pAb	유	무	1.1:1
18	S9684 토끼 pAb	2E2A6 마우스 mAb	유	무	21.3:1
19	S9684 토끼 pAb	C-18 염소 pAb	무	무	0.7:1
20	S9684 토끼 pAb	SMI-81 마우스 mAb	유	유	1.2:1
21	SMI-81 마우스 mAb	S9684 토끼 pAb	유	유	1.1:1
22	SMI-81 마우스 mAb	N-19 염소 pAb	유	유	1.0:1
23	SMI-81 마우스 mAb	C-18 염소 pAb	무	무	0.8:1
24	SP12 마우스 pAb	C-18 염소 pAb	무	무	1.0:1
25	MC-6050 마우스 mAb	S9684 토끼 pAb	유	유	5.0:1
26	MC-6053 마우스 mAb	S9684 토끼 pAb	유	유	7.1:1

[0380]

실시예 X

[0381]

ECL 샌드위치 ELISA를 이용하여 BoNT/A 경쇄 효소적 활성을 가진 재표적화된 엔도펩티다제의 탐지하는 면역 기반 방법

[0382]

다음의 실시예는 ECL 샌드위치 ELISA에 의해 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의 P<sub>1</sub> 잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25 절단 생성물에 특이적인  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체를 이용하여 SNAP-25 절단 생성물을 탐지함으로써 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 탐지하는 면역 기반 방법을 설명한다.

[0383]

BoNT/A 경쇄 효소적 활성을 가진 재표적화된 엔도펩티다제로 처리된 세포로부터 용해물을 준비하기 위하여, 확

립된 세포주의 적당한 밀도의 세포를  $100\mu\text{l}$ 의 적합한 배지를 포함하는 96-웰 조직 배양 평판의 웰에 도말하였다. 이러한 세포는 약 24시간 동안 5% 이산화탄소하에  $37^\circ\text{C}$  배양기에서 항온처리하였다. 세포의 배지를 각 웰로부터 흡출하였고, 0 (처리안된 시료) 또는 재표적화된 엔도펩티다제에 대해 복용량-반응 실험으로부터 결정한 복용량중 하나를 포함하는 새로운 배지로 대체하였다. 24시간 항온처리 후, 세포를 세척하였고, 수확하였다.

[0385]  $\alpha$ -SNAP-25 포획 항체 용액을 준비하기 위하여, 하이브리도마 세포주 2E2A6의 복수에 포함된  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체는 표준 단백질 A 정제 프로토콜을 이용하여 정제하였다.  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 용액을 준비하기 위하여,  $\alpha$ -SNAP-25 토끼 다클론성 항체 S9684 (Sigma, St. Louis, MO)를 제조업자의 지시에 따라 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 루테늄(II)-트리스-비페리딘-(4-메틸술포네이트) NHS 에스테르 라벨링 시약 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)에 콘쥬게이트하였다. 콘쥬게이트 반응, 라벨된  $\alpha$ -SNAP-25 항체의 정제, 농도 측정 및 보관은 실시예 VI에서 설명한 것과 같다.

[0386] SNAP-25 절단된 생성물에 특이적인 포획 항체를 포함하는 고형 상 지지물을 준비하기 위하여, 대략  $5\mu\text{l}$ 의  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체 2E2A6 용액 ( $1\times$ PBS 중  $20\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 96-웰 MSD High Bind 평판의 각 웰에 첨가하였고, 그리고 용액을 액체 기화시키기 위하여 2-3시간 동안 생물학적 안정성 캐비넷 안에서 공기 건조되도록 둔다. 포획 항체-결합된 웰을 차단시키고, 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는데 바로 사용하였다.

[0387] ECL 샌드위치 ELISA 검정에 의해 절단된 SNAP-25 생성물의 존재를 탐지하기 위하여, 보관된 평판의 차단 완충액을 웰로부터 흡출시키고, 재표적화된 엔도펩티다제 처리된 세포로부터 용해물을  $25\mu\text{l}$ 을 각 웰에 첨가하였고, 평판을  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 항온처리하였다. 세포 용해물을 흡출하고, 각 웰을  $200\mu\text{l}$ 의  $1\times$ PBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)로 3회 헹굼으로써 평판 웰을 3차례 세척하였다. 세척 후,  $1\times$ PBS 중 2% Amersham 차단 시약, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)을 포함하는  $5\mu\text{g}/\text{mL}$  검출 항체 용액  $25\mu\text{l}$ 을 각 웰에 첨가하였고, 평판을 밀봉하였고, 밀봉된 평판은 교반시키면서 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 검출 항체 항온처리 후, 웰을  $200\mu\text{l}$ 의  $1\times$ PBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)로 3회 세척하였다. 세척 후,  $150\mu\text{l}$ 의 1 x Read 완충액 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)을 각 웰에 첨가하였고, SECTOR™ Imager 6000 Image Reader (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)를 이용하여 평판을 판독하였다. 실시예 VI에서 설명한 것과 같이 수집한 데이터를 검정하였고,  $\text{EC}_{50}$ 을 계산하였다. 오피오이드 재표적화된 엔도펩티다제의 경우,  $\text{EC}_{50}$ 에서 하위 점근선의 경우 약 15: 1 내지 약 20:1의 신호 대 노이즈 비율과 상위 점근선의 경우 약 180:1 내지 약 300:1의 신호 대 노이즈 비율과 함께 평균  $1.0 \text{ nM Noc/A}$  (약  $0.3 \text{ nM}$  내지 약  $2.0 \text{ nM}$ 의 범위)의  $\text{Noc/A}$ 이 탐지되었다는 것이 결과에서 나타났다.

#### 실시예 XI

[0388] CL 샌드위치 ELISA를 이용하여 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 면역 기반 방법

[0389] 다음의 실시예는 CL 샌드위치 ELISA에 의해 BoNT/A 분열 부위 분리되기 쉬운 결합의  $\text{P}_1$  잔기에서 카르복실 말단을 가지는 SNAP-25에 특이적인  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체를 이용하여 SNAP-25 절단 생성물을 탐지함으로써 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 탐지하는 면역 기반 방법을 설명한다.

[0390] 재표적화된 엔도펩티다제로 처리된 세포로부터 용해물과  $\alpha$ -SNAP-25 포획 항체 용액은 실시예 VII에서 설명한 것과 같이 준비할 것이다.

[0391]  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 용액을 준비하기 위하여, 제조업자의 지시에 따라 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL),  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체 S9684 (Sigma, St. Louis, MO)를 말 양고추냉이 과산화효소(HRP)에 콘쥬게이트시킬 것이다.  $1 \text{ mg}/\text{mL}$   $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체  $500\mu\text{l}$ 을 동결건조된 활성화 과산화효소를 포함하는 바이알에 넣고, 성분들을 혼합하고, 그 다음  $10\mu\text{l}$ 의 시아노보로하이드라이드 나트륨을 첨가함으로써, 콘쥬게이트 반응을 실행할 것이다. 이 반응 혼합물을 연기 후드안, 실온에서 1시간 동안 항온처리할 것이다. 반응을 켄칭시킨 후, 라벨된 항체는 표준 스펜 컬럼 프로토콜을 이용하여 정제할 것이며, 표준 비색 단백질 검정을 이용하여 단백질 농도를 결정할 것이다.  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체/HRP 콘쥬게이트의 흡수도는 리터당 몰 농도를 결정하기 위하여 분광광도계를 이용하여  $455 \text{ nm}$ 에서 측정할 것이다.  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 용액은 필요할 때까지  $4^\circ\text{C}$ 에서 보관할 것이다.

[0392] SNAP-25 절단된 생성물에 특이적인  $\alpha$ -SNAP-25 포획 항체를 포함하는 고형 상 지지물을 준비하기 위하여, 대략  $100\mu\text{l}$ 의  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체 2E2A6 용액 ( $1\times$ PBS 중  $1 \text{ mg}/\text{mL}$ )을 96-웰 Greiner 백색 평판의 각 웰에 첨

가할 것이며, 평판을 4°C에서 하룻밤 동안 항온처리할 것이며, 그 다음 임의의 과량의 항체 용액은 버릴 것이다. 포획 항체-결합된 웰은 2% Amersham 차단 시약 (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) 및 10% 염소 혈청 (VWR, West Ch에스테르, PA)을 포함하는 150 $\mu$ l 차단 완충액을 실온에서 1시간 첨가하여 차단시킬 것이다. 차단 완충액을 버릴 것이며, 평판은 페이퍼 타올 위에서 뒤집어 두드림으로써 건조 블릿팅시킬 것이다. 그 다음 포획 항체-결합된 웰을 차단시킬 것이며, 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는데 바로 사용할 것이다.

[0394] CL 샌드위치 ELISA 검정에 의해 절단된 SNAP-25 생성물의 존재를 탐지하기 위하여, 재표적화된-엔도펩티다제로 처리된 세포의 용해물 50 $\mu$ l를 각 웰에 첨가할 것이며, 평판을 밀봉할 것이며, 밀봉된 평판은 500rpm에서 회전하는 교반기 상에서 하룻밤 동안 4°C, 2-4시간 동안 항온처리할 것이다. 세포 용해물을 흡출시키고, 각 웰을 200 $\mu$ l 1×PBS, 0.05 % TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)으로 3회 세척함으로써 평판 웰을 3회 세척할 것이다. 세척 후, 1×PBS 중 2% Amersham 차단 시약, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)을 포함하는 1 mg/mL  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체/HRP 검출 항체 용액 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가할 것이며, 평판을 밀봉할 것이며, 그리고 밀봉된 평판은 650rpm에서 회전하는 교반기 상에서 실온에서 1시간 동안 항온처리할 것이다. 검출 항체 항온처리 후, 200 $\mu$ l 1×PBS, 0.05% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)로 3회 웰을 세척할 것이다. 세척 후, 100 $\mu$ l의 SuperSignal ELISA Pico 1:1 혼합물 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL)을 각 웰에 첨가할 것이며, 평판은 395nm에서 광도계(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 판독할 것이다. 실시예 VI에서 설명한 것과 같이 수집한 데이터를 검정할 것이다, EC<sub>50</sub>을 계산할 것이다.

#### 실시예 XII

##### 다중 ECL 샌드위치 ELISA를 이용하여 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출을 위한 면역 기반 방법

[0397] 다음의 실시예는 SNAP-25 절단 생성물에 특이적인  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체와 상이한 단백질에 대한 제 2 항체 쌍을 이용하여, SNAP-25 절단 생성물을 탐지함으로써, 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 다중 면역 기반 방법을 설명한다.

[0398] 다중 ECL 샌드위치 ELISA를 이용하여 재표적화된 엔도펩티다제 효능 검정을 실행할 수 있다. 이러한 검정은 동반 특허 출원 *Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, 미국 특허 출원 번호 12/403,531에서 설명하고 있으며, 전문이 참고문헌에 통합되며, 그리고 본 명세서에서 공개하는 세포주 및 재표적화된 엔도펩티다제 그리고 상응하는 세포주를 이용하여, 이용할 수 있을 것이다.

#### 실시예 XIII

##### 다중 EC 샌드위치 ELISA를 이용하여 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 면역 기반 방법

[0401] 다음의 실시예는 SNAP-25 절단 생성물에 특이적인  $\alpha$ -SNAP-25 단클론성 항체와 상이한 단백질에 대한 제 2 항체 쌍을 이용하여, SNAP-25 절단 생성물을 탐지함으로써, 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 검출하는 다중 면역 기반 방법을 설명한다.

[0402] 다중 EC 샌드위치 ELISA를 이용하여 재표적화된 엔도펩티다제 효능 검정을 실행할 수 있다. 이러한 검정은 동반 특허 출원 *Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, 미국 특허 출원 번호 12/403,531에서 설명하고 있으며, 전문이 참고문헌에 통합되며, 그리고 본 명세서에서 공개하는 세포주 및 재표적화된 엔도펩티다제 그리고 상응하는 세포주를 이용하여, 이용할 수 있을 것이다.

#### 실시예 XIV

##### 재표적화된 엔도펩티다제의 나노몰 양을 검출하기 위한 면역 기반 방법

[0405] 다음의 실시예는 재표적화된 엔도펩티다제 활성의 나노몰량을 검출하는 면역 기반 방법을 어떻게 실시하는지를 설명한다.

##### 1. ECL 샌드위치 ELISA를 이용한 재표적화된 엔도펩티다제를 탐지하는 면역 기반 방법.

[0407] 재표적화된 엔도펩티다제로 처리된 세포의 용해물을 준비하기 위하여, 검정에 적당한 확립된 세포주의 대략 50,000 내지 150,000개의 세포를 100 $\mu$ l의 적합한 배지를 포함하는 96-웰 조직 배양 폴리-D-리신 평판의 웰에 도말하였다(실시예 I 및 II 참고). 이러한 세포들을 24시간 동안 5% 이산화탄소하에서 37°C 배양지내에서 항온처리하였다. 세포로부터 배지를 각 웰로부터 흡출하였고, 0 (처리안된 시료) 또는 본 출원에서 각 재표적화된 엔도펩티다제에서 설명한 적합한 복용량 반응을 포함하는 새로운 배지로 교체하였다. 24 시간 항온처리 후, 세포

를 세척하고, 수거하거나 또는 수거 전, 재표적화된 엔도펩티다제 없이 추가 2시간 동안 항온처리하였다. 세포를 수거하기 위하여, 배지를 흡출하였고, 1×PBS로 세척하였고, 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100을 포함하는 용해 완충액 30 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하여 용해시켰고, 평판은 500 rpm에서 회전하는 회전기 상에서, 4°C 30분간 항온처리하였다. 평판은 4°C에서 20분간 4000rpm에서 원심분리하여 세포 찌꺼지를 펠렛화시키고, 상청액은 포획 항체 회복된 96웰 평판으로 이동시켜, 검출 단계를 실시하였다.

[0408]  $\alpha$ -SNAP-25 포획 항체 용액,  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 용액, 그리고 SNAP-25 절단된 생성물에 특이적인 포획 항체를 포함하는 고형상 지지물은 실시예 VII에서 설명하는 것과 같이 준비하였다.

[0409] ECL 샌드위치 ELISA 검정에 의한 절단된 SNAP-25 생성물의 존재를 탐지하기 위하여, 보관된 평판으로부터 차단 완충액을 흡출하였고, 재표적화된 엔도펩티다제 처리된 세포의 용해물 25-30 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하였고, 평판은 4°C에서 2시간 또는 24시간 동안 항온처리하였다. 세포 용해물을 흡출하고, 각 웰을 200  $\mu$ l 1×PBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)로 3회 행굼으로써 평판 웰을 3차례 세척하였다. 세척 후, 1×PBS 중 2% Amersham, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)을 포함하는 5 $\mu$ g/mL  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 용액 25 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하였고, 평판을 밀봉하였고, 밀봉된 평판은 교반시키면서, 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다.  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 항온처리 후, 웰은 200 $\mu$ l 1×PBS, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)으로 3차례 세척하였다. 세척 후, 실시예 VI에서 설명한 것과 같이, 평판을 처리하였고, 수득된 데이터를 검정하였고, EC<sub>50</sub>을 계산하였다. SK-N-DZ 클론 세포주 #3 세포를 이용하였을 때, EC<sub>50</sub>에서 상위 점근선의 경우 약 20:1 내지 약 300:1의 신호 대 노이즈 비율과 함께 평균 1.0 nM (약 0.3 nM 내지 약 2.0 nM의 범위)의 Noc/A가 탐지되었다는 것이 결과에서 나타났다. 더욱이, AGN P33 클론 세포주 #6 세포를 이용하였을 때, EC<sub>50</sub>에서 상위 점근선의 경우 약 20:1 내지 약 500:1의 신호 대 노이즈 비율과 함께 평균 3.7 nM(약 2.0 nM 내지 약 5.5 nM의 범위)의 Noc/A가 탐지되었다는 것이 결과에서 나타났다. 디노르핀 A 리간드를 포함하는 재표적화된 엔도펩티다제에 특이적인 SK12 세포의 경우, SK12 세포를 이용하였을 때, EC<sub>50</sub>에서 상위 점근선의 경우 약 10:1 내지 약 20:1의 신호 대 노이즈 비율과 함께 평균 8.4 nM(약 4.5 nM 내지 약 20.0 nM의 범위)의 Dyn/A가 탐지되었다. 추가로, Neuro-2a 클론 세포주 #7 세포를 이용하였을 때, EC<sub>50</sub>에서 상위 점근선의 경우 약 20:1 내지 약 200:1의 신호 대 노이즈 비율과 함께 평균 8.8 nM(약 5.0 nM 내지 약 15.5 nM의 범위)의 TVEMP-갈라닌이 탐지되었다. 이 방법은 또한 실시예 IX에서 설명한 것과 같이 다중 방식으로 실행될 수 있다.

## 2. CL 샌드위치 ELISA를 이용한 재표적화된 엔도펩티다제를 탐지하는 면역 기반 방법.

[0410] [0411] 재표적화된 엔도펩티다제로 처리된 세포로부터 용해물과  $\alpha$ -SNAP-25 포획 항체 용액은 실시예 VII에서 설명한 것과 같이 준비할 것이다.  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 용액 및 SNAP-25 절단된 생성물에 특이적인 포획 항체를 포함하는 고형 상 지지물은 실시예 VIII에서 설명한 것과 같이 준비할 수 있다.

[0412] CL 샌드위치 ELISA 검정에 의해 절단된 SNAP-25 생성물의 존재를 탐지하기 위하여, 재표적화된 엔도펩티다제로 처리된 세포의 용해물 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가할 것이며, 평판을 봉할 것이며, 밀봉된 평판은 500 rpm에서 회전하는 회전기 상에서, 4°C 2시간 또는 24시간 항온처리할 것이다. 세포 용해물을 흡출하고, 각 웰을 200 $\mu$ l 1×PBS, 0.05% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)으로 행굼으로써 평판 웰을 3차례 세척할 것이다. 세척 후, 1×PBS 중 2% Amersham 차단 시약, 0.1% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)을 포함하는 1 mg/mL  $\alpha$ -SNAP-25 다클론성 항체/HRP 검출 항체 용액 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가할 것이며, 평판을 밀봉할 것이며, 밀봉된 평판을 650rpm에서 회전하는 교반기 상에서 실온에서 1시간 동안 항온처리할 것이다. 검출 항체 항온처리 후, 200 $\mu$ l 1×PBS, 0.05% TWEEN-20® (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트)로 웰을 3차례 세척할 것이다. 세척 후, 100 $\mu$ l의 SuperSignal ELISA Pico 1:1 혼합물(Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL)을 각 웰에 첨가할 것이며, 평판은 광도계(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 395 nm에서 판독할 것이다. 실시예 VI에서 설명한 것과 같이 수집한 데이터를 검정할 것이며, EC<sub>50</sub>을 계산할 것이다. 이 방법은 또한 실시예 IX에서 설명한 것과 같이 다중 방식으로 실행될 수 있다.

## 실시예 XV

### $\alpha$ -재표적화된-엔도펩티다제 중화 항체를 탐지하기 위한 면역 기반 방법

[0413] 다음의 실시예는  $\alpha$ -Noc/A 중화 항체의 존재를 탐지할 수 있는 면역 기반 방법을 어떻게 실시하는지를

설명한다.

[0416]

일부 만성인 고통스런 건강상태의 치료에 대하여 Noc/A를 지금 평가한다. Noc/A의 반복된 장기 치료로 환자는 재표적화된 엔도펩티다제에 대해  $\alpha$ -Noc/A 중화 항체를 발달시킬 수 있고, 이는 면역저항성으로 이어질 수 있다.  $\alpha$ -Noc/A 중화 항체는 표적화 리간드 및/또는 재표적화된 엔도펩티다제의 전위 도메인(HN)에 결합함으로써 재표적화된 엔도펩티다제가 뉴런 및 기타 표적 세포로 흡수되는 것을 중단시켜, 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 억제할 수 있을 것이다. 환자의 혈액내  $\alpha$ -Noc/A 중화 항체의 존재를 판단하기 위한 확립된 검정은 없다. 재표적화된 엔도펩티다제로 처리된 환자에서 중화 항체를 탐지하기 위하여 세포 기반 검정이 개발될 수 있다면 비용 및 시간 양태에서 더 효과적일 것이다.

[0417]

$\alpha$ -Noc/A 중화 항체의 존부를 탐지하기 위하여, 본 명세서에서 공개하는 재표적화된 엔도펩티다제 활성을 측정하는 면역 기반 방법을 이용할 수 있다. 한 가지 방법은 다양한 농도의 Noc/A로 처리한 후 Western 블랏 검출 방법을 이용하여 존재하는 SNAP-25 절단 생성물의 양을 측정하는 것이며, 다른 방법은 ECL 샌드위치 ELISA 검출 방법을 이용하는 것이었다.

[0418]

$\alpha$ -Noc/A 중화 항체를 포함하는 시료를 준비하기 위하여, Noc/A으로 면역화된 원숭이의 혈액으로부터 혈청을 분리하였고, 항체는 친화도 정제하였다. 토끼는 또한 Noc/A 분자에 존재하는 표적화 리간드, 노씨셉틴 변이체 웨티드로 면역화시키고, 이들의 혈청을 수거하였고, 그리고 항체는 친화도 정제하였다(항-노씨셉틴 다클론성 항체).

[0419]

Noc/A를 포함하는 시료로 처리된 세포의 용해물을 준비하기 위하여, SK-N-DZ 클론 세포주 #3 세포 및 AGN P33 클론 세포주 #6 세포를 16-18시간 동안 폴리-D-리신 96웰 평판에 접종하였다. 0-3 $\mu$ g/mL 농도의 항-노씨셉틴 pAb를 1 nM의 Noc/A를 포함하는 RPMI SFM (N2, B27, NGF 보충제와 함께)으로 희석하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 사전-항온처리하였다. 그 다음 이 용액을 세포에 첨가하였고, ECL ELISA 검정을 실시하기 전, 24시간 동안 항온처리하였다. 이 항-노씨셉틴 변이체 항체는 1 $\mu$ g/mL 농도에서 이들 두 세포주에서 1 nM Noc/A 흡수를 완전히 차단하였다(>90% 억제). 항-Noc/A 원숭이 다클론성 항체 또한 이들 세포주에서 검정하였다. 96-웰 폴리-D-리신 평판에서 N2, B27, 및 NGF가 보충된 RPMI 성장 배지로 24시간 동안 웨일 100,000개의 세포를 도말하였다. 0-20 $\mu$ g/mL의 항-Noc/A 다클론성 항체를 1 nM Noc/A를 포함하는 배지로 희석하였고, 실온에서 1시간 동안 사전-항온처리하였다. 그 다음 혼합물을 세포에 추가하였고, ECL ELISA 검정을 실시하기 전, 24시간 동안 항온처리하였다. SK-N-DZ 세포주에서 더 높은 농도의 6-20  $\mu$ g/mL 항-Noc/A pAb에서 최대 60% 억제가 있었고, AGN P33 클론 세포주 #6 세포주에서는 30% 억제가 있었다. 이것은 항-Noc/A 다클론성 항체가 결합 부위에 특이적이지 않고, 그리고 분자의 다른 부분에 결합하는 다른 항체를 포함하여, 테스트된 농도에서 부분적인 차단만을 일으킨다는 사실 때문일 수 있다. 완전한 차단을 얻기 위하여 아마도 더 높은 농도가 필요하다.

[0420]

Western 블랏 검정으로 절단된 SNAP-25 생성물의 존재를 탐지하기 위하여, 각 웰로부터 배지를 흡출할 것이며, 세포는 50 $\mu$ l의 SDS-PAGE 로딩 완충액에 혼탁하고, 그 다음 5분간 95°C로 가열하였다. 수거한 각 시료의 분획을 실시예 I에서 설명한 것과 같이 Western 블랏하여 검정하는데, 단, 수거한 시료는 12 % 26-웰 Criterion 겔 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 이용한 SDS-PAGE에 의해 분리할 것이며, 토끼 다클론성  $\alpha$ -SNAP-25<sup>197</sup> 항체 혈청을 1차 항체로 이용할 것이다(실시예 V 참고). 결과에서 Western 블랏에 의해 SNAP-25 절단 생성물의 탐지 가능한 밴드를 만들 수 있는 재표적화된 엔도펩티다제의 최저 농도가 나타날 것이다.

[0421]

ECL 샌드위치 ELISA에 의해 절단된 SNAP-25 생성물의 존재를 탐지하기 위하여, 각 웰로부터 배지를 제거하였고, 실시예 VI에서 설명한 것과 같이 세포를 용해하였다.  $\alpha$ -SNAP-25 포획 항체 용액,  $\alpha$ -SNAP-25 검출 항체 용액, 그리고  $\alpha$ -SNAP-25 고형 상 지지물을 실시예 VIII에서 설명한 것과 같이 준비하였다. 상청액을  $\alpha$ -SNAP-25 고형 상 지지물로 옮겼으며, ECL 샌드위치 ELISA 검정은 실시예 VI에서 설명한 것과 같이 실시하였다. 실시예 VI에서 설명한 것과 같이 수거한 데이터를 검정하였고, EC<sub>50</sub>을 계산하였으며, 단, EC<sub>50</sub>은 재표적화된 엔도펩티다제의 활성을 최대의 ½로 억제하는데 요구되는 혈청 희석이며, 최대 신호(Signal<sub>Max</sub>)에 대한 최저 신호(Signal<sub>Min</sub>)의 비율은 항체의 최대 희석에서 수득한 SNAP-25 절단 생성물 신호를 최저 항체 희석으로 수득한 신호로 나누어 구하였다.

[0422]

결과는 원숭이 혈청내  $\alpha$ -Noc/A 중화 항체의 존재와 토끼의  $\alpha$ -노씨셉틴 변이체 항체의 존재를 탐지할 수 있다는 것을 나타낸다. 면역화된 동물의 친화도 정제된 항체에서 항온처리된 Noc/A 분자의 활성을 항체 희석이 감소될 때 감소되었다. Dyn/A 및 TVEMP-갈라닌 화합물을 이용한 동일한 검정은 테스트되는 각 화합물에 특이적인 세포주를 이용하여, 실시할 것이다.

- [0423] 실시예 XV
- [0424] 갈라닌 재표적화된 엔도펩티다제에 대한 세포 기반 검정의 개발
- [0425] 다음의 실시예는 세포 기반 효능 검정을 개발하는데 요구되는 재표적화된 엔도펩티다제 흡수 능력을 보유하는 확립된 세포주를 어떻게 확인하는지를 설명한다.
- [0426] 1. 후보 세포주의 보존 배양물의 성장.
- [0427] 세포주를 성장시키기 위하여, 테스트할 세포주의 적당한 밀도의 세포를 30ml의 적당한 성장 배지(표 25 참고)를 포함하는 162ml 조직 배양 플라스크에 도말하였고, 원하는 밀도에 도달할 때까지 5% 또는 10% 이산화탄소하에, 37°C 배양지에서 세포를 성장시켰다.

표 25. 모든 세포주 및 이들의 각 배지의 요약

세포 유형; 설명; 원천	완전 배지 (CM) 모두 Invitrogen 의 제품 (다른 언급이 없는 한)	무-혈청배지 (SFM) 모두 Invitrogen 의 제품 (다른 언급이 없는 한)
SiMa (인간 신경아세포종 세포주, DSMZ# ACC 164, Braunschweig, Germany) SiMa H1 (SiMa 세포로부터 클론된 세포주)	RPMI 1640 (90 %) 태아 소 혈청 (FBS, 10 %) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), 피루베이트 나트륨염 (1 mM) 페니실린 (100 U/ml) 스트렙토마이신 (100 µg/ml),	RPMI 1640 (90 %) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), 피루베이트 나트륨염 (1 mM) 페니실린 (100 U/ml) 스트렙토마이신 (100 µg/ml) N2 보충제 (1x) B27 보충제 (1x)
Neuro-2a (마우스 신경아세포종 : (ATCC# CCI131, Manassas, VA,)	Earle's MEM (90 %) 태아 소 혈청 10 % NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), 피루베이트 나트륨염 (1 mM), 페니실린 (100 U/ml), 스트렙토마이신 (100 µg/ml)	EMEM (90 %) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), 피루베이트 나트륨염 (1 mM), 페니실린 (100 U/ml), 스트렙토마이신 (100 µg/ml)
PC-12 쥐 크롬친화세포종 (ATCC # CRL-1721)	RPMI 1640 (90 %) Dialyzed FBS (5 %) Horse 혈청 (10 %) HEPES (10 mM) 피루베이트 나트륨염 (1 mM) D-포도당 (0.5 % ,Sigma) 페니실린 (100 U/ml); 스트렙토마이신 (100 µg/ml) N2 보충제 (1x)	<u>분화 배지</u> : RPMI 1640 (90 %) HEPES (10 mM) 피루베이트 나트륨염 (1 mM) D-포도당 (0.5 % ,Sigma) 페니실린 (100 U/ml); 스트렙토마이신 (100 µg/ml) N2 보충제 (1x) 소 혈청 알부민(0.2 % w/v) NGF (50 ng/ml, Promega)
P19 마우스 배아 암종(ATCC #CRL-1825)	Alpha MEM (90 %) 소 Calf 혈청 (7.5 %) FBS (2.5 %) 페니실린 (100 U/ml); 스트렙토마이신 (100 µg/ml)	Alpha MEM (90 %) FBS (2.5 %) 페니실린 (100 U/ml); 스트렙토마이신 (100 µg/ml)

NEAA: 비-필수 아미노산, MEM: 최소 필수 배지. DMEM: Dulbecco's MEM. EMEM- Earle's MEM. PC-12 세포는 분화 배지에서 분화하였지만, SFM 에서는 분화하지 않았다.

- [0428]
- [0429] 2. 갈라닌 TVEMP-갈라닌 화합물에 대한 민감도에 대해 상업용 세포주의 스크리닝
- [0430] 상응하는 화합물로 처리한 후, SNAP-25의 절단으로 측정하였을 때, TVEMP-갈라닌 화합물에 대한 민감도에 대하-

여 상업용 세포주를 스크리닝하였다. 스크리닝 및 테스트에 다양한 TVEMP-갈라닌 화합물을 이용하였다. PC-12, Neuro-2a, SiMa, 및 P19 세포를 3일간 무혈청 배지에 또는 1일간 CM에서 도말하였다. 이러한 분화된 그리고 순수 세포를 0 및 75 nM 농도의 TVEMP-갈라닌 Batch A로 18시간 동안 처리하였다. TVEMP-갈라닌 Batch A는 절단된 SNAP25의 존재가 증가된 것으로 볼 수 있는 것과 같이 PC-12 및 Neuro-2a 세포 모두에서 활성을 보였고, 그리고 분화된 조건에서 Neuro-2a 세포는 고유 세포보다 갈라닌 리간드와 TVEMP 화합물에 더 민감하다. 세포 활성에서 순위는 PC-12가 가장 활성이 크고, 이어서 Neuro-2a, 그리고 끝으로 SiMa 세포이다. 이러한 갈라닌-재표적화된 화합물에 흡수가 특이적인지를 결정하는 것은 필수적이었으며, 따라서, 갈라닌 리간드를 포함하지 않는 다른 화합물들로 세포를 테스트하는 것도 중요하였다. Noc/A는 노씨셉틴 변이체 리간드, 그리고 결합 도메인이 없는 화합물, LH<sub>N</sub>/A (음성적 기준)을 포함하는 재표적화된 화합물이다. LH<sub>N</sub>/A의 흡수는 비-특이적이며, 세포주가 재표적화된 화합물에 대해 특이적 흡수를 가진다면, TVEMP-갈라닌 화합물보다는 상당히 더 낮은 활성을 가져야만 한다. Noc/A 화합물은 이미 SiMa 세포에서 특이적 흡수를 가지는 것을 보여주었으며, 세포주를 테스트하기 위한 기준으로 사용할 것이다. 선호적인 세포주는 LH<sub>N</sub>/A와 Noc/A 화합물의 낮은 흡수, 그리고 TVEMP-갈라닌 화합물의 높은 흡수를 가져야만 한다. 표 26은 이 실험 결과를 나타낸다.

표 26. TVEMP-갈라닌을 이용하여 상이한 조건에서 PC-12, Neuro-2a, 및 SiMa 세포의 스크리닝

		TVEMP-갈라닌 Batch A	TVEMP-갈라닌 Batch B	LH <sub>N</sub> /A	Noc/A
농도 (mg/mL)		0.168	0.175	1.63	1.00
EC <sub>50</sub> 값 (nM)	PC-12, naïve	73.4 ± 10.7	105.6 ± 16.0	>200	72.9 ± 26.9
	SiMa, naïve	138.6 ± 43.9	133.8 ± 24.2	>300	48.3 ± 18.1
	Neuro-2a, naïve	122.4 ± 15.7	116 ± 17.5	>200	>150
	SiMa, Dif O/N	>400	>150	>400	16.1 ± 11.9
	Neuro-2a Dif 4 d		34.5 ± 7.5	39.7 ± 5.6	105.9 ± 44.3
	SiMa, Dif 4 d	101.8 ± 20.5	65.3 ± 7.8	>150	88.7 ± 23.3
TVEMP-갈라닌 Batches A 및 B, 그리고 LH <sub>N</sub> /A 및 Noc/A 기준들을 다양한 세포주 및 성장/분화 조건에서 테스트하였다. 요약 차트는 테스트된 화합물과 EC <sub>50</sub> 값을 상세하게 보여준다.					

[0431]

[0432] 결과에서 TVEMP-갈라닌 Batch A와 TVEMP-갈라닌 Batch B는 테스트된 세포주에서 음성 기준에 유사한 또는 단지 1-2배 더 활성을 가진 플롯 또는 EC<sub>50</sub> 값을 가진 것을 보여준다. 고유 세포는 충분히 민감하지 않으며, 이들 세포는 갈라닌 수용체 단백질GalR1 또는 GalR2 수용체를 인코드하는 플라스미드로 형질감염되어야 한다는 것을 이데이터는 암시한다.

### 3. GalR으로 PC-12, Neuro-2a, 및 SiMa 세포의 안정적 형질 감염.

[0434] 형질감염 하루 전, 세포는 6-웰 콜라겐 IV 피복된 평판 (Cat#354554: BD Biosciences) (SiMa, PC-12) 또는 6-웰 Costar 평판 (Cat# 3516: Corning) (Neuro-2a)에서 0.5 x 10<sup>6</sup> 세포/웰의 밀도로 접종하였다. 12μl의 Lipofectamine™ 2000 (Cat # 52758, Invitrogen)을 250μl의 Opti-MEM® I 환원된 혈청 배지(Cat# 3195, Invitrogen)로 희석시키고, 실온에서 5분간 항온처리하여 형질감염을 실시하였다. 4μg의 GalR 플라스미드 DNA를 250μl의 Opti-MEM® I 환원된 혈청 배지에서 0.4μg의 pAdVantage™ 벡터 (1mg/ml, Cat#E1711, Promega)와 5분간 혼합하였다. 5분간의 항온처리 후, 희석된 Lipofectamine™ 2000 및 희석된 플라스미드 DNA를 혼합하였고, 복합체 형성을 위하여, 추가 20분 동안 실온에서 항온처리하였다. 한편, 세포는 OPTI-MEM®으로 세척하였고, 그리고 0.5ml의 OPTI-MEM®을 각 웰에 첨가하였다. 20분간의 항온처리 후, 희석된 Lipofectamine™ 2000과 희석된 플라스미드 DNA의 복합체를 포함하는 0.5ml을 0.5ml의 OPTI-MEM®에서 세포를 포함하는 웰에 조심스럽게 첨가하였다. 평판을 37°C에서 5시간 동안 항온처리하였고, 그 다음 1ml의 완전 배지를 추가하였다. 다음 날, 배지는 48시간 동안 성장 배지로 대체하였다. 4일째, 형질감염으로부터 세포를 회수한 후, 성장 배지는 0.5mg/ml의 제네티신® (Cat #10131: Invitrogen)을 포함하는(1:100 희석) 새로운 성장 배지로 대체하였고, 추가 3일간 항온처리하였다. 형질감염 후 7일째, 세포를 성장 배지와 제네티신(0.5mg/ml, 1:100 희석)을 포함하는 75 cm 콜라겐 IV 플라스크 (Cat# 35423: BD Biosciences)로 옮겼다. 이동시, 세포의 대략 90 %는 사멸하였고, 배지 교체 동안 제거하였다. 제네티신을 포함하는 성장 배지(0.5mg/ml, 1:100 희석)는 21일까지 2일에 한번 교체하였다.

[0435] 갈라닌 TVEMP 화합물을 흡수할 수 있는 안정한 세포의 선별을 위하여, 포획용으로 단클론성 2E2A6 피복된 평판을 이용하고, 검출용으로 다클론성 SNAP25 (Sigma Cat # S9684) 술포테그된(sulfotagged) 항체를 이용한, ECL 샌드위치 ELISA에서 TVEMP-갈라닌 처리로 최대 SNAP-25 절단 비율을 나타내는 클론에 대해 매개변수를 스크리닝

하였다. 표 27의  $EC_{50}$  값에서 TVEMP-갈라닌 Batch D는 Ga1R1 및 Ga1R2으로 형질감염된 SiMa 및 Neuro-2a 세포에서 음성 기준보다 최소한 10배 더 큰 흡수를 보였고, 그리고 형질감염된 PC-12 세포에서는 단지 2-4배 더 큰 흡수를 보였다는 것을 나타낸다. PC-12 형질감염된 세포는 SiMa 및 Neuro-2a 세포보다 더 낮은 민감도 및 특이성을 가지는 것으로 보이기 때문에, 이들은 클론하지 않을 것이다. 또한, TVEMP-갈라닌 화합물에서 갈라닌 1-16 mer 리간드는 GALR2보다 더 큰 친화도으로 GALR1 수용체에 결합하기 때문에, GALR1로 형질감염된 세포만 클론할 것이다. 도면은 또한 TVEMP-갈라닌 Batches C 및 D가 Neuro-2a Ga1R1에서  $LH_N/A$  및 재표적화된 노씨셉틴 화합물 TVEMP-노씨셉틴보다 9-10배 더 큰 흡수를 나타내는 것을 보여준다.

표 27. Ga1R1 또는 Ga1R2 수용체로 형질감염된 SiMa, Neuro-2a, 및 PC12 의 안정적으로 형질감염된 그러나 클론이 없는 집단의 테스트				
	TVEMP-갈라닌 C	TVEMP-갈라닌 D	$LH_N/A$	TVEMP-노씨셉틴
농도 (mg/mL)	1.260	0.303	1.46	1.00
$EC_{50}$ 값 (nM)	SiMa Ga1R1	$36.2 \pm 8.6$	$>300$	
	SiMa Ga1R2	$26.6 \pm 6.7$	$>300$	
	PC-12 Ga1R1	$64.1 \pm 19.5$	202.7	
	PC-12 Ga1R2	$>150$	$>300$	
	Neuro-2a Ga1R1	$32.2 \pm 3.3$	$>300$	$>300$
	Neuro-2a Ga1R2	$35.2 \pm 3.1$	$>300$	$>300$

[0436]

[0437] 비-클론 선택된 집단은 정규적인 기반에서 사용하기에 양호한 세포 집단이 아닌데, 그 이유는 이 집단은 상이한 수준의 수용체를 발현시키는 세포 혼합물을 포함하고, 이들 집단은 시간이 경과함에 따라 변화할 수 있기 때문이다. 단일 세포로부터 유도된 안정한 세포주를 수득하기 위하여, 희석 클로닝 방법을 시작하였다. 21일째, 형질감염된 세포를 트립신처리하였고, 바늘-해리시키고, 카운트하였다. 앞으로 사용하기 위하여 나머지 형질감염된 세포주는 냉동하였다. 세포는 제네티신을 포함하는 성장 배지(0.5mg/mL, 1:100 희석)에서 mL당 10개 세포로 연속 희석하였다.  $2 \times 96$ -웰 콜라겐 IV 피복된 평판 (SiMa, PC-12) 또는  $2 \times 96$ -웰 Costar 평판 (Neuro-2a)에 웰 밀도당 1개 세포를 얻기 위하여 웰당  $100\mu\text{l}$ 로 도말하였다. 평판을 배양기로 되돌려보내고, 콜로니 형성을 위하여 2주간 손대지 않고 두었다. 2주 후(35일), 웰의 바닥에 형성된 단일 콜로니의 존재에 대해 웰을 조심스럽게 점검하였다(다중 콜로니에 대해 전체 웰을 조심스럽게 점검하였다). 웰에서 세포의 단일 클러스터가 확인되었을 때, 하나의 그리고 오로지 하나의 세포 클러스터가 존재하는지를 확실히 하기 위하여 전체 웰을 신중하게 조사하였다. 단일 클러스터의 사진을 찍었다. 임의의 의문 또는 추가 클러스터가 있다면, 해당 웰은 선택하지 않았다. 36일째, 선택된 클론은 TrypLE으로 분리시키고, 제네티신을 포함하는 완전 배지 0.5mL (0.5mg/mL, 1:100 희석)을 추가하여 트립신 반응을 중단시켰다. 전체 용적은 6개 웰 평판으로 이동시키고, 제네티신을 포함하는 0.3mL의 추가 완전 배지(0.5mg/mL, 1:100 희석)로 추가 희석하였다. 클론은 90% 합류가 되도록 성장하게 두었고, 그 다음 다시 트립신 처리하였고, 제네티신을 포함하는 10.0mL의 완전 배지(0.5mg/mL, 1:100 희석)를 포함하는 75 cm 콜라겐 IV 또는 Costar 플라스틱로 이동시켰다. 세포가 다시 90% 합류되면, 냉동 보관을 위하여 3개의 냉동바이알에 세포를 채우거나 또는 갈라닌 재표적화된 화합물에 대해 ELISA 검정에서 스크리닝하는데 이용하였다.

[0438]

기준 화합물 TVEMP-갈라닌 Batch C를 이용하여 별개의 테스트를 실행하는 두 가지 오퍼레이트를 이용하여 이들 클론을 테스트하였다. SiMa Ga1R1 클론은 천천히 성장하였고, 이번 테스트에는 이용할 수 없었다. 다행히, Neuro-2a 클론은 더 신속하게 성장하였고, 12개 클론중 8개는 바로 테스트에 이용할 수 있는 충분한 양이 되었다. 이러한 Neuro-2a Ga1R1 클론 세포는 TVEMP-갈라닌 화합물의 전체 복용량 범위(0-300 nM)로 테스트하였고, 이들 클론중 9개 클론의 결과를 하기에 나타낸다. 나머지 4개 클론은 너무 느리게 성장하여 테스트하지 않았다. 이용되는 클론과 함께 선택된 그러나 비-클론 모 세포는 벤치마크로 도말하였다. 표 28은 TVEMP-갈라닌 화합물로 테스트하였을 때, 선택된 비-클론 Neuro-2a Ga1R1 세포와 함께 8개 클론 각각의 활성을 보여준다. 테스트된 8개 클론중, 클론 #4, 7 및 12만이 용인되는  $EC_{50}$  값으로 TVEMP-갈라닌 화합물의 우수한 흡수를 보여주었다. Neuro-2a Ga1R1클론 # 1, 3 및 10은 TVEMP-갈라닌 화합물을 흡수하지 않았고, 비-클론 집단과 함께 클론 # 5, 11 및 13은 매우 높은  $EC_{50}$  값을 생성하였고, 그리고 이들 세포로 추가 테스트를 실시하지 않았다.

표 28. Neuro-2a GalR1 단일-세포 유도된 클론을 TVEMP-갈라닌 Batch C로 스크리닝한 결과			
평판	세포유형	EC50 ± 표준 오차 (nM)	
		Operator1	Operator2
1	N2A 비-클론	82.1±9.6	92.0±10.8
1	N2A GALR1 클론 #1	>300	>300
1	N2A GALR1 클론 #3	>300	>300
1	N2A GALR1 클론 #4	39.7±3.4	39.4±6.6
2	N2A 비-클론	211.2±167.7	116.0±26.8
2	N2A GALR1 클론 #5	202.6±82.9	113.0±18.1
2	N2A GALR1 클론 #7	23.1±3.3	15.5±1.8
2	N2A GALR1 클론 #10	>300	>300
3	N2A GALR1 클론 #7	20.3 ± 1.6	38.0±6.3
3	N2A GALR1 클론 #11	270.0±243	247.0±101
3	N2A GALR1 클론 #12	43.2±5.2	57.5±14.3
3	N2A GALR1 클론 #13	144.1±143	184.7±15.6

[0439]

#### 4. 클론 세포주에서 GalR1 발현의 특징

[0440]

클론의 스크리닝에서 오직 클론 # 4, 7, 및 12들만 비-클론 세포보다 더 민감하다는 것을 보여주었다. 실시예 V에서 설명한 RT-PCR 조건 및 표 29에서 설명하는 프라이머를 이용하여 RT-PCR에 의한 특징화를 위하여 이들 3 가지 클론과 비-형질감염된 모 및 안정적으로 형질감염된 비-클론 Neuro-2a 세포로부터 메신저 RNA (mRNA)를 추출하였다.

[0441]

표 29. 특이적 GALR1 및 GALR2 프라이머

이름	서열	서열번호:
GALR1 fwd	5'' CCCCATCATGTCATCCACCT 3'	150
GALR1 rev	5' ATGGGGTTCACCGAGGAGTT 3'	151
GALR2 fwd	5' CATCGTGGCGGTGCTTT 3'	152
GALR2 rev	5' AGCGGGAAGCGACCAAC 3'	153

[0442]

표 30의 결과에서 형질감염된 비-클론 세포 및 클론은 모 세포보다 훨씬 더 많은 양의 GALR1 mRNA를 가지는 것을 보여준다. TVEMP-갈라닌 세포 스크리닝에서, 클론 #7은 TVEMP-갈라닌에 가장 민감한 것으로 나타났다. 표 30에 따르면, 클론 #7은 또한 최대량의 GALR1 mRNA를 가지는 것을 볼 수 있다. Neuro-2a GalR1 클론 7 (Neuro-2a #7)에 대한 CT 값이 최저이며, 다음으로 클론 4, 그 다음 클론 12이다. 이 시점에서 테스트된 비-클론은 클론 12에 근접한 CT를 제공하였지만, 그러나, 이들 세포는 다양한 농도의 GalR1 수용체를 포함하는 지속적으로 변화하는 세포 집단을 포함하고, 따라서, 추가 작업에 적합한 집단은 아니었다. 낮은 EC<sub>50</sub>값을 가지는 3개 클론 중, Neuro-2a 클론 GalR1 클론 #12 (Neuro-2a # 12)가 가장 신속하게 성장하였고, 그 다음이 Neuro-2a 클론 #7이었으며, 끝으로 Neuro-2a 클론 #4이었다. 클론 # 4의 느린 성장 속도에 추가하여, Neuro-2a 클론 #7의 민감도가 클론 #4보다 훨씬 나았기 때문에, Neuro-2a 클론 # 4는 추가 테스트하지 않았다.

표 30. Neuro-2a 형질감염된 클론 세포 vs. 형질감염된 비-클론 및 부모 세포에서 GALR1 mRNA의 큰 차이

세포주	부모	비-클론	클론 4	클론 7	클론 12
Ave CT	32.0	21.7	20.8	19.3	21.6
mRNA 변화 배수	1.0	1269.5	2418.7	6793.8	1332.6

[0443]

#### 5. TVEMP-갈라닌 화합물로 Neuro-2a 클론 #7 및 #12의 민감도 및 특이성 비교

[0444]

2개 클론 중 가장 민감하고 선택적인 것을 확인하기 위하여 나란히 테스트하였고, 가장 좋은 클론으로부터 데이

터를 수거할 수 있다. 표 31은 차례로 민감도 및 선택성에 대해, TVEMP-갈라닌 Batch C 및 LH<sub>N</sub>/A으로 처리하였을 때 이들 두 클론의 결과를 나타낸다. 두 클론 모두 신호-대-노이즈 비율이 높다. Neuro-2a Clone #7은 5.5nM의 EC<sub>50</sub>를 가지고, Neuro-2a 클론 #12의 EC<sub>50</sub> 값은 68.4 nM이다. 이용된 최대 농도에서 고원부분(plateau)을 유도하기 위하여, Neuro-2a 클론 #12는 0-300 nM의 복용량 범위에서 테스트 하였으며, Neuro-2a Clone #7은 0-30 nM의 복용량 범위로 테스트할 수 있다. 이들 두 클론은 LH<sub>N</sub>/A 및 TVEMP-갈라닌 Batch C 사이에 양호한 분리를 나타내고, Neuro-2a 클론 #12은 고농도에서 일부 비-특이적 흡수를 보이지만, Neuro-2a 클론 #7은 보이지 않는다. 표로 나타낸 결과에서 볼 수 있는 것과 같이, Neuro-2a #7 세포로 테스트한 범위는 Neuro-2a #12 세포의 것 보다 10배 더 낮아, Neuro-2a #12보다는 Neuro-2a #7에 사용된 화합물이 10배 더 적은 결과를 초래한다. Neuro-2a #7은 LH<sub>N</sub>/A를 비교로 이용하였을 때, Neuro-2a 클론 #12보다는 8배 더 선택적이다. 이들 두 클론에서 신호-대-노이즈는 100을 넘었지만, 세포 기반 효능 검정을 개발하는데는 10의 비율도 충분할 것이다. Neuro-2a #7 클론의 EC<sub>50</sub> 값은 5.5 nM이고, 이는 Neuro-2a #12의 것(EC<sub>50</sub>는 68.4 nM)보다 약 12배 낮다. 테스트를 위한 더 낮은 복용량-범위, LH<sub>N</sub>/A에 대해 24배 선택성, 높은 신호-대-노이즈 비율, 우수한 민감도로 인한 낮은 EC<sub>50</sub>값, 그리고 각 테스트에 요구되는 낮은 단백질 요구량, 모두 Neuro-2a Clone #7이 TVEMP-갈라닌 화합물에 대한 효능 비율을 결정하는데 이용하는 세포 기반 효능 검정을 진행하는 클론이라는 것을 암시한다.

표 31. Neuro-2a 클론 #7과 #12의 특징 비교

	Neuro-2a #7	Neuro-2a #12
범위	0-30 nM	0-300 nM
선택성	24-fold	3-fold
신호 대 노이즈 비율	190	547
TVEMP-Gal 최대 신호에 대한 LH <sub>N</sub> /A 최대 신호의 비율	4.3%	37.6%
EC <sub>50</sub>	5.5 nM	68.4 nM
요구되는 단백질	~1 µg	~10 µg
Neuro-2a #7 및 #12는 CM에서 6시간 동안 TVEMP-갈라닌 Batch C 와 LH <sub>N</sub> /A 으로 처리하였다. ECL-ELISA를 이용하여 활성을 탐지하였다.		

[0447]

#### 실시예 XVI

[0448]

디노르핀 A 재표적화된 엔도펩ти다제 흡수를 위한 KOR-1 수용체를 과다발현하는 클론 세포주의 생성

[0449]

다음 실시예는 표적수용체로 형질감염된 확립된 세포주와 세포주의 후속 클로닝으로부터 기인된 몇 가지 클론 세포주를 어떻게 특징화하고 비교하는지를 설명한다. 이 특이적 실시예는 실시예 III, 표 9에서 먼저 설명된 hKOR-1으로 형질감염된 클론 세포주의 확인 및 특장화에 관한 것이다.

[0450]

4개의 AGN P33-KOR 클론 (클론 번호 8, 9, 10, 및 12, 실시예 III의 표 9)을 선택하였고, 0-150 nM의 전체 복용량 반응으로 Dyn/A으로 테스트하였다. 동시에, 두가지 SiMa-KOR 클론 (클론 번호 12 및 16, 실시예 III의 표 9)을 선택하였고, 0-150 nM의 전체 복용량 반응으로 Dyn/A로 테스트하였다. 이 실험에서, AGN P33-KOR 클론 8, 9, 및 12는 매우 낮은 흡수를 나타내고, 따라서 폐기하였다; AGN P33-KOR 클론 10은 우수한 흡수를 나타내었고, 30.3 nM의 EC<sub>50</sub>값을 얻었다. 테스트한 두 가지 SiMa-KOR 클론도 양호한 흡수를 나타내었고, 클론 16의 EC<sub>50</sub>값은 26.6nM이었고, 클론 12의 EC<sub>50</sub> 값은 11.8 nM이었다. 표적화 리간드가 없는 음성 기준 LH<sub>N</sub>/A 및 Noc/A 기준에 대해 표적 Dyn/A 화합물의 흡수를 비교함으로써 민감도 및 선택성에 대해 이들 3개 클론을 테스트하였다. 표 32에 0-150 nM의 전체 복용량 반응을 이용하여 이들 3개 클론과 모 SiMa 세포의 비교를 요약한다.

표 32.

세포주	EC <sub>50</sub> Dyn/A (nM)	EC <sub>50</sub> LHN/A (nM)	EC <sub>50</sub> Noc/A (nM)
SiMa 부모	> 100	> 100	5.4
AGN P33-KOR 클론 10	9.7	> 150	9.4
SiMa-KOR 클론 16	10.6	> 100	1.6
SiMa-KOR 클론 12	4.65	> 150	19.7

[0452]

[0453] Dyn/A로 처리된 KOR-1 형질감염된 클론에서 Dyn/A 흡수가 상당히 증가하였지만, 모 SiMa 세포는 이 화합물의 최소 흡수를 보였다(흡수는 음성 기준 LHN/A과 유사하였다). 모 SiMa 세포를 포함하는 모든 세포주에서 일부 Noc/A가 있다. 이러한 재표적화된 화합물에 대한 검정 개발 동안 SiMa 세포에서 Noc/A 흡수가 관찰되었기 때문에 놀라운 것은 아니다. 더욱이, 이러한 재표적화된 엔도펩티다제에 대해 특이적으로 유도된 AGN P33 세포주에서 Noc/A 흡수가 최고다. 클론성 SiMa-KOR 클론 12 (SK12) 세포에서 Noc/A 흡수와 Dyn/A 화합물 흡수의 차이가 더 크다. 모든 그래프에서, 음성 기준, LHN/A의 활성이 최소이며, 결합 도메인 없이, 이들 세포주에서는 특이적 흡수는 없다는 것을 보여주며, SK12 세포에서 최저인 것은 Dyn/A 화합물의 흡수가 매우 특이적이라는 것을 보여준다. 이러한 결과들로부터, 추가 최적화 및 특징화에 대해 SK12 클론을 선택하였다.

[0454]

강력한, 특이적 그리고 민감성 검정을 개발하기 위하여 SK12 세포로 최적화 연구를 실시하였다. 도말 배지, 도말 밀도, 처리 배지 및 처리 시간을 포함한 몇 가지 매개변수를 검정하였다. 최적화 동안 수득한 데이터는 표 33에서 요약한다.

표 33.

사용된 배지		처리시간	세포/월				
도말	처리		25000	50000	75000	100000	150000
완전	완전	6 hr + o/n	51.3	76	13.4	9.2	n/a
완전	완전	16 hr	21.3	19.0	4.96	4.64	n/a
완전	완전	16 hr	n/a	n/a	n/a	2.1	15.3
혈청 없음	혈청 없음	16 hr	n/a	n/a	n/a	9.0	12.1
완전	혈청 없음	16 hr	n/a	10.3	5.4	8.97	8.38
완전	완전	16 hr	n/a	7.7	4.86	13.72	11.26
혈청 없음	혈청 없음	16 hr	n/a	11.2	8.5	8.4	9.2

[0455]

[0456] 표 B는 CM에서 웨딩 100,000개의 세포로 도말하고, CM에서 화합물로 처리한 세포는 한 실험과 그 다음 실험 간의 EC<sub>50</sub> 값에 더 많은 변이성을 나타내었고(4.6; 1.2 및 13.72 nM), 반면 SFM에서 웨딩 100,000개의 세포로 도말하고, SFM에서 화합물로 처리한 세포는 최소의 곡선 및 일관된 EC<sub>50</sub> 값 (9.0 및 8.4 nM)을 나타내었다는 것을 보여준다. 앞으로, 세포는 SFM에서 웨딩 100,000개의 세포로 도말하고, SFM에서 화합물로 처리할 것이다.

[0457]

24시간 동안 SFM에서 웨딩 100,000개의 세포로 PDL 평판에서 도말하고, 이러한 16시간 동안 SFM에서 처리한 SK12는 8.4 +/- 1.1 nM의 최저 EC<sub>50</sub> 값과 12의 신호-대-노이즈 비율을 야기하였다. 이들 값 모두 CBPA에서 이 세포의 추가 사용에 대해 수용 가능할 것이다.

[0458]

#### 포화 결합 검정으로 SK12의 특징화

[0459]

이용된 포화 결합 검정은 실시 예 V에서 상세하게 설명하고 있다. 결합을 평가하기 위하여, KOR-1 길항제 <sup>3</sup>H-디

프렌노르핀을 이용하여 포화 결합 연구를 실시하였다. 몇 가지 실험에서 전체적인 특이적, 및 비-특이적 결합을 측정하였다. 두 가지 별개 실험으로부터 수용체와  $^3\text{H}$ -디프렌노르핀의 포화 결합 곡선을 만들었다. 수용체에 대해 이 분자의 약 25% 결합은 비-특이적이며, 75%는 특이적 결합으로 나타난다. 수용체에 대한 분자의 친화도는 6.5 nM에서 충분하다.  $\text{B}_{\text{max}}$ 는 SK12 세포에서 세포당 23 fmol KOR-1 수용체가 있다는 것을 나타낸다.

[0460] 다른 언급이 없는 한, 성분의 양, 분자량과 같은 성질들, 반응 조건 및 명세서와 청구범위에서 이용된 기타 등등을 나타내는 모든 수치는 "약"이라는 용어로 변형될 수 있는 것으로 이해해야 한다. 따라서, 반대되는 지시가 없는 한, 명세서 및 첨부된 청구범위에서 제시하는 수치적 매개변수는 본 발명에서 얻고자 하는 원하는 성질에 따라 변화될 수 있는 근사치다. 적어도, 그리고 청구범위의 범주에 등가주의의 적용을 제한하려는 시도는 아니지만, 각 수치적 매개변수는 보고된 유효 숫자로, 그리고 통상의 기술을 적용하여 최소한 해석되어야 한다. 본 발명의 넓은 범위를 설정하는 수치 범위 및 매개변수가 근사치임에도 불구하고, 특정 실시예에서 제시하는 수치 값은 가능한 정확하게 기록한다. 그러나, 임의의 수치 값은 이들의 각 테스트 측정에서 볼 수 있는 표준 편차로 인하여 필연적으로 특정 오차를 포함한다.

[0461] 본 발명을 설명함에 있어서 내용(특히 다음의 청구 범위에서)에서 사용된 단수 개념의 용어들은 여기에서 다른 언급이 없는 한, 또는 내용에 의해 명시적으로 모순되지 않는 한, 단수와 복수 개념을 모두 포함하는 것으로 간주한다. 여기에서 값의 범위를 언급한 것은 해당 범위에 속하는 각각의 별개 값을 개별적으로 언급하는 것의 속 기법 역할을 위한 단순한 의도다. 여기에서 다른 언급이 없는 한, 각 개별 값은 마치 이들이 개별적으로 언급된 것과 같이 명세서에 통합된다. 여기에서 설명하는 모든 방법은 여기에서 다른 언급이 없는 한, 또는 내용에 의해 명시적으로 모순되지 않는 한, 임의의 적당한 순서로 실시할 수 있다. 여기에서 제공하는 임의의 그리고 모든 실시예 또는 임의의 언어(예전대, "~와 같은")의 사용은 본 발명을 단순히 더 잘 설명하기 위함이며, 청구되는 본 발명의 범위를 제한하고자 함은 아니다. 명세서에서 어떠한 언어도 본 발명의 실시에 필수적인 임의의 비-청구된 요소를 지칭하는 것으로 간주해서는 안된다.

[0462] 여기에서 공개하는 본 발명의 대체 요소들 또는 구체예의 집단 나누기를 제한하는 것으로 간주해서는 안된다. 각 집단 구성원은 개별적으로 언급되고 청구될 수 있으며, 또는 집단의 다른 구성원들 또는 여기에서 볼 수 있는 다른 요소들과 임의의 조합될 수도 있다. 집단내 하나 이상의 구성원은 편의성 및/또는 특허성의 이유로 집단에 포함되거나 또는 집단으로부터 제거될 수 있는 것으로 기대한다. 이러한 임의의 포함 또는 제거가 있을 때, 명세서는 이러한 변형된 집단을 포함하는 것으로 간주하며, 따라서 첨부된 청구범위에 이용된 모든 마크시(Markush) 집단의 기재된 설명에 충실하다.

[0463] 본 발명을 실시함에 있어서 발명자들이 알고 있는 가장 적합한 형태를 포함한 본 발명의 특정 구체예들을 여기에서 설명하고 있다. 물론, 설명된 구체예에 변이는 전술한 설명을 읽는다면 당업계에 숙련자들에게 자명할 것이다. 발명자들은 숙련자들이 이러한 적합한 변이를 이용할 수 있다고 기대하고, 그리고 발명자들은 여기에서 특별히 언급한 것과 다른 방법으로 본 발명이 실시될 수 있도록 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용가능한 법에 의해 허용되는 한 첨부된 청구범위에서 언급하는 주제의 모든 변경 및 등가체를 포함한다. 더욱이, 상기에서 설명하는 요소들의 임의의 조합들도 여기에서 다른 언급이 없는 한, 또는 내용에 의해 명시적으로 모순되지 않는 한, 본 발명에 포함된다.

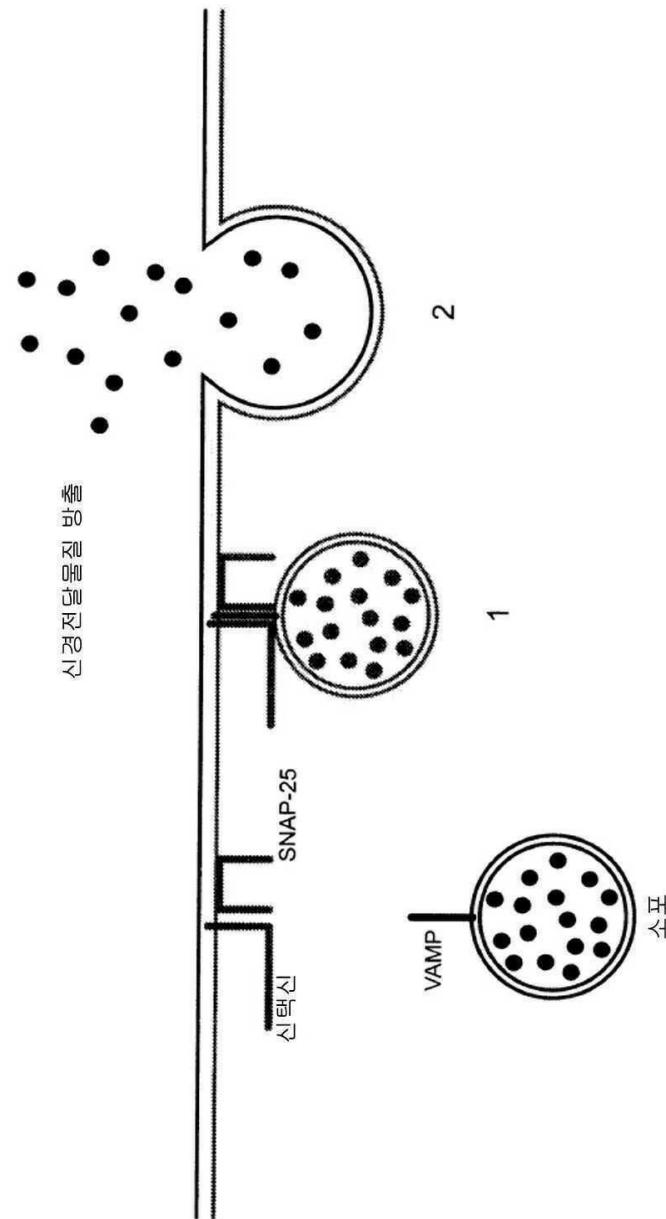
[0464] 여기에서 설명되는 특정 구체예들은 구성하는 또는 필수적으로 구성하는 언어를 이용하여 청구항에서 추가 제한될 수 있다. 청구항에서 사용될 때, 출원될 때 또는 추가 보정에 의해서건 상관없이, 전환 용어(transition term) "~로 구성되는"은 청구항에 명시된 임의의 요소, 단계 또는 성분은 배제한다. 전환 용어 "필수적으로 ~로 구성되는"은 명시된 재료 또는 단계 및 기본적인 그리고 신규한 특징에 물질적으로 영향을 주지 않는 것들로 청구항의 범위를 제한한다. 본 발명의 청구된 구체예는 고유적으로 또는 명시적으로 설명되고, 여기에서 할 수 있다.

[0465] 더우기, 본 명세서를 통하여 특허 및 인쇄된 공개물을 여러 차례 언급하였다. 각 언급된 참고문헌 및 인쇄된 공개물은 전문이 개별적으로 참고문헌에 통합된다.

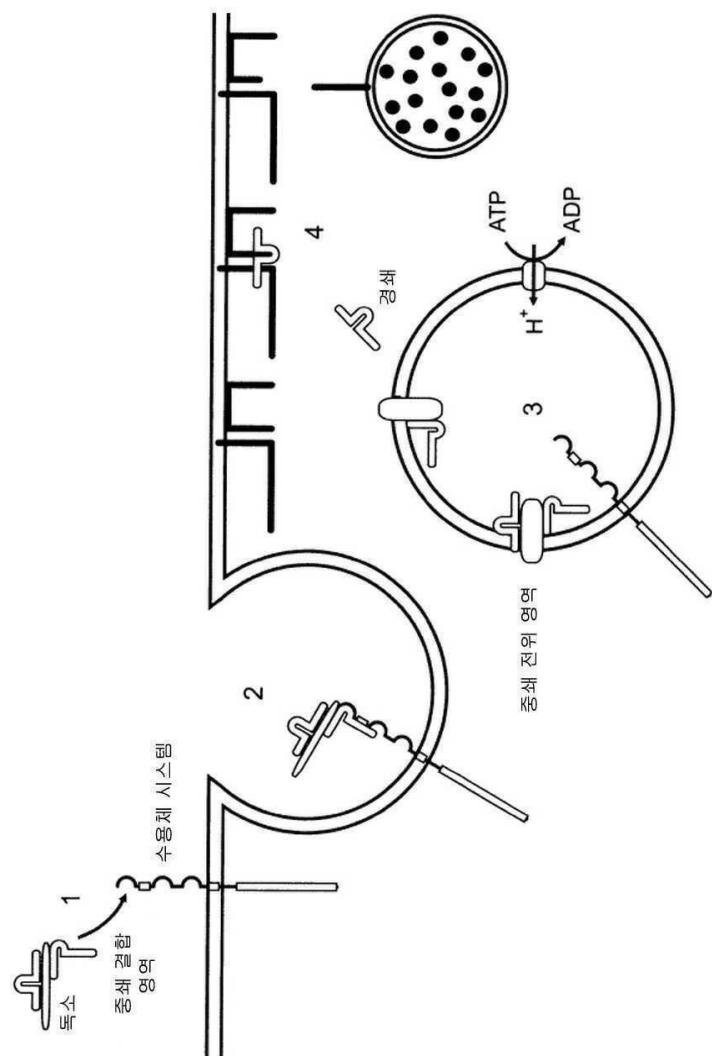
[0466] 끝으로, 여기에서 공개하는 본 발명의 구체예들은 본 발명의 원리들을 설명하는 것으로 이해해야 한다. 이용할 수 있는 기타 변형도 본 발명의 범위내에 있다. 따라서, 실시예를 통하여, 이에 한정되지 않고, 본 발명의 대체 형태가 여기에서 교시에 따라 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 보여지고, 설명된 것에 정확하게 한정되지 않는다.

도면

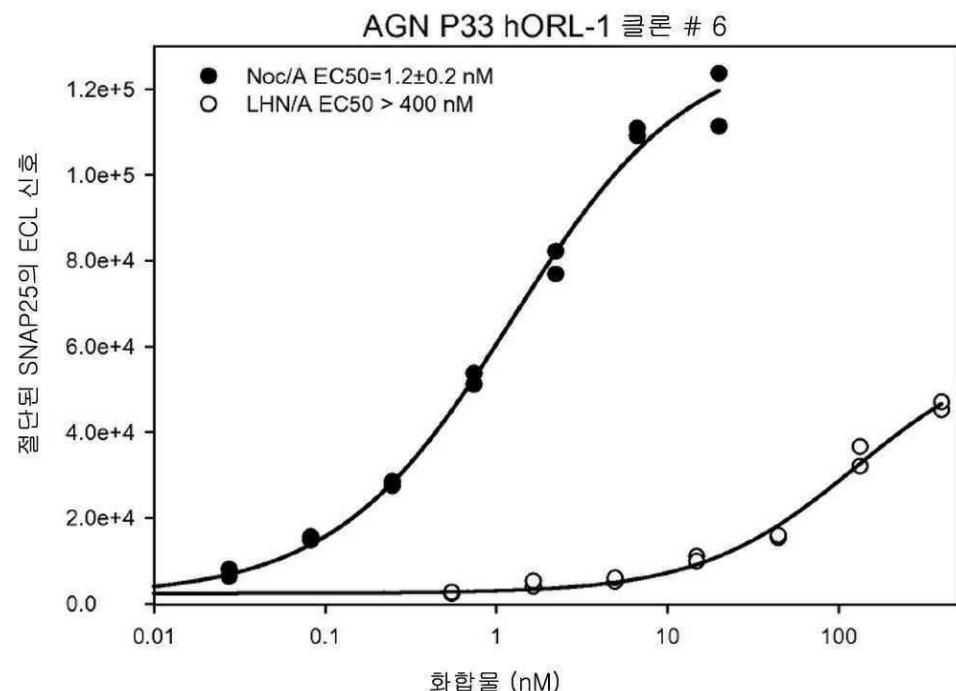
도면 1a



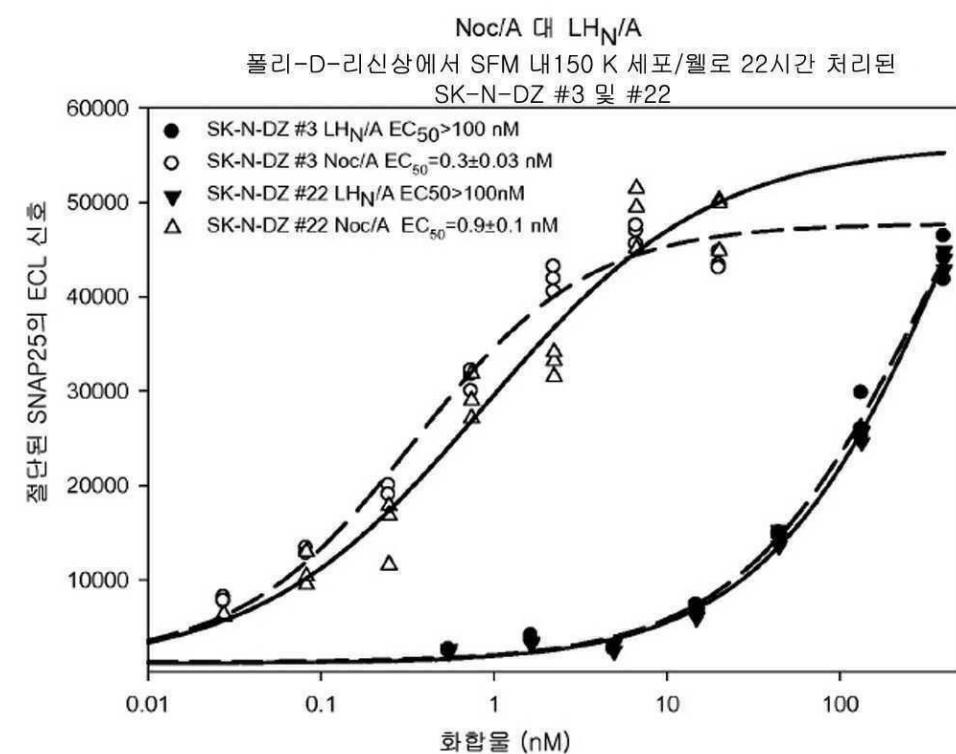
도면 1b



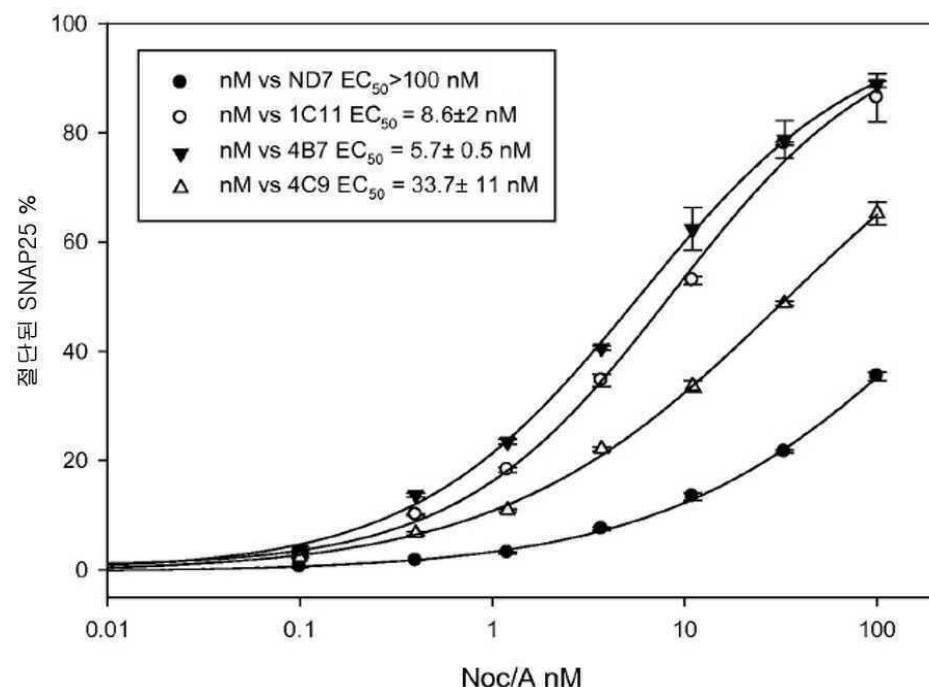
## 도면2



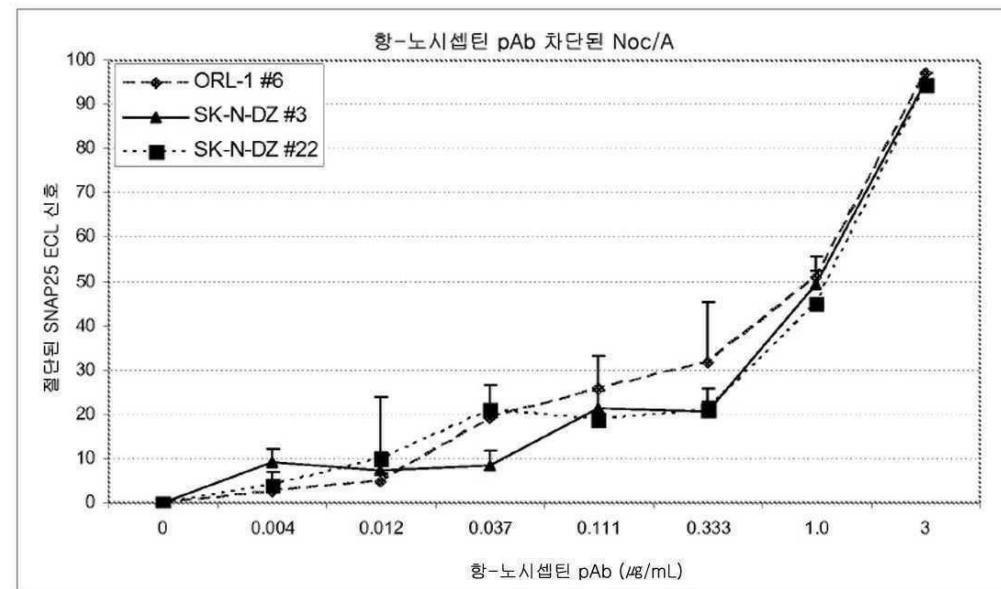
## 도면3



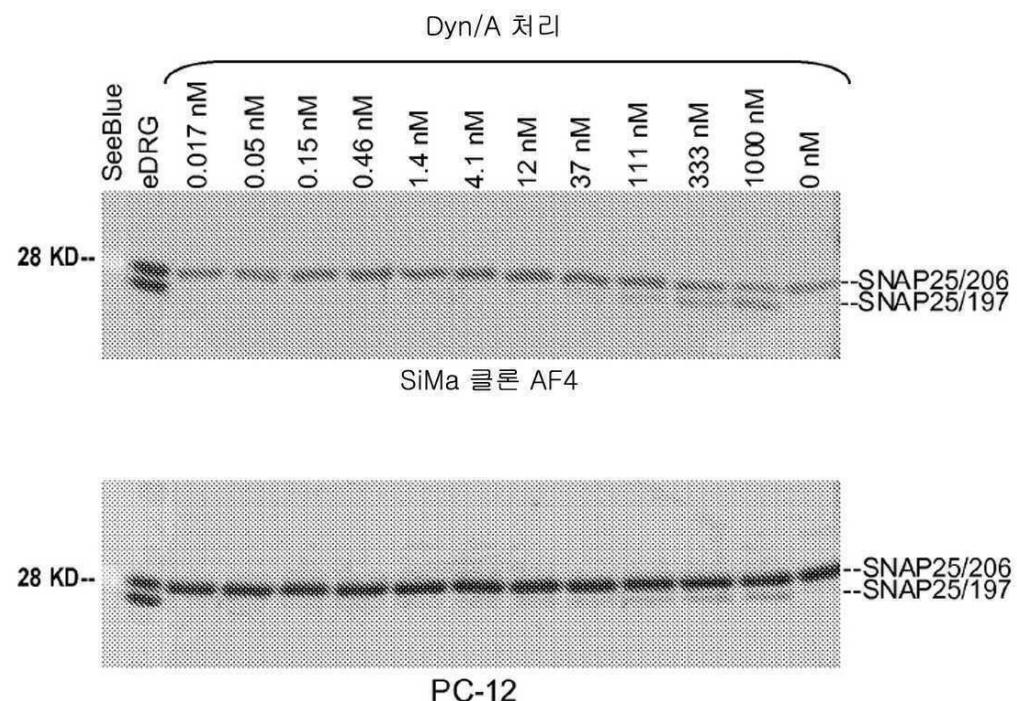
## 도면4



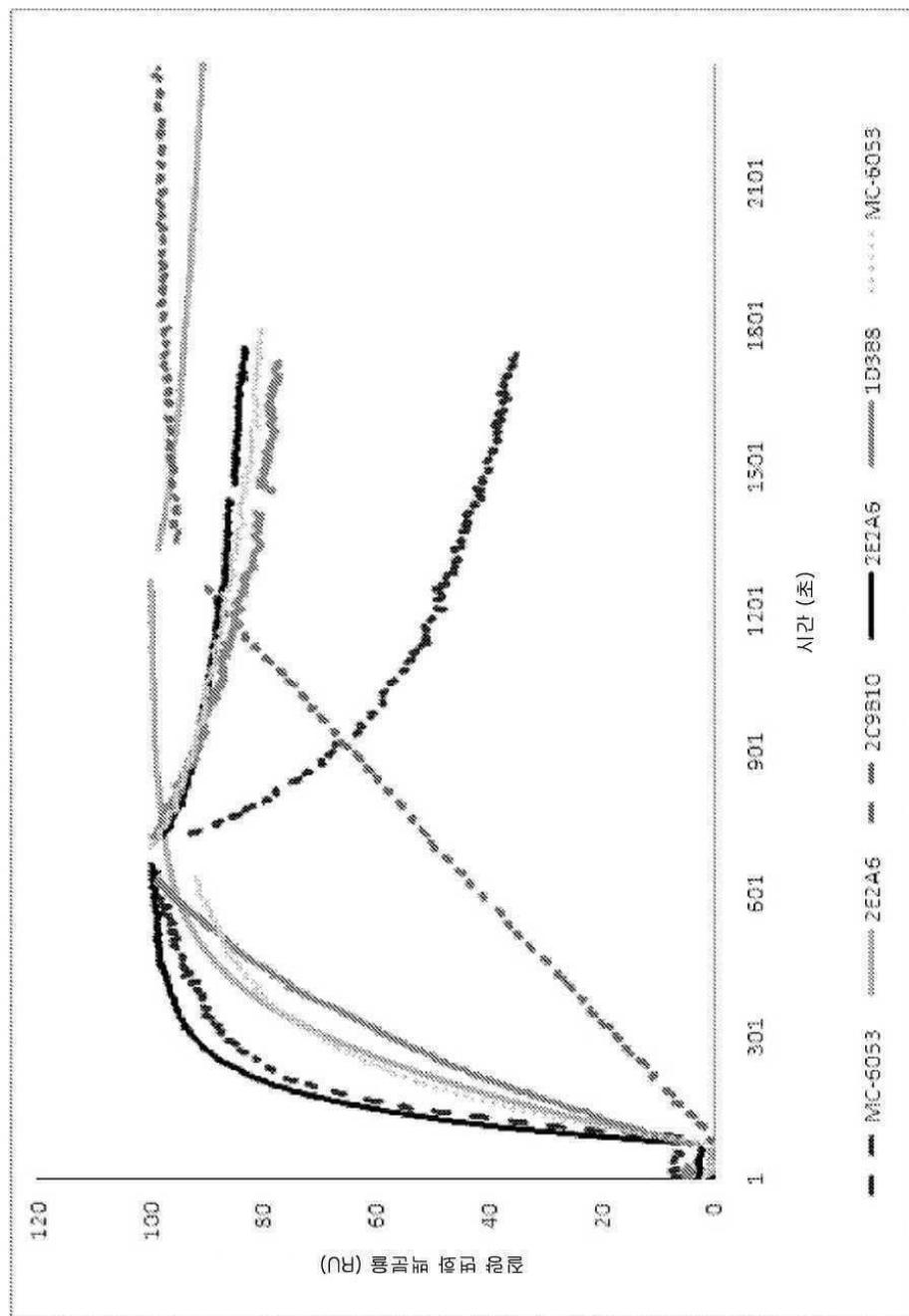
## 도면5



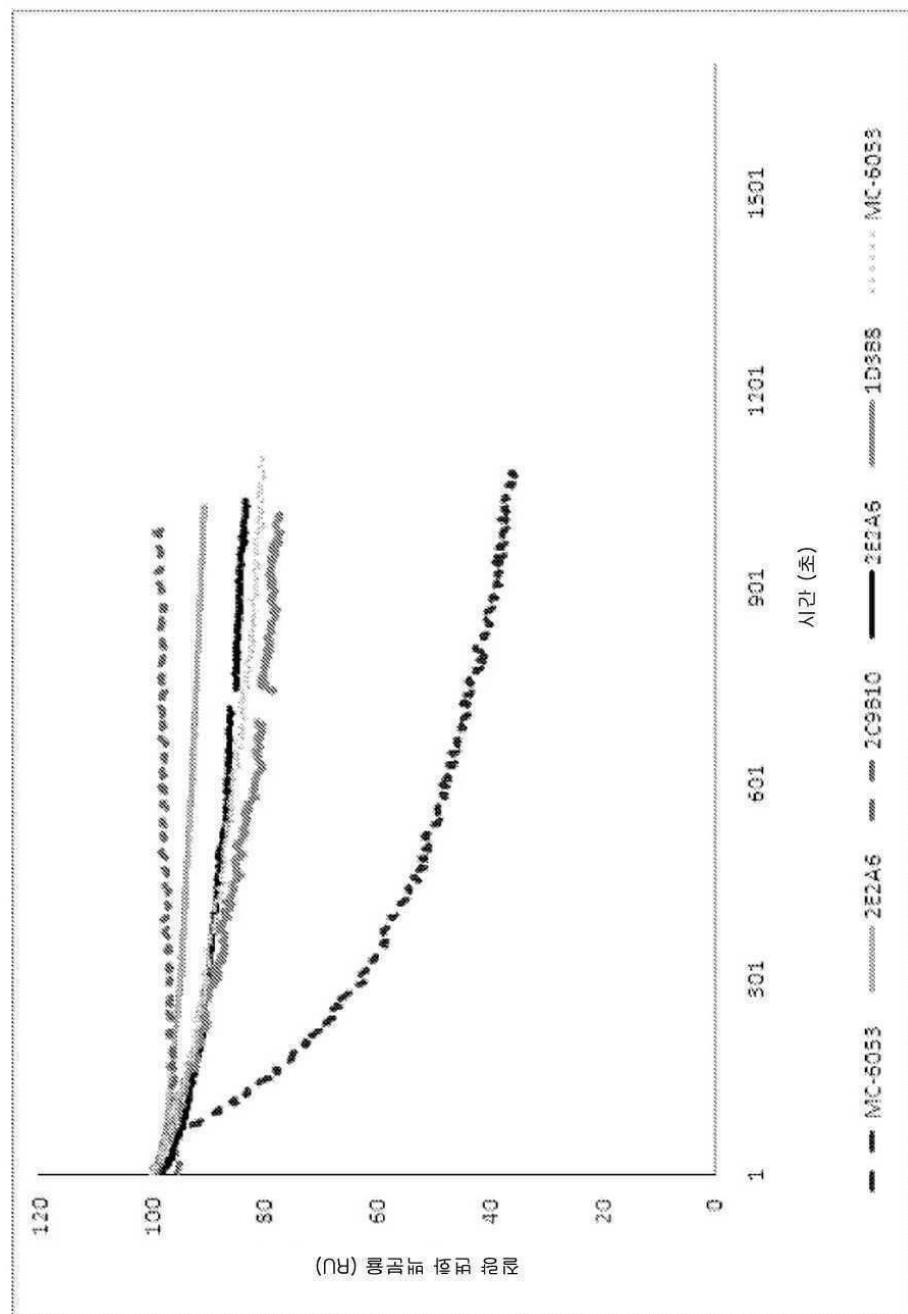
## 도면6



### 도면7a



## 도면7b



## 서열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Wang, Joanne

Zhu, Hong

Hodges, D. Dianne

Fernandez-Salas, Ester

&lt;120&gt; Immuno-Based Retargeted Endopeptidase

Activity Assays

&lt;130&gt; 18496 (BOT)

&lt;150&gt; US 61/160,217

&lt;151&gt; 2009-03-13

&lt;160&gt; 153

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 903

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Retargeted endopeptidase

&lt;400&gt; 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 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
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  
 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 Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 465 470 475 480  
 Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp  
 485 490 495  
 Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn  
 500 505 510  
 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 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 Asn Asn Gln		
885	890	895
Arg Leu Leu Ser Thr Leu Asp		
900		

<210> 2

&lt;211&gt; 908

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Retargeted endopeptidase

&lt;400&gt; 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 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
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
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
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 Ser 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
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 Lys Asn Asn Ile Asn Phe		
785	790	795
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
Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asn 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> Artificial Sequence		
<220>		

&lt;223&gt; Retargeted endopeptidase

&lt;400&gt; 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 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 Ser Gly Gly

865 870 875 880

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Val Gly Arg Pro Glu

885 890 895

Trp Trp Met Asp Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly

900 905

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 919

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Retargeted endopeptidase

&lt;400&gt; 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 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala

485 490 495

Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser

500	505	510
Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile		
515	520	525
Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp		
530	535	540
Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu		
545	550	555
Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu		
565	570	575
Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu		
580	585	590
Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His		
595	600	605
Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu		
610	615	620
Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys		
625	630	635
Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln		
645	650	655
Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp		
660	665	670
Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu		
675	680	685
Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile		
690	695	700
Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile		
705	710	715
Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val		
725	730	735
Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys		
740	745	750

Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val

755 760 765

Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu

770 775 780

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 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 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 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

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 206

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Macaca mulatta

&lt;400&gt; 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 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

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 206

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 8

Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu 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 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

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 206

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 9

Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu 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 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 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 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

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 206

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Gallus gallus

&lt;400&gt; 11

Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu 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 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		

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 204

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Danio rerio

&lt;400&gt; 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 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 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 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 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
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 Met Glu Gln Asn Met Gly Glu Val		
145	150	155
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
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

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 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 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

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 365

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 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
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
Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile		
245	250	255
Thr Arg Leu Val Leu Val Val Ala Val Phe Val Gly Cys Trp Thr		
260	265	270
Pro Val Gln Val Phe Val Leu Ala Gln Gly Leu Gly Val Gln Pro Ser		
275	280	285
Ser Glu Thr Ala Val Ala Ile Leu Arg Phe Cys Thr Ala Leu Gly Tyr		
290	295	300
Val Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn		
305	310	315
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
Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys		
165	170	175
Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Ser		
180	185	190
Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile		
195	200	205
Glu Cys Ser Leu Gln Phe Pro Asp Asp Tyr Ser Trp Trp Asp Leu		
210	215	220
Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu		
225	230	235
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 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
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 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 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

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 493

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 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 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> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
the P1

<400> 32

Asp Glu Ala Asn Gln

1 5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A  
cleavage site

<400> 33

Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A  
cleavage site

<400> 34

Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1 5

<210> 35

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
 the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A  
 cleavage site

&lt;400&gt; 35

Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1 5

&lt;210&gt;

&gt; 36

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
 the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A  
 cleavage site

&lt;400&gt; 36

Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1 5

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
 the P1

&lt;400&gt; 37

Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1 5 10

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A  
cleavage site

<400> 38

Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1	5	10
---	---	----

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A  
cleavage site

<400> 39

Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1	5	10
---	---	----

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxylated  
carboxyl-terminus at the P1 residue of the  
scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<221> SITE

<222> (13)...(13)

<223> carboxylated glutamine

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
the P1

<400> 41

Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A  
cleavage site

<400> 42

Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A  
cleavage site

<400> 43

Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A  
cleavage site

<400> 44

Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys

1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A  
cleavage site

<400> 45

Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys

1 5 10

<210> 46

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at  
the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A

cleavage site

<400> 46

Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys

1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxylated carboxyl-terminus at the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<221> SITE

<222> (13)...(13)

<223> Carboxylated lysine

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen

<400> 48

Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln

1

5

10

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen

<400> 49

Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys

1

5

10

<210> 50

<211> 88

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; BirA-HisTag®-SNAP-25-134-197

&lt;400&gt; 50

Met Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp

1 5 10 15

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

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 97

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; BirA-HisTag®-SNAP-25-134-206

&lt;400&gt; 51

Met Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp

1 5 10 15

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> Artificial Sequence

<220>

<223> BirA peptide

<400> 52

Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His

1 5 10 15

<210> 53

<211> 7570

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct.

<400> 53

gacggatcg ggatctccc gatccc tat ggtcact cgtacaatc tgctctgatg 60

ccgcatagtt aagccagtt ctgctccctg cttgtgttt ggaggtcgct gagtagtgc 120

cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatt aagaatctgc 180

ttagggtagt gcttttgcg ctgcttcgccc tcgagggctg gccattgcatt acgttgtatc 240

catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaaat attaccgcatt tttgacatt 300

gattatttgcatt tagttattaa tagtaatcaa ttacgggttc attagttcat agcccatata 360

tggagttccg ctttacataa cttacggtaa atggccgc tggctgaccg cccaaacgacc 420

cccgccccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatatg aacgccaata gggacttcc 480

attgacgtca atgggtggag tatttacggtaa aactgcca cttggcagta catcaagtgt 540

atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600

atgcccagta catgacctta tgggacttc ctactggca gtacatctac gtattagtca 660  
 tcgttattac catggtgatg cggtttggc agtacatcaa tggcggtgga tagcggttg 720  
 actcacgggg attccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tggagtttgc tttggcacc 780  
 aaaatcaacg ggactttcca aatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggcg 840  
 gtaggcgtgt acggtggag gtctatataa gcagagctcg ttttagtgaac cgtcagatcg 900  
 cctggagacg ccatccacgc tggttgacc tccatagaag acaccggac cgatccagcc 960  
 tcccgccggcc accatggagg gcccggttac cggtaccgga tccagatatac tggcgcccg 1020

ctcagcaagc ttgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaacttt 1080  
 cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatggtcat gttaacggcc acaagttctc 1140  
 tgtcagtgga gaggggtgaag gtgtatgcac atacggaaaa cttaaccctga agttcatctg 1200  
 cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260  
 tcaatgttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gacttttca agagtgcct 1320  
 gcccgaaaggat tatgtacagg aaaggaccat ctcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380  
 acgtgctgaa gtcaagtttgc aaggtgatac ccttgtaat agaatcgagt taaaaggat 1440  
 tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaatg gaatacaact ataactcaca 1500

caatgtatac atcatggcag acaaacaaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagacccg 1560  
 ccacaacattt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccat 1620  
 tggcgatggc cctgtcctt taccagacaa ccattacctg tccacacaaat ctgccttcc 1680  
 gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagttgtaa cagctgtgg 1740  
 gattacacat ggcacatggatg aactgtacaa catcgatggaa ggcggagggtg gaccctttgt 1800  
 taataaacaat ttaattata aagatcctgt aaatgggtt gatattgtt atataaaaat 1860  
 tccaaatgca ggacaaatgc aaccagtaaa agctttaaa attcataata aaatatgggt 1920  
 tattccagaa agagatacat ttacaaatcc tgaagaagga gatcaaatac caccaccaga 1980

agcaaaacaa gttccagttt catattatga ttcaacatata ttaagtacag ataatgaaaa 2040  
 agataattat ttaaaggagg ttacaaaattt atttggagaa atttattcaa ctgatcttgg 2100  
 aagaatgttg ttaacatcaa tagtaagggg aataccattt tggggtgaa gtacaataga 2160  
 tacagaatta aaagttatttgc atactaatttgc tattatgtt atacaaccag atggtagttt 2220  
 tagatcagaa gaacttaatc tagtaataat aggaccctca gctgatatttac tacagttga 2280  
 atgtaaaagc ttggacatg aagttttgaa tcttaacgcga aatggtttagt gctctactca 2340  
 atacatttgc tttagcccgat atttacattt tgggtttgag gatcacttgc aagttgatac 2400  
 aaatccctttt ttaggtgcag gcaaaatttgc tacagatcca gcagtaacat tagcataatgc 2460

acttatacat gctggacata gattatatgg aatagaatt aatccaataa gggttttaa 2520  
 agtaaatact aatgcattt atgaaatgg tgggttagaa gtaagcttg aggaacttag 2580  
 aacatttggg ggacatgatg caaagttat agatagttt cagaaaaacg aattcgct 2640  
 atattattat aataagttt aagatatacg aagtacatt aataaagctt aatcaatgt 2700  
 aggtactact gcttcattttc agtataatggaa aaatgtttt aaagagaaat atctcctatc 2760  
 tgaagataca tctggaaat tttcggtaga taaattaaaaa tttgataagt tatacaaaat 2820  
 gttaacagag atttacacag aggataattt tgttaagttt tttaaagtac ttaacagaaa 2880  
 aacatattt aatttgata aagccgtatt taagataaaat atgtaccta aggtaaat 2940

cacaatataat gatgatttta atttaagaaa tacaattttt gcagcaact ttaatggta 3000  
 aaatacagaa attaataata tgaattttac taaactaaaaa aattttactg gattgttga 3060  
 attttataag ttgtatgttga taagagggat aatcaattcg aatgaacgc gttggcccta 3120  
 ttctatagtg tcacctaaat gctagagctc gctgatcagc ctgcactgtg ccttctagtt 3180  
 gccagccatc tgggtttgc ccctcccccg tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc 3240  
 ccactgtcct ttccataaa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 3300  
 ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggaa ggattgggaa gacaatgca 3360  
 ggcatgtgg ggtatcggttgc ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc agctggggct 3420

ctaggggta tccccacgcg ccctgtacgc ggcattaaag cgccgggggt gtgggtgtt 3480  
 cgccgcacgtt gaccgttaca cttggcagcg ccctagcgcc cgctcccttc gcttcttcc 3540  
 cttcccttct cggcacgttc gccggcttc cccgtcaagc tctaaatcg ggcattccctt 3600  
 tagggttccg atttagtgc ttacggcacc tgcacccaa aaaactgtat tagggtgatg 3660  
 gttcacgttgc tggccatcg ccctgtataga cggttttcg cccttgacg ttggagtcca 3720  
 cgttctttaa tagtgactc ttgttccaaa ctggaaacaac actcaaccct atctcggtct 3780  
 attctttga ttataaggg attttgggaa ttgcggctt ttggtaaaa aatgagctga 3840  
 tttaacaaaa attaacgcg aattaattct gtggatgtg tgcagttttag ggtgtggaaa 3900

gtccccaggc tccccaggca ggcagaagta tgcaaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa 3960  
 ccaggtgtgg aaagtccccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaaagc atgcattca 4020  
 attagtgc aaccatagtc cggccccctaa ctccggccat cccggccctaa actccggcca 4080  
 gttccggcca ttctccggcc catggctgac taatttttt tatttatgca gaggccgagg 4140  
 cgcctctgc ctctgagctt ttcagaagt agtgaggagg ctttttggaa ggcctaggct 4200  
 tttgcaaaaa gtcggggaa gttgtatata ccatttcgg atctgatcaa gagacaggat 4260  
 gaggatcggtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg 4320

tggagaggct attcggtat gactggcac aacagacaat cgctgctct gatgccccc 4380

tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccg ttcttttgt caagaccgac ctgtccggtg 4440  
 ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcggt gctggccacg acggcggtc 4500  
 cttgcgcagc tgtgtcgac gttgtactg aagcgggaag ggactggctg ctattggcg 4560  
 aagtgcggg gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctc tgccgagaaa gtatccatca 4620  
 tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc 4680  
 aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctggatgga agccggctt gtcgatcagg 4740  
 atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg 4800  
 cgccatgcc cgacggcgg gatctcgctg tgaccatgg cgatgcctgc ttgccgata 4860

tcatggtggaa aatggccgc tttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 4920  
 accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat 4980  
 gggctgaccg ctccctcggt ctttacggta tcgcccgtcc cgattcgcag cgcatcgct 5040  
 tctatcgct tcttgcgag ttcttcttag cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca 5100  
 agcgaacccc aacctgccc cacgagatt cgattccacc gccgccttct atgaaaggaa 5160  
 gggcttcgga atcggttcc gggacgcgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat 5220  
 gctggagttc ttgcaccacc ccaacttggtt tattgcagct tataatggaa acaaataaaag 5280  
 caatagcatc acaaatttca caaataaagg attttttca ctgcattcta gttgtggttt 5340

gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataccg tcgaccctta gctagagctt 5400  
 ggcgtaatca tggcatagc tggctcggt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 5460  
 caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctgggt gcctaattgag tgagctaact 5520  
 cacattaatt gcgttgcgt cactgcccgc tttccagtcg gggaaacctgt cgtgccagct 5580  
 gcattaatga atcggcaac ggcggggag aggcggtttgcgtattggc gctttccgc 5640  
 ttccctcgctc actgactcgc tgcgtcggt cgttcggctg cgccgagcgg tatcagctca 5700  
 ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcagggtt aacgcaggaa agaacatgt 5760  
 agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaggcc gctttcggtt cgttttcca 5820

taggctccgc cccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcggaa 5880  
 cccgacagga ctataaagat accaggcggtt tcccccgtt agctccctcg tgcgtctcc 5940  
 tggccgacc ctggccgtt ccggatacct gtccgcctt ctccctcggt gaagcgtggc 6000  
 gctttctcaa tgctcacgt gtaggtatct cagttcggtt taggtcggtc gctccaagct 6060  
 gggctgtgtg cacgaacccc cggttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 6120  
 tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagccca ctggtaacag 6180

gattagcaga gcgaggtatg taggcgtgc tacagagtac ttgaagtgg ggcctaacta 6240  
 cggtacact agaaggacag tatttggat ctgcgtctg ctgaagccag ttaccttcgg 6300

aaaaagagtt ggtagcttt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtgggttttt 6360  
 tggggcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 6420  
 ttctacgggg tctgacgctc agtggAACGA aaactcacgt taagggattt tggtcatgag 6480  
 attatcaaaa aggatcttca cctagatctt tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat 6540  
 ctaaagtata tatgagtaaa ctgggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 6600  
 tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgttagat 6660  
 aactacgata cgggaggcgt taccatctgg ccccaagtgtc gcaatgatac cgcgagaccc 6720  
 acgctcaccc gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 6780

aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc ggaaagctag 6840  
 agtaagtatg tcgcgcgtta atagttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt 6900  
 ggtgtcacgc tcgtcggtt gtaggtgttc attcagctcc gttcccaac gatcaaggcg 6960  
 agttacatga tccccatgt tggcaaaaaa agcggttagc tccttcggc ctccgatcgt 7020  
 tgcagaagt aagttggccg cagtggttac actcatggtt atggcagcac tgcataattc 7080  
 tcttactgtc atgcacatccg taagatgtt ttctgtgact ggtgagttact caaccaagtc 7140  
 attctgagaa tagtgatgc ggcgaccgag ttgctttgc cggcgtcaa tacggataa 7200  
 taccgcgcca catagcagaa cttaaaagt gctcatcatt ggaaacgtt cttcgccgcg 7260

aaaactctca aggatcttac cgctgtttag atccagttcg atgttaaccca ctcgtgcacc 7320  
 caactgatct tcagcatctt ttactttac cagcgttct gggtagccaa aaacaggaag 7380  
 gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataaggcc gacacggaaa tggtaatac tcatactttt 7440  
 ccttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctatgagcg gatacatatt 7500  
 tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatcccc gaaaagtgcc 7560  
 acctgacgtc 7570

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 682

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&gt; GFP-BoNT/A light chain amino acid sequence.

&lt;400&gt; 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 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
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
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 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
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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pQBI-25/GFP expression construct.

<400> 55

gacggatcg gagatctccc gatcccstat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
 ccgcataat aagccagat ctgctccctg cttgtgttt ggaggtcgct gagtagtgcg 120  
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
 ttagggttag gcgtttcgct cgcttcgc tcgaggcctg gccattgcat acgttgtatc 240  
 catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaaac attaccgcca tggacatt 300  
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggtc attagttcat agccatata 360  
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaaacgacc 420

cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480  
 attgacgtca atgggtggag tatttacgtt aaactgccc ctggcagta catcaagtgt 540  
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600  
 atgcccagta catgaccta tgggactt tcacttgca gtacatctac gtattatgtca 660  
 tcgttattac catggtgatg cggtttggc agtacatcaa tggcgtgga tagcggttg 720  
 actcacgggg atttcaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagttt ttttggcacc 780  
 aaaaatcaacg ggactttcca aatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggcgc 840  
 gttagcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctcg ttttagtgaac cgtcagatcg 900

cctggagacg ccatccacgc tggttgacc tccatagaag acaccggac cgatccagcc 960  
 tcccgccggcc accatggagg gcccggttac cggtaccgga tccagatatac tggcggccg 1020  
 ctcagcaagc ttgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080  
 cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatggatgt gttacggcc acaagttctc 1140  
 tgtcagtggaa gagggtgaag gtatgcac atacggaaaa ctaccctga agttcatctg 1200  
 cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggatgt 1260  
 tcaatgctt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gacttttca agagtggcat 1320  
 gcccgaaggt tatgtacagg aaaggaccat cttttcaaa gatgacggca actacaagac 1380

acgtgctgaa gtcaagttt aaggtgatac cttgttaat agaatcgagt taaaaggtat 1440  
 tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattt gaatacaact ataactcaca 1500  
 caatgtatac atcatggcag acaaacaataa gaatggatc aaagtgaact tcaagacccg 1560  
 ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccat 1620  
 tggcgatggc cctgtccctt taccagacaa ccattacctg tccacacaaat ctgcccattc 1680  
 gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagttgtaa cagctgtgg 1740  
 gattacacat ggcacggatg aactgtacaa catcgatgga ggcggagggtg gatgaacgac 1800  
 ttggccctat tctatagtgt cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc 1860

cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctcccccgt gccttccttg accctggaag 1920  
 gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcacatgcacat tgtctgagta 1980  
 ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtgg ggcaggacag caagggggag gattgggaag 2040  
 acaatagcag gcatgcgtgg gatgcgggtgg gctctatggc ttcgtaggcgaa gaaagaacca 2100  
 gctggggctc taggggtat ccccacgcgc cctgtagcgg cgcatthaagc gcggcgggtg 2160  
 tggtggttac ggcacgcgtg accgctacac ttgcacgcgc cctagcgcgc gctccttcg 2220  
 ctttcttccc ttcccttctc gccacgttcg ccggcttcc ccgtcaagct ctaaatcggg 2280  
 gcatccctt agggttccgaa tttagtgctt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt 2340

agggtgatgg ttacgttgtt gggccatcgcc cctgtatagac ggttttcgc ccttgacgt 2400  
 tggagtccac gttcttaat agtggactct tggtaaaac tggaaacaaca ctcaacccta 2460  
 tctcggtcta ttctttgtt ttataaggga ttttggggat ttccggctat tggttaaaaa 2520  
 atgagctgat ttaacaaaaa ttaacgcga attaattctg tggaatgtgt gtcagttagg 2580  
 gtgtggaaag tccccaggct ccccaaggcag gcagaaggtat gcaaagcatg catctcaatt 2640  
 agtcagcaac cagggtgtgaa aagtccccag gctccccagc aggcaagaat atgcaaagca 2700  
 tgcacatcaa tttagttagca accatagtcc cgcccttaac tccgcccattc ccggccctaa 2760  
 ctccggccag ttccggccat tctccggccc atggctgact aattttttt atttatgcag 2820

aggccgagggc cgcccttgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc tttttggag 2880  
 gccttaggctt ttgcaaaaag ctccgggag ctgtatatac catttcgga tctgatcaag 2940  
 agacaggatg aggtcggtt cgcacatgtt aacaagatgg attgcacgcgaa gtttctccgg 3000  
 ccgcttgggtt ggagaggctt ttccggctatg actggggcaca acagacaatc ggctgctctg 3060  
 atgcccggctt gttccggctt tcagcgcagg ggcgcgggtt tcttttgctt aagaccgacc 3120  
 tgtccgggtc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcaacgcg gctatcggtt ctggccacga 3180  
 cggcggtcc ttgcgcagct gtgcacgtt ttgtactga agcgggaagg gactggctgc 3240  
 tattgggcga agtgcggggc caggatctcc tgcacatctca cttgtcttgc gccgagaaag 3300

tatccatcat ggctgatgca atgcggcgcc tgcatacgct tgcatacgctt acctgcccatt 3360  
 tcgaccacca agcggaaacat cgcacatcgac gagcacgtac tcggatggaa gcccggcttg 3420  
 tcgatcgatggaa tgcacatcgac gaagagcatc aggggctcgc gcccggccaa ctgttcgcca 3480  
 ggctcaaggc ggcacatgccc gacggcgagg atctcgctgt gacccatggc gatgcctgtt 3540  
 tgccgaatat catgggtggaa aatggccgtt ttctggatt catcgactgt ggccggctgg 3600  
 gtgtggcgga ccgtatcgac gacatcgatgttggctaccgg tgcacatgtt gaagagctt 3660  
 cggcgaaatg ggctgaccgc ttccctcgatc tttacggatc cggccgtccc gattcgcagc 3720

gcatgcctt ctatgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg gtttcgaaat 3780

gaccggaccaa gcgacgcccc acctggccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 3840  
tgaagggttg ggcttcggaa tcgtttccg ggacgcccggc tggatgatcc tccagcgcgg 3900  
ggatctcatg ctggaggttct tcgcccaccc caacttgttt attgcagctt ataatggta 3960  
caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca ttttttcac tgcatctag 4020  
ttgtggtttgc tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt cgacctctag 4080  
ctagagcttgc gcgtaatcat ggtcatagct gttccctgtg tgaaattgtt atccgctcac 4140  
aattccacac aacatacggac ccggaaagcat aaagtgtaaa gcctgggtg cctaattgagt 4200  
gagctaactc acattaatttgc cgttcgctc actggccgc ttccagtcgg gaaacctgtc 4260

gtgcccgctg cattaatgaa tcggccaacg cgccgggaga ggcggttgc gtattggcg 4320  
ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgcctcgtc gttcgctgc ggcgagcgg 4380  
atcagctcac tcaaaggccg taatacggtt atccacagaa tcagggata acgcaggaaa 4440  
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 4500  
gttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagttagag 4560  
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gctccctgt 4620  
gcgcgtctcct gttccgaccc tgccgcttac cgatcacctg tccgccttc tcccttcggg 4680  
aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcggtc 4740

ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgtcgcc ctttatccgg 4800  
taactatcgt cttagtcca acccgtaag acacgactta tcgcccactgg cagcagccac 4860  
tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtggtg 4920  
gccttaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtac tgcgtctgc tgaagccagt 4980  
taccccgaa aaaagagttt gtagctttt atccggcaaa caaaccaccc ctggtagcgg 5040  
tggttttttt gtttgcaggc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 5100  
tttgcatttt tctacggggt ctgacgctca gtggAACGAA aactcacgtt aagggatttt 5160  
ggtcgtgaga ttatcaaaaa ggatccac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt 5220

taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggctcgac 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 agtggtctg caactttatc cgccctccatc cagtttattt atttttgccg 5520  
ggaaagtctaga gtaagtagttt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttggc ccattgtcac 5580

aggcatcggt gtgtcacgct cgtcggttgg tatggctca tttagctccg gttcccaacg 5640  
 atcaaggcga gttacatgtat ccccatgtt gtgaaaaaaaaa gcggttagct ccttcgggcc 5700

tccgatcggtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcattgtta tggcagact 5760  
 gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgctt tctgtgactg gtgagactc 5820  
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgctg gcgaccgagt tgctctgccc cggcgtcaat 5880  
 acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcattcattg gaaaacgttc 5940  
 ttcgccccga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac 6000  
 tcgtgcaccc aactgatctt cagcatctt tactttcacc agcgttctg ggtgagcaaa 6060  
 aacaggaagg caaaatgccc caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact 6120  
 catacttttc cttttcaat attattgaag catttatcag gtttattgtc tcatgagcgg 6180

atacatattt gaatgtattn agaaaaataa acaaataagg gttccgcgca catttcccg 6240  
 aaaagtgccta cctgacgtc 6259

<210> 56

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GFP amino acid sequence.

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> G-spacer flexible spacer

<400> 57

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; G-spacer flexible spacer

&lt;400&gt; 58

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A-spacer flexible spacer

&lt;400&gt; 59

Ala Ala Ala Ala

1

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A-spacer flexible spacer

&lt;400&gt; 60

Ala Ala Ala Ala Val

1 5

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 3359

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 61

gtcgagggtgc tcatagtggaa gcccggctc ccggggggac ggagccgcac ggttagtagat 60

gggggtgtgg ccgtggcccc cgactctgct cggcgcccc gttcctgctt tgccatccgt 120

gtgggacttc cacgacagtg gaggcacgag agctggccc catatgctgc ttgcccagct 180

tggaaagag gaggctgctg caaaggaccg atcggcggt tcggctgcc ggctcactcg 240

gctgctgcgt ctggctggc gtctgctgag aagatcctct tctaccctgc tctgcacactg 300

tgctcgactg ccagccggct gagggcgggg gtctccacgg tggcccaaggag 360  
 gttcagaag taccgtacag agtggattt cagggcagt gcatggagcc cctttcccc 420  
 gcccgttct gggaggttat ctacggcagc cacccagg gcaaccctgtc cctccgtgac 480  
 cccaaccaca gtcgtcgcc cccgcatacg ctgcataatg ccagccacgg cgccttcgt 540  
 cccctgggc tcaaggtcac catcggtggg ctctacctgg ccgtgtgtt cgagggtc 600  
 ctgggaaact gccttgtcat gtacgtcatc ctcaggcaca cccaaatgaa gacagccacc 660

aatatttaca tcttaacct gcccctggcc gacactctgg tccgtgtac gctgcccttc 720  
 cagggcacgg acatcctcct gggcttctgg ccgttggga atgcgtgtg caagacagt 780  
 attgccattt actactacaa catgttcacc agcacccatc ccctaactgc catgagtgt 840  
 gatcgctatg tagccatctg ccacccatc cgtccctcg acgtccgcac gtccagcaaa 900  
 gcccaggctg tcaatgtggc catctggcc ctggcctctg ttgtcggtt tccctgtgcc 960  
 atcatgggct cggcacaggt cgaggatgaa gagatcgagt gcctggtgga gatccctacc 1020  
 cctcaggatt actggggccc ggttttgc atctgcattt tccctctc cttcatcgac 1080  
 cccgtgctcg tcatctgtt ctgctacagc ctcatgatcc ggccgtccg tggagtccgc 1140

ctgctctcg gctcccgaga gaaggaccgg aacctgcggc gcatcactcg gctgggtctg 1200  
 gtggtagtgg ctgtgttctg gggctgtgg acgcctgtcc aggtcttctg gctggccaa 1260  
 gggctgggg ttccagccgag cagcgagact gccgtggcca ttctgcgtt ctgcacggcc 1320  
 ctggctacg tcaacagctg cctcaacccc atccctacg cttccctggg tgagaacttc 1380  
 aaggcttgtc tccgaagtt ctgctgtca tctgcctgc gcccggacgt gcagggtct 1440  
 gaccgcgtgc gcacgttgc caaggacgtg gcccggcct gcaagaccc tgagacggta 1500  
 ccgcggcccg catgactagg cgtggacctg cccatggtgc ctgtcagccccc gcagagccca 1560  
 tctacgcaca acacagagct cacacaggctc actgctctt aggcggacac accctggcc 1620

ctgagcatcc agagcctggg atgggcttt cccgtggc cagggatgt cgggtccaga 1680  
 ggaggaccta gtgacatcat gggacagggtc aaagcattag ggcacactcc atggcccccag 1740  
 acagactaaa gctgccctcc tgggtgcaggcc cggaggggac acaaggaccc acctggaaagc 1800  
 agctgacatg ctgggtggacg gccgtgactg gagccgtgc ccctccctcc cctgtgttca 1860  
 tgtgacttt ggcctctctg ctgctgcgtt ggcagaaccc tgggtggca ggcacccggaa 1920  
 ggaggaggcag cagctgtgtc atccctgtcc cccatgtgc tgtgtgtt gtgcattggca 1980  
 gggctccaggc tgccttcagc cctgtgacgt ctccctcagg cagctggaca ggcttggcac 2040  
 tgcccgaa gtgcagcagg cagttttctt ttgggtggg acttgcctg agcttggagc 2100

tgccacctgg aggacttgcc tggccact ccacctgtgc agccggggcc accccaggag 2160

aaagtgtcca ggtggggct ggcagtcct ggctgcagac cccgagctgg ccctggcca 2220  
 gccgcaccc tgaaggttt ctgtgtcgtg cacgggtcag gcctcatccc tgactgcagc 2280  
 ttgactctgg gcccaacccc cattccctt caggagacca gcgagaggcc ctggccatt 2340  
 ccctccagcg gtgcaatgaa ctatcatgt gtggaccgtc aaccgc 2400  
 tgtggggcag gtgtctcagg acgaaggcgc cgctgtacca catggcagc tctgttcaca 2460  
 aagtggaggc ctgcgttcc tggcttgac tgctctgtt gggtgggaga agattctcg 2520  
 ggggtccccca catcctccca aggctccct cacagcctc ccttgcttg aagccagagg 2580

tcagtggccg tgctgtgttgc cgggggaagc tgtgtggaag gagaagctgg tggccacagc 2640  
 agagtcctgc tcggggacg cctgcttcat ttacaagcct caagatggc ctgtgttaggg 2700  
 cctgagcttgc ctgccaacg ggaggatggc ttcacagcag agccagcatg aggggtgggg 2760  
 cctgcccaggc ctgtgttgc ccaaactgca aaggctgtgg tggctgttag gacactgcgg 2820  
 gggtgtgggg gggggcgtct gtacctcagg ggatgccccg ctgtggcac ccagagaatc 2880  
 acccttcctg gtctacatg ggaagctgca gttgggtgac tttgcaatg cacttcctac 2940  
 agatgaacta taaaagacc tgcaacattt aaaaaactca tttttccac caaaaccttgc 3000  
 gccaggtaac ctaccccttgg cacctgcaaa gaacagggaaat tgatggctgt ctgcacac 3060

agcctggcgt gtccttcctg ctctggggag tctaggccgt gggactgtt ctggggaggc 3120  
 tcatgtgtc tccatgacgt ctgtggcagg agtccctgag gacgggagct gcctagctac 3180  
 agttttcttgc ccaaggcggag gtgtttgtt aatctgtgt gatgtatgt gcacccctac 3240  
 gtatttatgc atgtggcaag cgttacttcc tggcacgtt gccagccctg ggtctgtctc 3300  
 tgggttaatg aaaaaggacc ctaataaaca cctgctcaat ggctgggtat tcttcgtaa 3359

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 1134

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 62

ttgcaggca gtggcatgga gccccttcc cccgcgcgt tctgggaggt tatctacggc 60  
 agccaccccttcc agggcaacct gtccttcctg agccccaaacc acagtcgtc gccccccat 120

ctgctgtca atgccagcca cggcgccccc ctgcccctcg ggctcaaggt caccatcg 180  
 gggctctacc tggccgtgtg tgtcgaggc ctccctggaa actgccttgt catgcacacc 240  
 aaaaatgaaga cagccaccaa tatttacatc tttaacctgg ccctggccga cactctggc 300  
 ctgctgacgc tgcccttccca gggcacggac atcctctgg gcttctggcc gtttggaaat 360  
 ggcgtgtca agacagtcat tgccattgac tactacaaca tgttcaccag cacccctacc 420

ctaactgcca tgagtgtgga tcgctatgt a cccatctgcc accccatccg tgcctcgac 480  
 gtccgcacgt ccagcaaagc ccaggctgtc aatgtggcca tctggccct ggcctctgtt 540  
 gtcgggttcc cggtgccat catggctcg gcacaggctg aggtatgaaga gatcgagtgc 600

ctgggtggaga tccctacccc tcaggattac tggggcccg tggttgccat ctgcatcttc 660  
 ctcttcct tcatcgccc cgtgctcgtc atctctgtt gtcacagcct catgtccgg 720  
 cggctccgtg gagtccgcct gctctcgggc tcccgagaga aggaccggaa cctgcggcgc 780  
 atcactcggc tgggtgttggt ggtatgttgcgtt gtgttcgtgg gtcgctggac gcctgtccag 840  
 gtcttcgtgc tggcccaagg gctgggggtt cagccgagca gcgagactgc cgtggccatt 900  
 ctgcgttct gcacggccct gggctacgtc aacagtcgc tcaacccat cctctacgcc 960  
 ttccctggatg agaacttcaa ggcctgcttc cgcaagtctt gctgtgcatt tgcctgcgc 1020  
 cgggacgtgc aggtgtctga cggcgtgcgc agcattgcca aggacgtggc cctggcgtgc 1080

aagacctctg agacggtacc gggcccgca tgactaggcg tggacctgcc catg 1134

<210> 63

<211> 1774

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

ccgaggagcc tgggtgtct cctggctcac agcgctccgg gcgaggagag cggcggacg 60  
 cgggggctg gcccgggtcg ggcggcgagg caggcggacg aggccgacag acagcggggc 120  
 ggccggggcgc cggcagccgg cggcgtcggtt gccggccct ctgccttgcc gctccctcg 180  
 cgtcgatcc cgcgcggccag ggcgcacggt ggagagggac gcccggagc cggccggcag 240  
 ccatggaacc ggccccctcc gccggcgccg agctgcagcc cccgcttcc gccaacgcct 300  
 cggacgccta ccctagcgcc tggcccttgcg ctggcgccaa tgcgtcggtt cggccaggcg 360

cgcggagcgc ctgcgtccctc gcccggcaaa tgcctatcac cgcgcgttac tgcggcgtgt 420  
 gcgccgtgg gctgtggc aacgtgtttt tcatgttgcg catgtccgg tacactaaga 480  
 tgaagacggc caccaacatc tacatcttca acctggccctt agccgatgcg ctggccacca 540  
 gcacgcgtgcc ttccagagt gccaagtacc tgcgtggagac gtggcccttc ggcgagctgc 600  
 tctgcaaggc tgcgtctcc atcgactact acaatatgtt caccagcatc ttcacgtca 660  
 ccatgatgag tggcgtccgc tacatcgctg tctggccaccc tgcgtggagac ctggacttcc 720  
 gcacgcgtgc caaggccaaat ctgtatctg gtcgtggcc tcaggcggtt 780  
 gcgtgcccattt catggtcatg gtcgtgaccc gtcggccggaa cggggcagtg gtgtgcattgc 840

tccagttccc cagccccagc tggtaactggg acacgggtgac caagatctgc gtgttccct 900  
 tcgccttcgt ggtccccatc ctcatcatca ccgtgtgcata tggcctcatg ctgctgcgcc 960  
 tgcgcagtgt ggcctgctg tcgggctcca aggagaagga ccgcagccgt cgccgcata 1020  
 cgcgcatggc gcgggtgggtt gtgggcgcct tcgtgggtg tgggcgcctt atccacatct 1080  
 tcgtcatcgat ctggacgctg gtggacatcg accggcgca cccgctgggtg gtggctgcgc 1140  
 tgcacctgtg catcgcgctg ggctacgcca atagcagcct caacccgtg ctctacgctt 1200  
 tcctcgacga gaactcaag cgctgtttcc gccagctctg ccgcaagccc tgcggccccc 1260  
 cagaccccccag cagttcagc cgcggccgc aagccacggc ccgcgagcgt gtcaccgcct 1320

gcaccccgtc cgatggtccc ggcgggtggc ctggccctg accaggccat ccggccccc 1380  
 gagcgccccct ccctagtgac ccggaggcca catgagtccc agtgggaggc gcgagccatg 1440  
 atgtggagtg gggcagtaga aggtcgaggc ctgggaccc ccagatgggg cctctgtttc 1500  
 ggagacggga cccggccgc agatgggcat ggggtggcc tctgggttgg ggcgaggcag 1560  
 aggacagatc aatggcgac tgcctctggt ctgggtgccc cgtccacggc tctaggtggg 1620  
 gcgggaaagc cagtgactcc aggagaggag cgggacccgt ggctctacaa ctgagtcctt 1680  
 aaacaggcga tctccaggaa ggcggggctt caaccttgg acagcttcgg tttctaactt 1740  
 ggagccggac ttccggagtt ggggtccgg gccc 1774

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 1773

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 64

ccgaggagcc tgcgtgctc ctggctcaca ggcgtccggg cgaggagagc gggccggacc 60  
 gggggctggg ccgggtcgccc cggcgaggca ggcggacggc gcgcagagac agcggggcgg 120  
 cccggggcgcg gcacgcggcg ggtcgggcc ggcctctgcc ttggccgtcc cctcgctcg 180  
 gatcccccgcc cccaggcagc cggtgagag ggacgcggcg gacgcggca gccatggAAC 240  
 cggcccccctc cgcggcgcc gagctgcagc ccccgcttt cgccaaacggc tcggacgcct 300  
 accctagcgc ctcccccagc gctggcgcca atgcgtcggtt gcccggaggc ggcggagcgg 360  
 cctcgccctt cgcctggca atgcctcatca ccgcgtctt ctggccgtg tgcggccgtgg 420

ggctgtggg caacgtgtt gtcgtttcg gcatgtccg gtacactaag atgaagacgg 480  
 ccaccaacat ctacatcttc aacctggcct tagccgatgc gctggccacc agcacgtgc 540  
 ctttccagag tgccaagtac ctgtggaga cgtggccctt cggcgagcgt ctctgcaagg 600  
 ctgtgtctc catcgactac tacaatatgt tcaccagcat ctgcgtc accatgtga 660

gtgttgacccg ctacatcgct gtctgccacc ctgtcaaggc cctggacttc cgcacgcctg 720  
ccaaggccaa gctgatcaac atctgtatct gggcctggc ctcaaggcggtt ggcgtgccca 780  
tcatggtcat ggctgtgacc cgtccccggg acggggcagt ggtgtgcatg ctccagttcc 840  
ccagccccag ctggtaactgg gacacggtga ccaagatctg cgtgtccctc ttgcgcctcg 900

tgggtccccat cctcatcatc accgtgtgct atggcctcat gctgctgcgc ctgcgcagtg 960  
tgcgcctgct gtcgggctcc aaggagaagg accgcagcct gcggcgcac t acgcgcatgg 1020  
tgctggtgt t gttgggcgc ttcgtgggtgt gttgggcgc catccacatc ttctgtcatcg 1080  
tctggacgct ggtggacatc gacccggcgcg acccgctggt ggtggctgcg ctgcacctgt 1140  
gcatcgcgct gggctacgcc aatagcagcc tcaaccccg t gcttacgct ttccctcgacg 1200  
agaacttcaa gcgctgttcc cgccagctct gcccgaagcc ctgcggccgc ccagacccca 1260  
gcagcttcag ccgcgcggc gaagccacgg cccgcgagcg tgtcacccgc tgccaccccg 1320  
ccgatggtcc cggcggtggc gtcggccctt gaccaggcca tccggccccc agacgcggcc 1380

<210

> 65

<211> 1154

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 65

atggactccc cgatccagat ctccgcggg gagccgggcc ctacctgcgc cccgagcgcc 60  
tgcctgcccc ccaacagcag cgcctggttt cccggctggg ccgagcccgaa cagcaacggc 120  
agcgcggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc catcccggtc 180  
atcatcacgg cggtctactc cgtagtggtc gtcgtggct tggtgggcaa ctgcgtggtc 240  
atgttcgtga tcatccgata cacaaggatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300  
ctggcttgg cagatgcctt agttactaca accatgcctt tttagtgcgtac ggtctacttg 360  
atgaattcctt ggcctttgg ggatgtgcgt tgcaagatag taatttccat tgattactac 420

aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480  
 tgccaccccg tgaaggctt ggacttccgc acacccttga aggcaaagat catcaatatac 540  
 tgcacatggc tgcgtcgct atctgttggc atctctgcaa tagccttgg aggcaccaaa 600  
 gtcagggaaag acgtcgatgt catttagtgc tccttgact tcccatgtga tgactactcc 660  
 tgggtggacc tcttcatgaa gatctcgctc ttcatcttgc cttcgatgt ccctgtctc 720  
 atcatcatcg tctgtacac cctgtatgtc ctgcgtctca agagcgatcg gtcctttct 780  
 ggctcccgag agaaagatcg caacctgcgt aggtacacca gactggtcct ggtgggtgt 840  
 gcagtcattcg tgcgtcgctg gactccatt cacatattca tcctgggtga ggctctgggg 900

agcacccccc acagcacagc tgctctctcc agctattact tctgcattgc cttaggtat 960  
 accaacagta gcctgaatcc cattctctac gccttcttgc atgaaaactt caagcggtgt 1020  
 ttccggact tctgtttcc actgaagatg aggtggagc ggcagagcac tagcagatgc 1080  
 cgaataacag ttcaaggatcc tgcttacctg agggacatcg atggatgaa taaaccatgt 1140  
 tgactatcg tggaa 1154

<210> 66

<211> 1143

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 66

atggaatccc cgattcagat cttccgcggg gagccggcc ctacctgcgc cccgagcgcc 60  
 tgccgtcccc ccaacagcag cgcctggttt cccggctggg ccgagcccgaa cagcaacggc 120

agcgcggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccggc catccggc 180  
 atcatcacgg cggctactc cgtatgttc gtcgtggct tggggcaat ctcgtggc 240  
 atgttcgtga tcatccgata cacaagatg aagacagcaa ccaacatttacatatttac 300  
 ctggcttgg cagatgtttt agttactaca accatgcctt ttcagatgtac ggtctacttgc 360  
 atgaatttctt ggcctttgg ggtatgtgt tgcaagatag taatttccat tgattactac 420  
 aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480  
 tgccaccccg tgaaggctt ggacttccgc acacccttga aggcaaagat catcaatatac 540  
 tgcacatggc tgcgtcgct atctgttggc atctctgcaa tagccttgg aggcaccaaa 600

gtcagggaaag acgtcgatgt catttagtgc tccttgact tcccatgtga tgactactcc 660  
 tgggtggacc tcttcatgaa gatctcgctc ttcatcttgc cttcgatgt ccctgtctc 720  
 atcatcatcg tctgtacac cctgtatgtc ctgcgtctca agagcgatcg gtcctttct 780  
 ggctcccgag agaaagatcg caacctgcgt aggtacacca gactggtcct ggtgggtgt 840

gcagtttcg tcgtctgctg gactcccatt cacatattca tcctggtgga ggctctgggg 900  
 agcacctccc acagcacagc tgctctctcc agctattact tctgcacatgc cttaggat 960  
 accaacagta gcctgaatcc cattctctac gccttcttg atgaaaactt caagcgggt 1020  
 ttccggact tcgtttcc actgaagatg aggtggagc ggcagagcac tagcagatc 1080

cgaataacag ttcaggatcc tgcttacctg agggacatcg atggatgaa taaaccagta 1140

tga 1143

<210> 67

<211> 2738

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 67

cctgtaaaga aatgtatgag ggctaaatcc atcagcacca aagctggaa gccctccagg 60

ttcatttgga agaaaatact cctctgagct caaaggaaatgt gtatctgtc acaatattgt 120

atgcctgcac taagtttgc tcctgaaaac tcactggaag atagaaagc aagcatgaaa 180

aagcagccgg gtcagacagg cttctggatt cagtgtgtt acatgactt gcctgcatt 240

attgcccatt tctctacaa acaagagaat tcggtaagt ggatgtggca gaactggct 300

gctctgagat gatagaaaag ggctcctgct tttcctgtaa ttgcagcccc ttgttctgt 360

ggttgctaca tgcataataat gtaattctat gagaaggacc agcccttaca tcccatcaaa 420

atgtttctg gaaacctgga gcacagaact ctgatctt ctcacactgt ggcaggagaa 480

gcagcacaag gcacaatgt gaaatagcat ggtccaggat gtgttgcac agaagagtgc 540

ccagtgaaga gacctactcc ttggatcgct ttgcgaaaa tccacccctt ttccctctc 600

cctcccttcc agcctccgaa tcccgcatgg cccacgtcc ctcctgcag cggtgcgggg 660

cagccaggac tggttctgt aagaaacagc aggagctgt gcagcggcga aaggaagcgg 720

ctgaggcgct tggaaacccga aaagtctcg tgctctggc tacctgcac agcgtgccc 780

gccccggccgt cagtaccatg gacagcagcg ctgccccac gaacgccagc aattgcactg 840

atgccttggc gtactcaagt tgctccccag cacccagccc cggttctgg gtcaacttgt 900

cccacttaga tggcaacctg tccgacccat gcggtccgaa ccgcaccgac ctggcgggg 960

gagacagcct gtgcctccg accggcagtc cttccatgtt cacggccatc acgatcatgg 1020

ccctctactc catgtgtgc gtggtggggc tcttcggaaa cttcctggc atgtatgtga 1080

ttgtcagata caccaagatg aagactgcca ccaacatcta catttcaac cttgctctgg 1140

cagatgcctt agccaccagt accctgcct tccagagtgt gaattaccta atggaaacat 1200

ggccatttgg aaccatcctt tgcaagatag tcatctccat agattactat aacatgttca 1260

ccagcatatt caccctgc accatgagtg ttgatgata cattgcagtc tgccaccctg 1320  
tcaaggcctt agatttcgt actccccgaa atgccaaaat tatcaatgtc tgcaactgga 1380  
tcctctcttc agccatttgtt cttccatgtaa tgttcatggc tacaacaaaa tacaggcaag 1440  
gttccataga ttgtacacta acattctctc atccaacctg gtactggaa aacctgctga 1500  
agatctgtgt tttcatcttc gccttcattt tgccagtgtc catcattacc gtgtgctatg 1560  
gactgatgtat cttgcgcctc aagagtgtcc gcatgctctc tggctccaaa gaaaaggaca 1620  
ggatcttcg aaggatcacc aggatggtgc tggatggatggt ggctgtttc atcgatgtct 1680  
ggactcccat tcacatttac gtcatcattt aagccatttgtt tacaatccca gaaactactgt 1740

tccagactgt ttcttggcac ttctgcattt ctctaggtta cacaaacagc tgcctcaacc 1800  
cagtccttta tgcatttctg gatgaaaact tcaaaccatg cttcagagag ttctgtatcc 1860  
caaccccttc caacatttag caacaaaact ccactcgaat tcgtcagaac actagagacc 1920  
acccctccac ggccaataca gtggatagaa ctaatcatca gctagaaaat ctggaagcag 1980  
aaactgctcc gttgcctaa cagggctca tgccattcg accttcacca agcttagaag 2040  
ccaccatgtt tggaaagca gtttgctca agaatgttta ggaggctcta attctctagg 2100  
aaagtgcctg cttttaggtc atccaaacctc ttccctctt ggccactctg ctctgcacat 2160  
tagagggaca gccaaaagta agtggagcat ttggaaggaa aggaatatac cacaccgagg 2220

```
agtccagttt gtgcaagaca cccagtgaa ccaaaaccca tcgtggatg tgaattgaag 2280
tcatcataaa aggtgaccct tctgtctgta agattttattt ttcaagcaaa tatttatgac 2340
ctcaacaaag aagaaccatc tttgttaag ttcaccgtag taacacataa agtaaatgct 2400
acctctgatc aaagcacctt gaatggaagg tccgagtctt ttttagtgttt tgcaaggaa 2460
tgaatccattt attcttattt agactttaa cttcacctt aaatttagcat ctggctaagg 2520
catcattttc acctccattt cttggtttg tattgtttaa aaaaataaca tctctttcat 2580
ctagctccat aattgcaagg gaagagatta gcatgaaagg taatctgaaa cacagtcatg 2640
tgtcagctgt agaaaaggttt attctcatgc actgcaaata cttccaaaga gtcatcatgg 2700
```

gggattttc attcttaggc tttcagtgg tttgttcct 2738

<210> 68

<211> 2053

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 68

catcttgat gagggcagag ctcacgtgc attgaagacg aaacctcgga gaggtcaggc 60  
 gctgttttc ctccctccc tgctcggcg ctccaccaca gttcaacct gcagaggccc 120  
 ggagaacaca accctccga gaagcccagg tccagagcca aaccgtcac tgaccccca 180  
 gcccaggcgc ccagccactc cccaccgta ccatggcga agacgcagac atgcgaatg 240  
 agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtgcgtg gaaagcaccc 300  
 gtcgtatgct gcaactgggtt gaagagagta aagatgtgg tatcaggact ttggttatgt 360

tggatgaaca aggagaacaa ctgcgatcgta tcgaagaagg catgaaccat atcaaccaag 420  
 acatgaagga ggctgagaaa aatttaaaag atttaggaa atgctgtggc ctttcatat 480  
 gtccttgtaa caagcttaaa tcaagtgtat cttacaaaaa agcctgggc aataatcagg 540  
 acggagtggc ggcagccag cctgctcgta tagtggacga acgggagcag atggccatca 600  
 gtggcggctt catccgcagg gtaacaaatg atgcccggaa aatgaaatg gatgaaaacc 660  
 tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggcctggat atggcaatg 720  
 agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaaacaaaa 780  
 ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct ggaaagtggta taagtgtgcc 840

caccgtgtt ctccctccaaa tgctgtcgga caagatagct cttcatgct tttctcatgg 900  
 tattatctag taggtctgca cacataaacac acatcgtcc acccccattt tgaatgttg 960  
 cctgtgtcat ctgtcagctt cccacaataa ctttgtgtct ttgttctct cttggctct 1020  
 ttcttccaa agttgtaca tagtgtcat ttggcggctc taactccttg atgtcttgag 1080  
 tttcattttt cattttctct cctcggcggc atttgcgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140  
 tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgtct tgaaaactg tgacattcca 1200  
 cagagttact gcccacggtcc ttgagtgtac aggctctgaa tctctcaaaa tgtggctct 1260  
 ttggttctc atggctgtta tctgtctta tgattcatg attagacaat gtggaaattac 1320

ataacaggca ttgcactaaa agtgcgtgtt tttatgcatt tgcgtatgaa aactaaatag 1380  
 attttttagt tcctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg atgagacaac 1440  
 acacacacac acaaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat gctcagtatt 1500  
 gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact tttttctgt 1560  
 caatataatag agacttctaa atcataatca tcctttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620  
 gatggatttgc acacactcac cattaaatca ttccagcaa aatataatgtt tggctgaaat 1680  
 tatgtcaaat ggatgtataa tagggttgtt ttgctgtttt tgcgtac gtttggaga 1740  
 gagcaatctt gctgtgaaac agtgcgtggatg taaatttat aaggctgact cttactaacc 1800

accatttccc ctgtggtttg ttatcgtac aattctttgt tgcttaatct agagctatgc 1860

acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa aataatataa 1920  
 atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaatatt aaattccccc 1980  
 tgtctccctc gtcagttgt gaagtgattg acatttgt a ctagttaa aattattaaa 2040  
 aattatagac tcc 2053

<210> 69

<211> 2053

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 69

catctttat gaggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60  
 gctgtcttc ctccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120

ggagaacaca accctcccgaa gaagcccagg tccagagcca aaccgtcac tgacccccc 180  
 gcccaggcgc ccagccactc cccaccgta ccatggccgaa agacgcagac atgcgcaatg 240  
 agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtgcgtg gaaagcaccc 300  
 gtcgtatgtc gcaactgggtt gaagagagta aagatgtgg tatcaggact ttggttatgt 360  
 tggatgaaca aggagaacaa ctggaacgca ttgaggaagg gatggaccaa atcaataagg 420  
 acatgaaaga agcagaaaag aatttgacgg accttagaaaa attctgcggg ctttgggtgt 480  
 gtccctgtaa caagcttaaa tcaagtgtat cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540  
 acggagtggc ggcagccag cctgctcgat tagtggacga acgggagcag atggccatca 600

gtggcggcatt catccgcagg gtaacaaatg atgcccggaa aatgaaatg gatgaaaacc 660  
 tagagcaggt gagcggcattc atcgggaaacc tccgtcacat ggcctggat atggcaatg 720  
 agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgtat tccaacaaaa 780  
 ccagaattga tgaggccaaac caacgtgcaa caaagatgct gggaaatggtaatgtgcc 840  
 caccctgtt ctccctccaa tgctcggg caagatagct cttcatgtt tttctcatgg 900  
 tattatctatg taggtctgca cacataacac acatcagtcc acccccattt gtaatgttgt 960  
 cctgtgtcat ctgtcagttt cccacaataa ctttgggtct tttgttctct cttgggtctct 1020  
 ttctttccaa aggttgtaca tagtggatcat ttgggtggcctc taactccttg atgtcttgag 1080

tttcattttt cattttctct ctcgggtggc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140  
 tcaatgtgct gtgtttttt tcaatccaca gtattgttct tggtaaaactg tgacattcca 1200  
 cagagttact gcccacggtcc tttgagtgcc aggctctgaa tctctcaaaaa tggccgtct 1260  
 ttgggttctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcatg attagacaat gtggaaattac 1320  
 ataacaggca ttgcactaaa agtgtatgtga tttatgcatt tatgtatgag aactaaatag 1380

attttagat tcctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg atgagacaac 1440  
 acacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaagcat gctcagtatt 1500  
 gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgcact ttttcctgt 1560

caatatata agacttctaa atcataatca tcctttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620  
 gatggattt acacactcac catttaatca ttccagcaa aatataatgtt tggctgaaat 1680  
 tatgtcaat ggatgtata tagggtttgt ttgctgctt tgatggctac gtttggaga 1740  
 gagcaatctt gctgtgaaac agtgtggatg taaattttat aaggctgact cttactaacc 1800  
 accatccc ctgtggttt ttagtgcgt aattttgt tgcttaatct agagctatgc 1860  
 acaccaatt gcgtgatgt ttagtagctg ataaagaac ctttaaaaaa aataatataa 1920  
 atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatgc atgtaatatt aaattcctcc 1980  
 tgtctctct gtcggttgt gaagtgattt acatttgtt gctatgtt aattataaa 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 Tyr Lys

195 200 205

Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser

210 215 220

Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile

225 230 235 240

Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Gly Glu Ser Ala Ser Pro Arg

245 250 255

Val Ala Ala Ala Tyr Gln Pro Ile Leu Ala

260 265

<210> 71

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 71

caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtaaaac ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggcta catcttcaact gaccatgctc ttcaactgggt gaggcagaag 120

cctgaacagg gcctggaatg gattgggtat attttcccg gaaatggtaa tattgagta 180

aatgagaagt tcaaggccaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag tactgcctac 240

atgcagctca acagcctgac atctggagat tctgcaatgt atttctgtaa aaagatggac 300

tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

<210> 72

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 73

caggtgaagc tgcaggagtc tggcgcttag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60

tcctgcaagg ctctggta caccttcaact gaccattcta ttcaactgggt gaaggcagaag 120

cctggacagg gcctagaatg gattggatat cttttcccg gaaatggtaa ttttgaatat 180

aatgagaatat tcaaggcCAA ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240

atgcaccta acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaagatggac 300

tactgggcc aaggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 75

caggttcagc tgccggcgtc cgacgctgag ttgggtggaaac ctggggcttc agtggatata 60

tcctgcaggc cttctggcta caccttcaact gaccattcta ttcaactgggt gaaggcggc 120

cctggccagg gcctggaaatg gatcgatat attttcccg gaaatggaaa tattgaatac 180

aatgacaaat tcaaggccaa ggccacactg actgcagaca aatcctccgg cactgcctac 240

atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcgtgtt atttctgtaa aaggatgggg 300

tactgggttc aagggaccc tcgttaccgtc tcctca 336

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 76

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20 25 30

Ser Ile His Trp Val Lys Gln Gln Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Asp Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Gly Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Lys Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 77

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 77

caggtcaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtaaaac ctggggcttc agtgaagatc 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaact gaccattcta ttcaactgggt gaagcagaag 120

cctggacagg gcctagaatg gattggatat cttttcccg gaaatggtaa ttttgactac 180

aatggaaaat tcaaggccaa ggccacactg actgcagaca aatccctccag cactgtctac 240

atgtaccta acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300

tactggggcc aaggaccac 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> DNA

<213> Mus musculus

<400> 79

caggtaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
 tcctgcaagg ctctggata cacattcaact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120  
 cctggcagg gccttgagtg gattggatata attaattcctt acaatgatgg ctctaagtac 180  
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggctc attactgtgc aagaatggac 300

tactgggccc 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> DNA

<213> Mus musculus

<400> 81

caggtaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
 tcctgcaagg cttctggata cacattcaact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120  
 cctggcagg gccttgagtg gattggatata attaatcctt acaatgtatgg ctctaagtac 180  
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggctt 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
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
100	105	110
<210> 83		
<211> 342		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		

<400> 83		
gatgtttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaaggctcc 60		
atctcttgca gatctagtca gaggcattgtca catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120		
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagttc caaccgattt 180		
tctgggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagattcac actcaagatc 240		
agcagagttgg aggctgagga tctggagtt tattactgct ttcaagggtt acatgttctt 300		
cctacgttcg gtgtgggac 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> DNA

<213> Mus musculus

<400> 85

gacatccaga tgaactcagtc tccagcctcc ctagtgcac ctgtgggaga aactgtcacc 60  
atcacatgtc gaacaactga aatatattac agttattttg tatggctca gcagagacag 120

ggaaaatctc ctcagctccg ggtctataat gcaaaatcct tagcagaagg tgtgccatca 180  
agtttcaatg tcagtgtatc aggcacacag ttttctctga agatcaatag cctgcagcct 240  
gaagatttg 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 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 Thr Arg Leu Glu Ile Arg Arg  
 100 105

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 339

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 87

gatgtttg atgacccaaac tccactcaact ttgtcggtta ccattggaca accagctcc 60  
 atctcttgc aagtccaggta gaggccttta tatactaattg gaaaaaccta tttgacttgg 120  
 ttattccag agggcaggcca gtctccaaaa cgcctaattct atctgggtgc tgaattggac 180  
 tctggagtc cctgacagggtt cagtggcagt ggttcaggga cagatttcac actggaaatc 240

accagagtg gaggctgagga tttgggagtt tattactgct tgcagagtgc acatttcca 300  
 ttcacgttc ggctcggcac caagctggaa atcaaacgg 339

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 88

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr

20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile

65 70 75 80

Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser

85 90 95

Ala His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 89

<211> 339

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 89

gatgttgtga tgacccaaac tccactcaact ctgtcggtga ccattggaca accagcgttc 60  
 atctcttgca agtccagtca gagcctcttt aacactaatg gcaaaaccta tttgacttgg 120  
 ttaattcaga gcccaggcca gtctccacag cgcctgatct atctgggtgc caaattggac 180  
 tctggcgtcc cggacagggtt 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> DNA

<213> Mus musculus

<400> 91

gatgttgtgc taactcagtc tcctgccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtca 60  
 ctttcctgca gggccagcca aaatattggc aactacctac actggtatca acagaaatca 120  
 catgagtctc caaggcttct catcaagttat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc 180  
 aggttcagtg gcagtggatc agtcacagat ttcaactctca atatcaacag tgtggagact 240  
 gaagattttgaatgttattt ctgtcaacag agtgacaccc ggcctctcac gttcggtgct 300  
 gggaccaaggc 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

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 97

Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 98

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 99

Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 100

Lys Arg Met Gly Tyr

1 5

&lt;210&gt; 101

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 101

Lys Lys Met Asp Tyr

1 5

&lt;210&gt; 102

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 102

Ala Arg Met Asp Tyr

1 5

&lt;210&gt; 103

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 103

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

&lt;210&gt; 104

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 104

Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Phe Val

1 5 10

&lt;210&gt; 105

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 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

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 110

Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser

1 5

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 111

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 112

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 113

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr

1 5

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 114

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr

1 5

&lt;210&gt; 115

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 115

Leu Gln Ser Ala His Phe Pro Phe Thr

1 5

&lt;210&gt; 116

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 116

Leu Gln Ser Ser His Phe Pro Phe Thr

1 5

&lt;210&gt; 117

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 117

Gln Gln Ser Asp Thr Trp Pro Leu Thr

1 5

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 118

Asp His Ser Ile His

1 5

&lt;210&gt; 119

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 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> Artificial Sequence

<220>

<223> Retargeted endopeptidase

<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 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 Ser Gly Gly  
 465 470 475 480  
 Gly Ser 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
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
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
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		

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Retargeted endopeptidase

&lt;400&gt; 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 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 Ser Ala 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 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 465 470 475 480  
 Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe  
 485 490 495  
 Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu  
 500 505 510  
 Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu  
 515 520 525  
 Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro  
 530 535 540  
 Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu  
 545 550 555 560  
 Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu  
 565 570 575  
 Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu  
 580 585 590  
 His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu  
 595 600 605  
 Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe 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 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> DNA

<213> Mus musculus

<400> 132

caggtaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcaact aactatgtta tacactgggt gaagcaaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatataatcctt acaatgatgg ctctaagttac 180

aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggctt attactgtgc aagacatctc 300

gctaataacct 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 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
---	---

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 135

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

1 5 10

&lt;210&gt; 136

&lt;211&gt; 349

&lt;212&gt;

&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 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 Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu			
210	215	220	
Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Ser Glu Ala			
225	230	235	240
Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Phe			
245	250	255	
Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile 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 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 Phe

245 250 255

Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe

260	265	270
Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala		
275	280	285
His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala		
290	295	300
Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys		
305	310	315
His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu Ser Lys Ser		
325	330	335
Arg Ile Asp Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val		
340	345	
<210> 138		
<211> 349		
<212> PRT		
<213> 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
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 Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu		
210	215	220
Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Ser Glu Ala		
225	230	235
Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Phe		
245	250	255
Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe		
260	265	270
Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala		
275	280	285
His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala		
290	295	300
Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys		
305	310	315
His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu 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		

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 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 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 Ala Leu Asp Val Ala Thr Phe Ala Ala Gly  
 180 185 190  
 Tyr Leu Leu Pro Val Ala Val Val Ser Leu Ala Tyr Gly Arg Thr Leu  
 195 200 205

Arg Phe Leu Trp Ala Ala Val Gly Pro Ala Gly Ala Ala Ala Glu  
 210 215 220  
 Ala Arg Arg Arg Ala Thr Gly Arg Ala Gly Arg Ala Met Leu Ala Val  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Leu Tyr Ala Leu Cys Trp Gly Pro His His Ala Leu Ile Leu  
 245 250 255  
 Cys Phe Trp Tyr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Pro Ala Thr Tyr Ala Cys  
 260 265 270

Arg Leu Ala Ser His Cys Leu Ala Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro  
 275 280 285  
 Leu Val Tyr Ala Leu Ala Ser Arg His Phe Arg Ala Arg Phe Arg Arg

290	295	300
Leu Trp Pro Cys Gly Arg Arg Arg Arg His Arg Ala Arg Arg Ala Leu		
305	310	315
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 Glu Ala Ala Arg Gly Pro Glu		
355	360	365
<210> 141		
<211> 1050		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 141		
atggagctgg cggtcgaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gccccccg 60		
ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcgcc gtggagaact tcgtcacgct ggtgggttcc 120		
ggcctgatct tcgcgtggg tgtgctggc aacagcctag tgcattaccgt gctggcgcc 180		
agcaagccgg gcaagccgca gaggaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240		
gacctggcct acctgtctt ctgcattttt ttccaggcca ccgtgtacgc gctggccacc 300		
tgggtgctgg ggcgcgtcat ctgcaagttt atccactact ttttcacccgt gtccatgtt 360		
gtgagcatct tcaccctggc cgcgtatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420		
cgccgcctt ctccttcag ggtgtccgc aacgcgttc tggcgtgg ctgcattttt 480		
gcgcgttcca ttgcatttgc ctgcgttgc gcctaccacc agggccctttt ccacccgcgc 540		
gccagcaacc agaccccttctg ctgggagcag tggccgcacc ctgcaccaaa gaaggccat 600		
gtgggtgttcca ctttcgttcc cggctaccgt ctgcgttcc tgcattttt ctttcgtt 660		
gcgcgttcca ttatcactt gcataaaaat ttgaagaaca tgtcaaaagaa gtctgaagca 720		
tccaaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtgggtgttgg tgggtttgg aatctccgtt 780		
ctgcgcacc acatcatcca tctctggctt gagttggag tttcccgctt gacccggctt 840		
tccttcctt tcagaatcac cgcactgc ctggcgtaca gcaatttccctt cgtaaatctt 900		
atcattttatg catttcttc taaaatttc aggaaggcctt ataaacaagt gttcaagtgt 960		
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaaa ataaaagtgc aatagacacc 1020		
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050		

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 1050

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 142

atggagctgg cggtcggaa cctcagcag ggcaacgcga gctggccgga gccccccgcc 60  
 ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcgcc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120  
 ggccctgatct tcgcgctggg tgtgctggc aacagcctag tgcgtaccgt gctggcgcc 180  
 agcaagccgg gcaagccgca gaggaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240  
 gacctggcct acctgcttt ctgcattcccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300  
 tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360  
 gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420

cggcgctcct cctccctcag ggtgtccgc aacgcgtgc tggcgctgg ctgcattctgg 480  
 gcgcgtgtcca ttgcattggc ctcgcccgtg gcctaccacc agggcccttt ccacccgcgc 540  
 gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggccgacc ctgcaccaa gaaggctac 600  
 gtgggtgtca ctttcgttt cggctacccgt ctgcgtctcc tgcgtatctg ctttcgttat 660  
 gccaagggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720  
 tccaaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtgggtgttgc tgggtttgg aatctctgg 780  
 ctgcccgcacc acatcatcca tctctggctt gagtttggag tttcccgct gacccggct 840  
 tccttcctct tcagaatcac cgcccaactgc ctggcgataca gcaattcctc cgtgaatctc 900

atcatttatg catttccttc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960  
 cacattcgca aagattcaca cctgagtgtat actaaagaaa gtaaaagtgc aatagacacc 1020  
 ccacccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

&lt;210&gt; 143

&lt;211&gt; 1050

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 143

atggagctgg cggtcggaa cctcagcag ggcaacgcga gctgtccgga gccccccgcc 60  
 ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcgcc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120  
 ggccctgatct tcgcgctggg cgtgtggc aacagcctag tgcgtaccgt gctggcgcc 180

agcaagccgg gcaagccgca gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatgcc 240

gacctggcct acctgctt ctgcattcccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300  
 tgggtgtgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact ttttccacgt gtccatgtg 360  
 gtgagcatct tcaccctggc cgcatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420  
 cggcgctct cctcccttag ggtgtcccg aacgcgtgc tggcggtgg ctgcattgg 480  
 gcgctgtcca ttgcatggc ctgcggcgtg gcctaccacc agggcccttt ccacccgcgc 540  
 gccagcaacc agacccctg ctgggagcag tggccgacc ctgcaccaa gaaggcctac 600  
 gtgggtgtca cttcgctt cggctacctg ctgcgtctcc tgctcatctg cttctgtat 660  
 gccaagggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaagaa gtctgaagca 720

tccaaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtgggtggtg tgggtttgg aatctcctgg 780  
 ctgcgcacc acatcatcca tctctggct gagttggag tttcccgct gacgcggct 840  
 tccttcctt tcagaatcac cgccactgc ctggcgtaca gcaattcctc cgtaaatct 900  
 atcatttatg catttctctc tgaaaatttcc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960  
 cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaaa ataaaagtgc aatagacacc 1020  
 ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

<210> 144

<211> 1164

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 144

atgaacgtct cgggtgccc agggccggg aacgcgagcc aggcggccgg cgggggaggc 60

tggcaccccg aggccgtcat cgtccccctg ctcttcgcgc tcatcttcct cgtggcacc 120  
 gtggcaaca cgcgtggct ggcgtgtcg ctgcgtggcg gccaggcggt cagcaactacc 180  
 aacctgttca tccttaacct gggcgtggcc gacctgttt tcatctgtc ctgcgtgccc 240  
 ttccaggcca ccatctacac cctggacggc tgggtgttcg gtcgtgtgt gtgcaggcg 300  
 gtgcacttcc tcatcttcct caccatgeac gccagcagct tcaacgtggc cgccgtctcc 360  
 ctggacaggt atctggccat ccgctacccg ctgcactccc gcgagctgcg cacccctcga 420  
 aacgcgtgg cagccatcg gtcgttgc gggcgtgtcg tgcgttctc cggccctac 480  
 ctgagctact accgccagtc gcagctggcc aacctgaccg tgcgttgc cgcgtggagc 540

gcccctcgcc gccgcgcctt ggacatctgc accttcgtct tcaatgttcc gtttcgttg 600  
 ctggttctcg gcctgaccta cgccgcacc ttgcgttcc tctggcgcgc cgtcgaccgg 660

gtggccgcgg gctcggtgc cggcgcgcc aagcgaagg tgacacgcat gatcctcatc 720  
 gtggccgcgc tcttctgcct ctgctggatg cccaccacg cgctcatcct ctgcgtgtgg 780  
 ttcggccagt tcccgtcac gcgcgccact tatgcgttc gcatccctc gcacctggtc 840  
 tcctaccca actccgtca aaccccatc gttiacgcgc tggctccaa gcacttcgc 900  
 aaaggcttcc gcacgatctg cgccggcctg ctggccgtg cccagggcc agcctggc 960  
 cgtgtgtgcg ctgcccgcg gggcacccac agtggcagcg tggagacg cgagtccagc 1020

gacctgttgc acatgagcga ggccggcgggg gcccctcgct cctgccccgg cgcttccag 1080  
 ccatgcattcc tcgagccctg tccctggcccg tcctggcagg gccaaaggc aggccacagc 1140  
 atccgtacgg ttagtgtggc ctga 1164

<210> 145

<211> 1107

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 145

atggctgatg cccagaacat ttcaactggac agcccaggaa gtgtggggc cgtggcagt 60  
 cctgtggctt ttgcctaattt cttcctgtgg ggcacagtgg gcaatggctt ggtgtggca 120  
 gtgcctctgc agcctggccc gagtcgtgg caggagctgg cagcaccac ggacctgttc 180  
 atcccaacc tggcggtggc tgacctctgc ttcatcctgt gctgcgtgcc cttccaggcc 240

accatctaca cgctggatgc ctggctttt gggccctcg tctgcaaggc cgtgcacctg 300  
 ctcatctacc tcaccatgtc cgccagcgc tttacgtgg ctgtgtctc cgtggacagg 360  
 tacctggccg tgccggaccc gctgcgtcg cgccctcg gcacgcccgg taacgcccgc 420  
 gccgcagtgg ggctgggtgt gctgcgtggc ggcctttt cggccctta cctcagctac 480  
 tacggcaccg tgccgtacgg cgccgtggag ctctgcgtgc ccgcctggaa ggacgcgcgc 540  
 cgccgcgcgc tggacgtggc cacttcgctt gccggctacc tgctgcccgt ggctgtgg 600  
 agcctggcct acggcgcac gctgcgttc ctgtggccg ccgtgggtcc cgccggcgc 660  
 gcccggccg aggcgcggcgc gagggcgcac ggccgcgcgg ggccgcgcatt gctggcggtg 720

gccgcgtct acgcgtctg ctgggtccg caccacgcgc tcatcctgtt cttctggta 780  
 ggccgcgttcg cttcagccc ggccacctac gcctgcgc tggctcaca ctgcctggcc 840  
 tacgccaact cctgcctcaa cccgctcgta acgcgtctg cctgcgcaca cttccgcgc 900  
 cgcttccgcgc gcctgtggcc gtgcggccgc cgacgcccgc accgtggccg ccgcgccttgc 960  
 cgtcgctcc gccccgcgtc ctggggccca cccggctgcc ccggagacgc ccggccttagc 1020  
 gggaggctgc tggctgggtgg cggccaggccg ccggagccca gggagggacc cgtccacggc 1080

ggagaggctg cccgaggacc ggaataa 1107

<210> 146

<211> 889

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LHn/A fragment

<221> VARIANT

<222> (453)...(455)

<223> Xaa is any amino acid

<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 Glu Asn  
 435 440 445  
 Leu Tyr Phe Gln Xaa Xaa Xaa 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
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
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
Leu Ser Thr His His His His His		
885		
<210> 147		
<211> 2661		

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; LHn/A fragment

&lt;400&gt; 147

atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagacccag tcaacggcgt ggacattgcc 60  
 tataatcaaaa tcccaatgc gggtaatgc cagccgtga aagcattaa aatccataac 120  
 aaaatggg tgatccgga gcgcgatacg ttcacgaacc cggaagaagg agattaaac 180  
 ccaccgcctg aggctaaaca ggtcccggtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240  
 gacaatgaaa aggacaacta cctgaaagggt gttaccaaac tggcagcgt catttattcg 300

acagatctcg gtcgtatgtt gctgacttct attgtgcgcg gcattccgtt ttgggtgg 360  
 agcaccatcg atacagaact caaagtgtt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420  
 gatgggagct accggcccgaa agagcttaac ctcgtatca ttggcccgag cgccgatatt 480  
 atccaattcg aatgtaaatc ttttggcat gaagtccgtt atctgacgcg gaatggctat 540  
 ggtatcgacgc agtatattcg ttttcttca gatttcacat ttggatttga agaaaggcctc 600  
 gaagttgtata cgaaccctct tttaggcgcg ggaaaattcg cgacggaccc agcggtgacc 660  
 ttggcacatg aacttattca tgccggcat cgcttgtatg gaatcgccat taacccgaac 720  
 cgttttca aggtgaatac gaacgcgtat tacgagatgt cggcctttaga agtgccttt 780

gaagaactgc gcacgttgg cggcatgtat gcaaaattta ttgatgtct gcaagaaaac 840  
 gaatttcggc tggacttta caataaaatc aaagacattt catcaacctt aaacaaggcg 900  
 aaaagcattt tgggtaccac ggcttagctt caatatatgtt aaaacgtttt caaagaaaaa 960  
 tacccctta gcaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020  
 ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaattt cttcaaggc 1080  
 ttgaatcgga aaacctatct gaacttcgtt aaagccgtt ttaagatcaa catcgatcc 1140  
 aaagttaact acaccatcta tggatggctt aatctgcgcg atacgaatct ggcggcgaac 1200  
 tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260

ggctgtttt aattctataa gtcctgtgt gtccggta ttatcaccag caaaaccaaa 1320  
 tccttggcg gtggggcga aaacctgtac ttccaggcg gtggcggtgg tgataaggc 1380  
 tataacaagg cttcaatgtt tttatgcattt aaggtgaaca actggactt gttttctct 1440  
 ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag agggaaatttac ttccgatacc 1500  
 aacatcgaaag cagcggaga gaatatttagt ctagatctt ttcaacaata ttacctgacc 1560  
 tttaatttttataacgagcc tgagaacatttccatttgcgaa atctcagctc tgacatcatc 1620

ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgcttccta atggaaagaa atatgaattg 1680  
gacaataaca ccatgttcca ctatctccgc ggcgaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740

attgctctga ccaattcggt aaacgaagcc cttaaatc cttcgctgt gtacacctt 1800  
ttctcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gttttggga 1860  
tgggtggAAC aactggata tgacttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920  
aaaattgccc atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgcactgaa cattggtaac 1980  
atgctgtata aagatgattt tgtggcgcc ctgatcttt cagggctgt tatcctgctg 2040  
gaatttatcc cgaaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgcgcgtt gtcctatatc 2100  
gcaaaacaag tttagactgt ccagacgatc gacaacgcgc tcagtaaacg taacaaaaaa 2160  
tggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaaa caccagatt 2220

gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280  
attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caacttcaac 2340  
atcgacgact tatctcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat taatattaac 2400  
aagttttga accaatgttag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacgggtg 2460  
aaacgtctgg aagacttcga tgcaagcctt aaagatgccc ttctgaagta tatttacgat 2520  
aatcgccgaa ctcttattgg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580  
agtacagaca tccctttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgctt gctgtccacg 2640  
caccatcacc atcaccacta a 2661

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ORL-1 forward oligonucleotide primer

<400> 148

cactcggtcgt gtgtgggtgg 20

<210> 149

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ORL-1 reverse oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 149

aatggccacg gcagtctcgc 20

&lt;210&gt; 150

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Galanin receptor 1 forward oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 150

ccccatcatg tcatccacct 20

&lt;210&gt; 151

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Galanin receptor 1 reverse oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 151

atggggttca ccgaggagtt 20

&lt;210&gt; 152

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Galanin receptor 2 forward oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 152

catcggtggcg gtgtttt 18

&lt;210

&gt; 153

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Galanin receptor 2 reverse oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 153

agcggaaggc gaccaaac

18