



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0077343
(43) 공개일자 2018년07월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/33 (2006.01) *A61K 39/08* (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01) *C07K 1/12* (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/33 (2013.01)
A61K 39/08 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7018705(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2012년11월21일
 심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2015-7004071
 원출원일자(국제) 2012년11월21일
 심사청구일자 2015년03월09일
- (85) 번역문제출일자 2018년06월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2012/073283
- (87) 국제공개번호 WO 2014/079495
 국제공개일자 2014년05월30일
- (71) 출원인
 입센 바이오이노베이션 리미티드
 영국 오엑스14 4알와이 옥스퍼드셔 애빙던 밀튼
 파크 파크 드라이브 102
- (72) 발명자
 런델, 안드레아스
 독일, 핸노벌, 30171, 벤델스트라세. 13번
- (74) 대리인
 양영준, 서정애

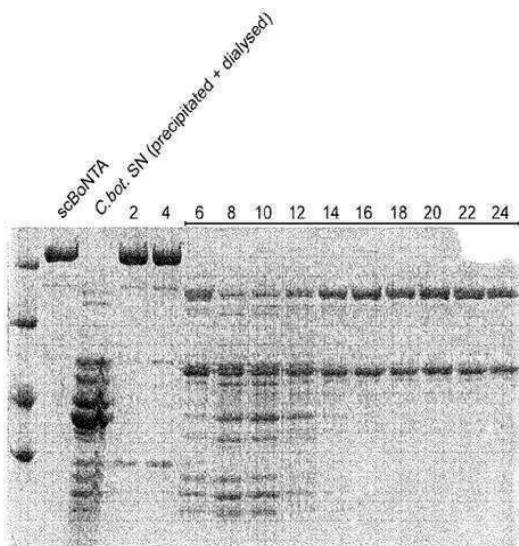
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 단백질 가수분해 처리된 폴리펩티드의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 새로운 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드, 및 스크리닝 방법과 제조 방법에서 사용되는 상기 폴리펩티드의 다양한 용도와 관련된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/40 (2013.01)

C07K 1/12 (2013.01)

C07K 16/1282 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

G01N 33/15 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

이중 사슬 보툴리눔 신경독 혈청형 A(BoNT/A)의 제조를 위한 단일 사슬 BoNT/A의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 새로운 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드, 및 스크리닝 방법 및 제조 방법에서 상기 폴리펩티드를 다양하게 사용하는 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*) 및 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*)는 강력한 신경독인 보툴리눔 신경독(BoNTs) 및 테타누스 신경독(TeNT)을 각각 생산한다. 이런 클로스트리듐 신경독(CNTs)은 특이적으로 신경세포에 결합하여 신경전달물질(neurotransmitter)의 방출을 저해한다. 클로스트리듐 보툴리눔은 항원적으로 서로 다른 보툴리눔 신경독(BoNT) A에서 G로 지정된 일곱개의 혈청형을 분비한다. 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*)에서 분비되는 테타누스 신경독(TeNT)과 관련된 모든 혈청형은 세포막 융합을 조절하는 SNARE 복합체의 형성과 관련된 단백질을 절단하여 시냅스 외포작용을 막는 Zn²⁺-엔도프로테아제이다. CNTs는 보툴리눔 및 테타누스에서 볼 수 있는 이완성근육마비를 발생시킨다. 또한, CNT 활성도는 분비샘 분비물(glandular secretion)에도 영향을 미치는 것으로 나타난다. 이러한 CNT가 근육과 분비샘의 활성도에 미치는 생리학적 효과는 점차 다양한 치료 및 화장품 분야에서 이용되고 있다. 보툴리눔 신경독의 혈청형 A(BoNT/A)은 1989년 미국에서 사시증(strabism), 안검경련(blepharospasm) 및 다른 질병의 치료를 위해 인간에게 사용하는 것이 승인되었다. 이것은 상업적으로 보툴리눔 신경독 단백질 제조로 사용될 수 있는데, 예를 들어, 상품명 BOTOX (Allergan 사) 및 상품명 DYSPORT (Ipsen 사)가 있다. 치료에 적용하기 위해, 신경독 및 부가적인 박테리아 단백질을 포함하는 복합체가 치료를 위한 근육에 직접적으로 주입된다. 생리적 pH에서, 상기 신경독이 단백질 복합체로부터 방출되어(Eisele 등. 2011, *Toxicon* 57(4): 555-65 참조) 원하는 약리학적인 효과가 발생한다. 착화 단백질이 존재하지 않는 개선된 BoNT/A의 제조는 상품명 XEOMIN 또는 Bocouture (메르츠제약, 프랑크푸르트/독일) 아래 가능하다. BoNT의 효과는 오직 일시적인데, 치료효과를 유지하기 위해 BoNT의 반복적인 투여가 필요한 이유이기도 하다.

[0003] 각 CNT는 초기에 비활성 단일사슬 폴리펩티드로 합성된다. BoNT의 경우에는, 상기 신경독 폴리펩티드는 대략 150kDa의 분자량을 갖는다. 이 단일사슬 폴리펩티드의 전사 후 처리는 루프(표 1 참조)라 불리는 노출영역에서의 제한된 단백질 분해와 인근 이황화결합의 형성과 관련된다. 활성의 이중-사슬(di-chain) 신경독은 단일 사슬 폴리펩타이드 전구체 단백질의 가수분해에서 유래된 두 개의 절단부위로 구성되는데, 즉 이황화 결합에 의해 연결된 약 50kDa의 N-말단 경쇄와 약 100kDa의 중쇄이다. CNT는 구조적으로 세 개의 도메인 즉, 촉매사슬, 전좌(translocation) 도메인(N-말단 절반)을 포함하는 중쇄 및 수용체 결합 도메인(C-말단 절반)으로 구성된다 (Kriegstein 1990, *Eur J Biochem* 188: 39; Kriegstein 1991, *Eur J Biochem* 202: 41; Kriegstein 1994, *J 단백질 Chem* 13: 49; Lacy et al., 1998, *Nat. Struct. Biol.* 5(10):898-902 참조). 엔도펩티다아제 활성은 촉매 도메인을 형성하는 아미노산 잔기와 전좌 도메인을 형성하는 아미노산 잔기 사이의 단일사슬에 존재하는 절단부위 수에 의존하여 경쇄 및 중쇄와 이전 루프부위를 나타내고, 경쇄 및 중쇄가 되기 위한 신경독의 단일사슬을 연결하는 특정한 짧은 펩티드와 같은 두 개의 큰 절단 생성물을 생성한다(하기의 표1 참조).

[0004] 발효용액으로부터 CNT를 정제하는 것은 미처리된 폴리펩티드, 부분적으로 처리된 폴리펩티드 및 완전히 처리된 폴리펩티드의 혼합물이 모두 매우 유사한 생화학적 및 물리학적 특성을 가진 신경독을 포함하고 있기 때문에 특별한 도전이라 할 수 있다. 만약 경쇄와 상기 루프 사이에 내단백질 분해활성이 가수분해된 펩티드 결합이 있고, 반면 상기 루프와 중쇄의 N-말단은 온전하다면 전형적으로 부분처리된 신경독이 발생한다. 또한, 만약 내단백질 분해활성이 중쇄에서 루프 펩티드를 방출시키고, 반면, 루프 펩티드와 경쇄의 C-말단 사이의 펩티드 결합을 아직 가수분해하지 않았다면 부분처리된 신경독 또한 생성될 수 있다. 발효상태 및 신경독 유형에 의존

하여, 상기의 루프 펩티드가 완전히 결여된 완전처리 폴리펩티드는 5% 내지 90%의 부분처리되거나 또는 미처리된 폴리펩티드로 상당히 오염될 수 있다. 하지만 몇가지 경우에 있어서, 치료적 용도로 사용되기 이전에 주로 미처리된 신경독을 생물학적으로 활성을 띠게 하기 위해서 엔도펩티다아제로 처리될 필요가 있다.

[0005]

[0005] 종래기술은 미처리 또는 부분처리된 전구체 단백질의 양을 감소시키기 위한 이종의 프로테아제를 포함하는 클로스트리듐 신경독을 치료하기 위한 다양한 방법에 대해 설명한다. 클로스트리듐 신경독의 활성을 위해 프로테아제가 가장 넓게 사용되는데, 그 중 혈청형 B(BoNT/B) 및 E(BoNT/E)의 클로스트리듐 신경독을 활성시키기 위해 사용되는 트립신(Trypsin)은(DasGupta & Sugiyama 1972, Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 108-112; Kozaki et al., 1974, Infect. Immun. 10: 750-756 참조) 주로 BoNT/A의 해비 서브유닛(heavy subunit)의 C-말단 가까이의 단백질 분해작용으로 이차 생성물을 생성하기 위해 나타나고, 그것의 세포 수용체에 결합하기 위한 독소를 파괴하기 위해 나타난다(Shone et al., 1985, Eur. J. Bioch. 151: 75-82 참조). 이론적으로 좀 더 특이적인 절단생성물은 BoNT/A를 생성하는 C. 보툴리눔과 같은 천연 호스트로부터 분리된 내인성(내생의) 프로테아제로부터 기대할 수 있다. 따라서, 기본 숙주세포로부터 클로스트리듐 신경독의 단백질 가수분해 활동과 관련된 내인성 프로테아제를 분리하기 위한 다양한 시도가 이루어지고 있다. BoNT/A 일부를 생산하는 클로스트리듐 보툴리눔의 클러스터에서 정제된 Dekleva & DasGupta (Dekleva & DasGupta, 1989, Biochem. Biophys. Res. Commun. 162: 767-772 참조)는 단백질 가수분해 BoNT/A를 중쇄 및 경쇄로 절단할 수 있다. 또한, 같은 저자에 의한 최신연구에서는 클로스트리듐 보툴리눔에서 분리된 내인성 프로테아제를 특징화하고, 15.5kDa의 폴리펩티드와 48kDa의 폴리펩티드로 구성된 62kDa의 단백질을 밝혀내었다. 그러나, Dekleva & DasGupta의 62kDa 단백질로의 제한된 노출 후 CNTs의 상당한 분열에 대한 관찰은 분리된 프로테아제가 클로스트리듐 세포배양과 감염에서 CNTs의 활성을 담당하는 단백질 분해효소와 동일하지 않을 수도 있다는 점을 시사한다. 사실, 최근에 일부 다른 사람들이 클로스트리페인(Clostripain), 또는, 지정된 클로스트리디오펩티다아제(clostridiopeptidase) B는(Mitchel & Harrington, 1968, JBC 243: 4683-4692 참조) CNTs의 특정 활성과 관련되어 있을 수도 있다는 사실을 제안했다(Sebaihia 등., 2007, Genome Res. 17(7):1082-1092; WO2009/014854 참조). 놀랍게도, 이 효소의 구조 및 기질 특이성은 클로스트리듐 히스톨리티쿰(Clostridium histolyticum) (Dargatz et al. 1993 참조)에서 분비된 알파-클로스트리페인(α-Clostripain), 클로스트리듐 보툴리눔(CB01920)에 존재하는 동족체(homolog)(아미노산 74%의 동일성)를 연상시킨다. 상기 클로스트리듐 히스톨리티쿰 알파-클로스트리페인은 아르기닐 결합(arginyl bond)에 대해 염격한 특이성을 가진 시스테인 엔도펩티다아제이다. 이것은 혜테로다이머(heterodimeric)의 활성효소(Dargatz et al. 1993 참조)를 형성하기 위해 연합할 수 있는 15.4- 및 43-kDa 폴리펩티드를 생성하기 위한 자기촉매적(autocatalytic) 절단을 수행하는 비활성의 프리프로-효소(propre-enzyme)로서 합성된다. 클로스트리듐 히스톨리티쿰 알파클로스트리페인 및 클로스트리듐 보툴리눔 62-kDa 프로테아제는 모두 같은 활성도를 가지고 같은 프로테아제 억제제(inhibitors)에 취약한 환원제 및 칼슘을 필요로 한다. 이런 데이터는 알파-클로스트리페인(CB01920)의 클로스트리듐 보툴리눔 오솔로그(ortholog)는 클로스트리듐 보툴리눔 신경독의 단백질 분해 절단을 담당하는 내인성 프로테아제라는 것을 강하게 암시한다. 또한 클로스트리페인(CPE0846)을 코딩하는 유전자는 클로스트리듐 페르프링겐스(C. perfringens)에서 발견되고, VirR/VirS 두 개로 구성된 시스템에 의해 우호적으로 조절된다는 사실이 밝혀졌다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

[0006] 그러나 지금까지 더 결정적인 실험적 증거가 없고, 효과적으로 단일사슬 전구체 CNTs를 본격적으로 성숙한 분열생성물, 즉, 이중사슬(di-chain) 신경독으로 변환시키는 프로테아제는 여전히 당업계에서 불가능하다. 본 발명은 상기 언급된 문제를 하나 또는 그 이상 해결할 수 있다.

[0007]

[0007] 미처리 및/또는 부분적으로 미처리된 신경독 폴리펩티드의 양을 감소시키고 신경독 제조의 질을 향상시키기 위한 수단 및 방법이 매우 요구되고 있지만 아직 가능하지 않다. 따라서 본 발명의 기초가 되는 기술적 문제는 종전에 언급된 요구를 해결하기 위한 신경독 폴리펩티드의 제조를 향상시키기 위한 수단 및 방법의 제공으로 볼 수 있다. 상기 기술적 문제는 특허청구범위 및 하기에서 설명하는 실시예에 의해 해결될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0008]

[0008] 일 측면에서, 본 발명은 서열 SEQ ID NO: 1과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드와 관련된다. 다른 측면에서, 본 발명은 서열 SEQ ID NO: 1과 적어도 50% 서열이 동일한 폴리펩티드 서열로 구성된 단백질 가수분해적으로 활성인 폴리펩티드와 관련된다. 다른 측면

에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에서 보여지는 폴리펩티드 서열로 구성된 단백질 가수분해적으로 활성인 폴리펩티드 단백질과 관련된다.

[0009] 본 명세서에서 사용되는 용어 “단백질 가수분해 활성 폴리펩티드”는 본 발명 폴리펩티드의 촉매기능을 의미하는데, 본 발명의 폴리펩티드가 웨프티드 결합을 가수분해할 수 있다는 것을 의미한다. 일 측면에서, “단백질 가수분해 활성 폴리펩티드”는 SEQ ID Nos: 4 내지 25의 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 가수분해 할 수 있는 폴리펩티드를 의미한다. 본 명세서에서 사용하는 용어 “단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드”는 본 발명의 폴리펩티드의 촉매기능을 의미하는데, 본 발명의 폴리펩티드가 웨프티드 결합을 가수분해 할 수 없다는 것을 의미한다.

[0010] 당업자는 본 명세서에서 언급된 서열정의에 따른 폴리펩티드가 본 발명에 따른 폴리펩티드인지 상기 폴리펩티드의 단백질분해 활성테스트를 통해 결정할 수 있다. 단백질분해 활성을 결정하는 분석 또는 테스트 시스템은 테스트 기질을 포함한 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50% 서열 동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 접촉하는(contacting) 폴리펩티드를 포함한다. 테스트 기질은 전형적으로 본 발명의 폴리펩티드에 의해 절단될 수 있는 것으로 알려진 폴리펩티드이다. 바람직하게, 상기 테스트기질은 BoNT 또는 그의 절편과 같은 CNT이다. 상기 테스트기질은 예를 들어 절단되지 않은/미처리된 BoNT, 본 명세서에서 지정된 “scBoNT” 일 수 있고, 예를 들어, 혈청형 A, B, C1, D, E, F 또는 G(예를 들어, “scBoNT/A”, “scBoNT/B” 등)일 수 있고, 또는 테스트기질은 테타누스 신경독일 수 있다. 대안적으로, 상기 테스트기질은 클로스트리듐 신경독의 절편일 수 있는데, 상기 절편은 SEQ ID Nos: 4 내지 25의 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 상기 절편은 50 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 폴리펩티드이거나 또는 최대 49개의 아미노산 잔기의 웨프티드일 수 있다. 본원 명세서 전반에서 사용된 용어 “폴리펩티드”는 50개 이상의 아미노산 잔기를 가진 분자를 의미하는 반면, “펩티드”는 2 내지 49개의 아미노산 잔기를 가진 분자를 의미한다. 일 측면에서, 상기 테스트 기질은 루프 웨프티드 영역과 중쇄 폴리펩티드의 N-말단 절반, 전좌 도메인 HN이 노출된 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 LHN이라 불리는 용해성의 신경독 절편이다. 다른 측면에서, 상기 테스트 기질은 SEQ ID Nos: 4 내지 25 (표 1 참조)의 어느 하나로부터 선택된 웨프티드이거나 포함한다. 또 다른 측면에서, 상기 테스트기질은 두개 또는 그 이상의 혈청형에서 유래된 아미노산 잔기를 포함한 키메라 신경독이다.

[0011] 단백질 분해활성을 결정하는 분석은 전형적으로 테스트기질을 그의 절단생성물로 변환시키는 정도를 결정하는 단계를 포함한다. 테스트기질을 포함한 폴리펩티드를 접촉한 후에 발생한 하나 또는 그 이상의 절단생성물의 관찰 또는 절단생성물 양의 증가에 대한 관찰은 폴리펩티드의 단백질 분해활성을 나타낸다. 상기의 결정단계는 기질 및 절단생성물 비교와 관련된다. 상기 비교는 기질의 양 및/또는 절단 생성물의 하나 또는 그 이상의 양을 결정하는 것과 연관되고 또한 기질과 절단생성물의 비(ratio) 측정과 관련된다. 게다가, 상기 단백질 분해 활성을 결정하는 분석은 테스트 샘플과 기준샘플을 비교하는 단계를 포함하고, 여기에서 기준샘플은 전형적으로 (a) 단백질 가수분해 활성으로 알려진 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 (b) (a)의 폴리펩티드에 의해 절단되는 것으로 알려진 테스트기질을 포함한다. 일 측면에서, 상기 단백질 분해활성을 결정하기 위한 분석은 전기영동 또는 컬럼 크로마토그래피(column chromatography) 그리고, 선택적으로 방출분광분석(spectrometric analysis)에 의해 기질과 절단생성물을 분리하는 단계를 포함한다. 테스트기질의 감소 및/또는 생성물의 증가를 좀 더 쉽게 알아내기 위해서 하나 또는 그 이상의 라벨(label)을 가진 테스트기질을 표시하는 것은 편리하다. 본 명세서에서 사용된 용어 “라벨”은 검출마커로, 예를 들어, 방사성 라벨, 항체, 형광표지자를 의미한다. 테스트기질 및/또는 절단생성물의 양은 예를 들어, 적어도 두 개의 라벨간 이전되는 공명에너지에 기초한 방법을 포함하는 방사능사진촬영(autoradiography) 또는 분광분석(spectrometry)의 방법에 의해 결정될 수 있다. 대안적으로, 웨스턴 블랏(western blot) 또는 엘라이자(ELISA)와 같은 면역학적 방법으로 검출할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 단백질 분해 활성을 결정하기 위한 더 바람직한 분석은 상기 발명의 실시예에서 하기와 같이 설명된다. 본 발명의 더 바람직한 실시예에서는, 테스트기질과 비교할 때 단백질 가수분해적으로 20% 이상, 좀 더 바람직하게는 95% 이상 활성을 가지는 폴리펩티드는 100 mM의 Tris-HCl, pH 8.0 내지 PBS (50 mM의 Na2HPO4, 150 mM의 NaCl, pH 7.4)로부터 선택된 버퍼를 사용하여 37°C에서 120분간 두었을 때, 경쇄 및 중쇄와 같은 절단 생성물을 변환된다. 상기의 조건은 전체 길이의 신경독의 기질이 아닌 예를 들어, 전체 길이의 신경독 단편 또는 신경독 유도체에 적용된다. 이 같은 경우 절단생성물이 다르다는 것은 명백하다. 그러나, 당업자는 대응하는 절단생성물을 정량화할 수 있다. 다른 측면에서, 전형적으로, 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드의 100ng과 상기 기질과 관련된 몰비 1:100은 분석에서 사용된다. 또 다른 측면에서, 시간이 지남에 따른 촉매활성을 다루기 위해서 샘플은 간격을 두고 촬영될 수 있다. 상기 분석은 예를 들어 단백질 분해활성 폴리펩티드의 다양한 양을 사용하기 위하여 변형될 수 있다.

- [0012] [0012] SEQ ID NO: 2는 581개 아미노산 잔기의 길이를 가지는 클로스트리듐 보툴리눔 계통 ATCC 3502, 진뱅크 (GenBank) 접근 번호: "CAL82988.1"로부터 유래된 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드의 폴리펩티드 서열을 나타낸다. SEQ ID NO: 1는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 잔기 1 내지 248이 결실된 SEQ ID NO: 2의 단백질 가수분해 활성 유도체이다.
- [0013] [0013] 용어 "SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 폴리펩티드"는 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드를 의미한다. 게다가, 상기 용어는 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 폴리펩티드는 부가적인 아미노산을 가질 수 있는데, 예를 들어 SEQ ID NO: 1에서 보여지는 서열의 내부 또는 N- 또는 C-말단이나 또는 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50%의 동일한 아미노산 서열 내부 또는 N- 또는 C-말단에 가질 수 있고, 여기에서 메티오닌(methionine)은 폴리펩티드의 N-말단에 존재할 수 있다. 게다가, 상기 용어는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 결실된 폴리펩티드를 의미하는데, 예를 들어 SEQ ID NO: 1에서 보여지는 서열의 내부 또는 N- 또는 C-말단이나 또는 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50% 동일한 아미노산 서열의 내부 또는 N- 또는 C-말단에서 결실될 수 있다.
- [0014] [0014] 본 명세서에서 사용된 용어 "서열동일성"은 참조 아미노산 서열 및 질의 서열(query sequence) 사이의 동일성 결정을 의미하는데 여기에서 상기 서열은 최상위 일치를 얻을 수 있도록 나란히 정렬되고, 공지의 기술이나 또는 BLASTP, BLASTN, FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램에서 암호화된 방법으로 측정될 수 있다(Altschul 1990, J MoI Biol 215: 403 참조). 일 측면에서, 상기 퍼센트의 동일한 값은 전체 아미노산 서열에 걸쳐 측정된다. 다른 측면에서, 서열동일성은 50개까지의 아미노산 잔기, 100개까지의 아미노산 잔기, 250개, 300개, 350개, 400개, 450개, 500개, 또는 550개까지의 아미노산 잔기 길이에 걸쳐 측정될 수 있다. 다른 측면에서, 서열동일성은 적어도 50개 아미노산, 적어도 100개 아미노산, 적어도 150개 아미노산 또는 적어도 250개 아미노산 잔기에 걸쳐 측정될 수 있다. 좀 더 바람직한 실시예에서, 서열동일성은 SEQ ID NO: 1 또는 2, 즉, 각각 333개의 아미노산 또는 581개의 아미노산의 전체 길이에 걸쳐 결정될 수 있다. 다양한 알고리즘에 기초한 일련의 프로그램들도 당업자에게 있어 다른 서열과 비교하기 위해 이용 가능하다. 이러한 맥락에서, 특히 Needleman 및 Wunsch 또는 Smith 및 Waterman의 알고리즘은 신뢰성 있는 결과를 준다. 본 명세서에 기재된 서열을 정렬하고 서열동일성 값을 측정하기 위해서, 알고리즘 Clustal W에 기초하여 상업적으로 이용 가능한 프로그램 DNASTAR Lasergene MegAlign 버전 7.1.0이 하기와 같은 설정으로 전체 서열영역에 걸쳐 사용되었다: 달리 명시되지 않는 한, 항상 서열정렬을 위해 사용되는 표준 설정은 폐어정렬 매개변수: 갭 폐널티(Gap Penalty): 10.00, 갭 렌스 폐널티(Gap Length Penalty): 0.10, 단백질 가중치 행렬 Gonnet 250로 사용된다.
- [0015] [0015] 본 명세서에서 사용되는 용어 "적어도 50%의 서열동일성"은 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%를 의미한다.
- [0016] [0016] 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1에서 볼 수 있는 참조 폴리펩티드 서열과 같이 같은 수의 아미노산을 가질 수 있다. 또한, 본 발명은 부가적인 또는 결실된 아미노산 잔기를 가진 폴리펩티드를 포함한다. 일 측면에서, 본 발명의 상기 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1 또는 2의 서열을 가진 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드의 SEQ ID NO: 1 또는 2의 절단 돌연변이(truncation mutant)를 포함한다. SEQ ID NO: 2의 절단 돌연변이는 예를 들어 위치 249의 아미노산 N-말단에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 결실된다. 절단 돌연변이는 N- 또는 C-말단의 절단 돌연변이 및/또는 단백질 가수분해 활성의 내부절단 돌연변이일 수 있다. 일 측면에서, 상기 SEQ ID NO: 2의 절단 돌연변이는 SEQ ID NO: 2의 1 내지 248의 아미노산 위치가 결실된다. 다른 측면에서, SEQ ID NO: 2의 절단 돌연변이는 C-말단 절단 돌연변이이다. 일 측면에서, 상기 절단 돌연변이는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100, 150 또는 170의 연속된 아미노산 잔기가 결실될 수 있다. 다른 측면에서, 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드는 적어도 200개의 아미노산 잔기, 적어도 250개의 아미노산 잔기, 적어도 300개의 아미노산 잔기 또는 적어도 333개의 아미노산 잔기를 포함한다. 다른 측면에서, 본 발명의 상기 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드는 333개의 아미노산 잔기, 350개의 아미노산 잔기, 573개의 아미노산 잔기, 581개의 아미노산 잔기, 592개의 아미노산 잔기, 600개의 아미노산 잔기 또는 617개의 아미노산 잔기까지 포함한다.
- [0017] [0017] 다른 측면에서, 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1의 폴리펩티드 사슬의 N- 또는 C-말단 및/또는 그 내부위치 또는 SEQ ID NO: 1과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드 서열에서 부가적인 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 부가적인 아미노산 잔기는 5개까지, 10개까지 또는 심지어 200개, 300개 또는 400개까지의 연속적인 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 상기 부가적인 아미노산 잔기는 단백질 분해활성의 억제제로서 기능한다. 다른 측면에서, 상기 부가적인 아미노산 잔

기는 프로테아제에 의해 제거될 수 있다. 다른 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드의 단백질 분해활성을 억제하는 부가적인 잔기는 제외된다. 부가적인 아미노산 잔기는 하나 또는 그 이상의 프로테아제 절단부위에 의해 측면에 배치될 수 있다. 다른 측면에서, 상기 부가적인 아미노산 서열은 검출가능한 태그 및/또는 고체지지체에 결합을 허락하는 기능을 가진다.

[0018] 다른 측면에서, 상기 SEQ ID NO: 1의 폴리펩티드 사슬이나 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50%의 서열동 일성을 가지는 서열은 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 교환함으로써 변형할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 “교환(exchanging)”은 다른 아미노산으로 아미노산을 대체하는 것을 의미한다. 예를 들어, 폴리펩티드 서열 내에서 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 15개, 20개 또는 50개의 아미노산까지 대체될 수 있다. 상기 교환은 예를 들어, 본 발명에서 기질결합 또는 폴리펩티드 단백질 분해활성의 증가 또는 감소를 돋는 보존적 또는 비-보존적 아미노산 변화와 관련있다.

[0019] 일 측면에서, 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드는 기질을 두개 또는 그 이상의 천연 절단생성물로 가수분해할 수 있는 폴리펩티드를 포함한다. 다른 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드는 기질을 천연의 절단생성물과 다른 두개 또는 그 이상의 절단생성물로 가수분해한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “천연의 절단생성물” 또는 “천연 생성물”은 야생형 세포배양과 같은 기질로부터 발생하는 생성물, 상기 기질로부터 발생하는 생성물과 비교할 때 아미노산 잔기가 동일한 생성물을 의미한다. 일 측면에서, 상기 절단생성물은 보툴리눔 신경독 또는 테타누스 신경독의 이중사슬이거나, 다른 측면에서 이중사슬 신경독은 클로스트리듐 보툴리눔 혈청형 A, B, C1, D, E, F 또는 G에서 분리된 신경독이다. 또 다른 측면에서, 상기 이중사슬 신경독은 천연 이중사슬 신경독이다.

[0020] 표1은 TeNT와 BoNT/A-G 의 이중사슬 신경독, 전구체를 나타내고 본 발명의 폴리펩티드에 의해 절단된 아미노산 서열을 포함한 루프를 나타낸다.

표 1

독소	노출된 루프(exposed loop)	LC	H _N	H _{CN}	H _{CC}
BoNT/A1	SEQ ID NO: 4	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A2	SEQ ID NO: 5	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A3	SEQ ID NO: 6	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A3	SEQ ID NO: 7	M1-K434	A445-N868	I869-S1088	N1089-L1292
BoNT/A4	SEQ ID NO: 8	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A5	SEQ ID NO: 9	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/A6	SEQ ID NO: 5	M1-K438	A449-N872	I873-S1093	N1094-L1297
BoNT/A7	SEQ ID NO: 10	M1-K438	A449-N872	I873-S1092	N1093-L1296
BoNT/B1	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B2	SEQ ID NO: 12	M1-R441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B3	SEQ ID NO: 12	M1-R441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B4bv	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B5nP	SEQ ID NO: 13	M1-K441	V442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/B6	SEQ ID NO: 11	M1-K441	A442-I860	L861-S1079	Y1080-E1291
BoNT/C1	SEQ ID NO: 14	M1-R444	T450-I868	N869-L1092	Q1093-E1291
BoNT/CD	SEQ ID NO: 14	M1-R444	T450-I868	N869-Q1083	I1084-E1280
BoNT/D	SEQ ID NO: 15	M1-K442	D446-I864	N865-Q1079	I1080-E1276
BoNT/DC	SEQ ID NO: 16	M1-R442	D446-I864	N865-L1088	Q1089-E1285
BoNT/E1-E5	SEQ ID NO: 17	M1-K419	S424-I847	K848-P1067	N1068-K1252
BoNT/E6	SEQ ID NO: 18	M1-K419	S424-I847	K848-P1067	N1068-K1252
BoNT/F1	SEQ ID NO: 19	M1-R435	A440-I866	K867-P1085	D1086-N1278
BoNT/F2	SEQ ID NO: 20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1280
BoNT/F3	SEQ ID NO: 20	M1-R435	Q440-I866	K867-P1088	D1089-E1279
BoNT/F4	SEQ ID NO: 21	M1-R435	A440-I866	K867-P1085	D1086-E1277
BoNT/F5	SEQ ID NO: 22	M1-K434	P440-I863	K864-P1085	D1086-E1277
BoNT/F6	SEQ ID NO: 19	M1-R435	A440-I866	K867-P1088	D1089-E1275
BoNT/F7	SEQ ID NO: 23	M1-K427	N432-I857	I858-P1076	D1077-E1268
BoNT/G	SEQ ID NO: 24	M1-K442	S447-I865	S866-S1086	S1087-E1297
TeNT	SEQ ID NO: 25	M1-R449	T456-K883	S884-L1109	S1110-D1315

- [0022] [0021] 상기 용어의 정의 및 설명은 달리 명시하지 않는 한 본 명세서에 위 및 아래에 설명된 모든 측면들을 위한 필요한 범위 내의 변경에 적용된다.
- [0023] [0022] 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드는 다양한 출원에 적용된다. 상업적으로 관련있는 출원은 클로스트리듐 보툴리눔에서 분리된 것들과 같이 치료적인 신경독 생성에서의 사용에도 가능하다. 현재, 보툴리눔 신경독의 제조에서 상업적으로 이용가능한 제조를 위해 사용되는 클로스트리듐 보툴리눔 세포배양은 부분적인 손상, 즉, 이러한 약제학적 조성물의 특이적인 활성을 감소시킬 수 있는 부분적으로 미처리 및/또는 미처리 신경독의 상당한 양으로 오염시킨다. 예를 들어 클로스트리듐 보툴리눔의 세포용해 후 본 발명의 단백질 가수분해 활성 또는 활성화된 폴리펩티드의 사용은 미처리 및/또는 부분처리 신경독을 포함한 조성물로 치료될 수 있고, 이에 따라 이러한 오염물질은 완전히 처리된 신경독으로 변환된다. 결과적으로, 상업적인 생성물은 신경독의 증가된 특이활성에 제공될 수 있고, 박테리아 단백질의 전체 양은 감소될 수 있으며, 또한 항체형성에 의한 환자 위험은 감소된다.
- [0024] [0023] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산서열, 선택적으로 조절요소(regulatory elements)를 포함하는 핵산분자와 관련된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “조절요소(regulatory elements)”는 타타박스(tata box), 프로모터, 인핸서, 리보좀 결합 부위, Shine-Dalgarno-서열, IRES-영역, 폴리아데닐화 시그널(polyadenylation signal), 터미널 캡핑구조(terminal capping structure) 등의 요소를 포함하는 전사 및 번역의 유전자 발현의 조절요소를 의미한다. 상기 조절요소는 하나 또는 그 이상의 이종의(heterologous) 조절요소나 또는 하나 또는 그 이상의 상동(homologous) 조절요소를 포함한다. “상동 조절요소(homologous regulatory element)”는 야생형 조절요소로, 본 발명의 핵산분자에서 유래되고, 상기 야생형 세포의 핵산분자 또는 폴리펩티드의 유전자 발현의 조절과 관련된다. 또한 본 발명은 이종기원의 조절요소를 포함한 핵산분자를 포함한다. 용어 “이종의 조절요소(heterologous regulatory element)”는 상기 야생형 세포에서의 핵산분자 또는 폴리펩티드의 유전자발현 조절과 관련되지 않는 조절요소이다. 또한, 유도성 프로모터와 같은 유도성발현을 위한 조절요소도 포함된다. 핵산분자는 예를 들어, hnRNA, mRNA, RNA, DNA, PNA, LNA 및/또는 변형된 핵산분자일 수 있다. 핵산분자는 원형 또는 일자형이거나 지놈(genome) 또는 에피솜(episomal) 내로 통합될 수 있다. 또한 본 발명의 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 폴리펩티드를 포함한 융합단백질을 코딩하는 연쇄동일순서(concatemers)도 포함된다. 게다가, 핵산분자는 세포 내 구획으로의 전달 또는 세포막에 걸친 전달을 위한 신호와 같은 세포 내 전달 신호서열을 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0025] [0024] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산분자에 따른 핵산분자를 포함하는 벡터와 관련된다. 벡터는 본 발명의 폴리펩티드의 시험관내 및/또는 생체 내에 적합하다. 상기 벡터는 일시적 및/또는 안정한 유전자 발현을 위한 벡터일 수 있다. 일 구체예에서 상기 벡터는 조절요소 및/또는 선택마커를 더 포함한다. 일 구체예에서 상기 벡터는 바이러스 유래된 것이고, 다른 구체예에서는 파지유래이며, 또 다른 구체예에서는 박테리아에서 유래된 것이다.
- [0026] [0025] 다른 측면에서, 본 발명은 핵산분자 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 세포와 관련된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “세포”는 상기 핵산분자 또는 상기 벡터 및 발명의 폴리펩티드를 발현하기에 적합한 원핵 및/또는 진핵세포를 포함한다. 상기 세포는 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 동족체를 발현하는 숙주세포일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “동족체(homolog)”는 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 그러나, 또한 본 발명의 세포는 특히, 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 동족체를 발현하는 야생형 세포도 포함한다. 특정 측면에서, 본 발명의 세포는 클로스트리듐 보툴리눔, 클로스트리듐 부티리쿰(C. butyricum), 클로스트리듐 바라티(C. baratii) 및 클로스트리듐 테타니(C. tetani)에서 선택된다. 더 바람직하게는, 상기 세포는 혈청형 A, B 또는 F의 클로스트리듐 보툴리눔이다. 다른 측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 보툴리눔의 홀(the Hall) 계통 (ATCC 3502)이다. 다른 측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 보툴리눔에서 NCTC 4587 및 NCTC 7272로 알려진 클로스트리듐 보툴리눔의 계통 ATCC 19397을 생산하는 BoNT/A이다. 다른 측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 보툴리눔의 계통 NCTC 2916을 생성하는 BoNT/A이다. 다른 측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 보툴리눔의 계통 yoto-F 및 Mauritius / NCTC 9837를 생성하는 BoNT/A2이다. 다른 측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 보툴리눔의 계통 A254 Loch Maree / NCTC 2012를 생성하는 BoNT/A3이다. 다른 측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 보툴리눔의 계통 CDC657를 생성하는 BoNT/A4 및 B이다. 다른 측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 보툴리눔의 계통 H04402 065를 생성하는 BoNT/A5 및 B3'이다. 다른 측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 보툴리눔의 계통 Okra / NCTC 7273를 생성하는 BoNT/B1이다. 다른 측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 보툴리눔의 계통 CDC4013 / NCTC 12265를 생성하는 BoNT/B 및 F이다. 다른

측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 보툴리눔의 계통 Langeland / NCTC 10281를 생성하는 BoNT/F1이다. 다른 측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 스포로게네스(*Clostridium sporogenes*), 클로스트리듐 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 바실러스 세레우스(*B. cereus*), 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*), 바실러스 마이코이디스(*B. mycoidis*), 바실러스 씨모프로테오리티커스(*B. thermoproteolyticus*), 바실러스 안트라시스(*B. anthracis*), 바실러스 메가테리움(*B. megaterium*), 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*), 대장균(*E. coli*), 또는 효모이다. 일 측면에서, 본 발명의 상기 폴리펩티드는 세포 내에서 변형된다(즉, 당화되거나 인산화되거나 또는 프로테아제에 의해 처리됨). 또한 변형은 금속이온을 포함한 비-단백질성 공동-인자(co-factors)의 부가를 포함한다. 상기에서 설명된 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드, 어떤 중간 폴리펩티드의 생성물뿐만 아니라, 본 명세서에 개시된 마지막 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드를 포함하는 세포는 본 발명에 포함된다. 또한 본 발명에 포함된 세포는 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는 유도인자(inducer)를 포함한다. 이와 같은 발현 유도인자는 세포배양 또는 그들의 용해물에서 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드의 양 또는 활성을 증가시키는 효과를 가진 핵산분자 또는 폴리펩티드 또는 작은 화학물질을 포함하는 화학 물질일 수 있다. 상기 발현의 유도인자는 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산분자의 전사 또는 번역을 증가시킨다. 대안적으로, 발현의 유도인자는 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드 SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:2의 서열과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 폴리펩티드를 활성화할 수 있는 화합물일 수 있다. 일 측면에서, 상기 세포는 상기 폴리펩티드의 N-말단에서 억제하는 아미노산 잔기를 제거할 수 있는 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드인 유도인자를 포함한다. 상기 유도인자는 예를 들어, 당업자에 의해 알려진 재조합수단에 의해 발현될 수 있다. 대안적으로, 상기 유도인자는 예를 들어, 클로스트리듐 세포와 같은 세포에서 분리될 수 있다.

[0027]

[0026] 또한 본 발명은 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드의 제조를 위한 본 발명의 핵산의 사용과 관련된다.

[0028]

[0027] 관련된 측면에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함한 염기서열 폴리펩티드로부터 화학적으로 합성 또는 번역되는 단계; 및 (b) 단계 (a)의 폴리펩티드를 정제하는 단계와 같은 단계를 포함하는 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드의 제조방법과 관련된다.

[0029]

[0028] 용어 “화학적으로 합성”은 화학적인 수단에 의해 폴리펩티드를 합성하는 것을 의미한다. 이와 같은 방법은 예를 들어, Nilsson 등., *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2005. 34:91-118을 참조하였다. 용어 “폴리펩티드의 정제”는 상기 다른 폴리펩티드 이외에 본 발명 화합물의 폴리펩티드를 포함한 혼합물로부터 제거하는 것을 의미한다. 또한 상기 용어는 상기 다른 폴리펩티드 이외의 화합물을 포함하는 혼합물로부터 본 발명의 폴리펩티드를 제거하는 것을 의미한다. 특정 측면에서, 상기 용어는 그것의 단백질 가수분해 비활성 전구체로부터 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드를 분리하는 것을 의미한다.

[0030]

[0029] 핵산은 세포 또는 무세포 시스템(cell free system)에서 번역될 수 있다. 무세포 번역을 위한 다양한 시스템은 당업자에게 가능하다. 본 발명은 예를 들어, 토키 망상적혈구 용해질(reticulocyte lysate), 밀 배아 용해질, 대장균 용해질, 또는 예를 들어 클로스트리듐 보툴리눔 등에서 발생한 용해질과 같은 다른 세포 용해물을 포함하는 무세포 단백질 번역 시스템에서의 번역을 포함한다. 또한 본 발명의 염기서열 또는 본 발명의 벡터에서 본 발명의 폴리펩티드를 번역하는 것도 포함된다. 전사는 하나 또는 그 이상의 이종 조절요소 또는 유사한 조절요소에 의해 조절되거나 컨트롤될 수 있다. 또한, 본 발명은 야생형 세포, 즉, 클로스트리듐 보툴리눔, 클로스트리듐 부티리쿰(*C. butyricum*), 클로스트리듐 바라티(*C. baratii*) 및 클로스트리듐 테타니의 정제로 알려진 자연으로부터 분리된 세포에서의 번역도 포함한다. 핵산분자 또는 벡터를 세포내로 전달하고 세포 내 재조합 단백질로서의 본 발명의 폴리펩티드를 발현하기 위한 다양한 표준 수단 및 방법은 당업자가 이용 가능하다. 게다가, 당업자는 세포 또는 세포 용해질로부터 또는 무세포 발현 시스템으로부터 폴리펩티드를 분리하기 위한 많은 표준기술을 알고 있다. (예를 들어, *Recombinant DNA Principles and Methodologies*, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; *The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al, Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook 등., Cold Spring Harbor Laboratory, 2000 참조) 이런 수단 및 방법 중 하나는 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다.

[0031]

[0030] 첫째로 본 발명의 폴리펩티드는 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드를 코딩하는 핵산분자에서 번역된다. SEQ ID NO: 26은 핵산분자의 예이다. 대안적으로, 상기 핵산분자는 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드 전구체를 코딩하나, 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드로 변환될 수 있다. SEQ ID NO: 27은 핵산분자의 예이다. 상기 단백질 가수분해 비활성 전구체는 또한 “비활성 BoNTHydrolase”, 축약형으로 iBH를 나타낸다. 이 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드는 번역동안 또는 후 또는 접촉에 의해 활성화될 수 있는데, 예를 들어, 프로

테아제를 포함한 상기 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드는 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드의 N-말단에서 비활성 아미노산 잔기를 제거할 수 있다. 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드의 예는 SEQ ID NO: 2로 나타나는 폴리펩티드이다. 또 다른 예시는 SEQ ID NO: 2의 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 일 측면에서, 상기 용어 “N-말단에서의 비활성 아미노산 잔기”는 상기 폴리펩티드의 첫번째 244 아미노산 잔기와 관련된다. 다른 측면에서, 이 용어는 상기 폴리펩티드의 10개 아미노산, 50개 아미노산, 100개 아미노산, 150개 아미노산, 200개 아미노산, 250개 아미노산까지의 절편을 의미한다. 이런 폴리펩티드의 어떤 것은 단백질 가수분해의 활성 폴리펩티드의 제조를 위한 본 발명의 방법에서 유용하다. 일 측면에서, 이 폴리펩티드의 N-말단에서 비활성 아미노산 잔기를 제거할 수 있는 프로테아제는 예를 들어, 클로스트리듐 보툴리눔, 클로스트리듐 부티리쿰, 클로스트리듐 바라티, 및 클로스트리듐 테타니에서 분리된다. 다른 측면에서, 상기 비활성 아미노산을 제거할 수 있는 프로테아제는 상기 세포의 분획 또는 비-분획(non-fractionated) 용해질 제공에 의해 제공된다. 비활성 아미노산 잔기는 상기 용해질을 포함한 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드를 접촉하고, 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드가 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드로 변환될 때까지 배양함으로써 제거될 수 있다.

[0032]

[0031] 본 발명 방법의 다른 측면에서, 상기 폴리펩티드는 모든 세포에서 번역된다. 상기 세포는 원핵 또는 진핵 세포이다. 일 측면에서 상기 세포는 대장균, 바실러스 서브틸리스 또는 효모에서 선택된다. 또한 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드의 전사가 야생형 세포, 즉, 클로스트리듐 보툴리눔, 클로스트리듐 부티리쿰, 클로스트리듐 바라티, 및 클로스트리듐 테타니의 어느 하나의 정제로 알려진 자연으로부터 분리된 세포를 포함한다. 특정 측면에서, 상기 세포는 클로스트리듐 보툴리눔 홀 계통(Hall strain) (ATCC 3502)이다. 또 다른 특정 측면에서, 상기 세포는 상기에서 설명된 본 발명의 세포이다.

[0033]

[0032] 본 발명의 방법에 의해 얻어진 번역 생성물은 이 기술분야의 당업자에게 알려진 모든 다양한 수단에 의해 정제될 수 있다(예를 들어, Recombinant DNA Principles and Methodologies, J. Green, Marcel Dekker Inc., 1998; The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2006; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 2000 참조). 본 발명의 폴리펩티드를 정제하는 전형적인 방법은 세포 용해질의 회전, 단백질의 황산 암모늄의 침전, 단백질의 재현탁, 재현탁된 단백질의 원심분리, 이온교환 크로마토그래피, 사이즈 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 색충분석(hydrophobic interaction chromatography) 등과 관련된다. 상이한 순서, 여러 단계의 조합은 본 발명의 폴리펩티드를 정제하는데 유용하다. 본 발명의 폴리펩티드를 정제하는 바람직한 방법은 본 발명에 설명된 실시예에서 설명한다.

[0034]

[0033] 일 측면에서, 상기 정제단계는 본 발명의 폴리펩티드를 고체지지체에 결합하는 단계를 포함한다. 상기 용어 “고체지지체”는 예를 들어, 실리카, 가교 텍스트란, 가교 폴라크릴 아미드 또는 가교 아가로스 등을 포함한 혼합물을 의미한다. 또한, 폴리펩티드는 특히, 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 텍스트란, 나일론, 아밀라아제, 천연 및 변형된 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 반려암(gabbros) 및 마그네타이드를 포함한다. 본 발명의 측면에서, 고체지지체는 세파로오스(sepharose), 세파데스(sephadex), 아가로스(agarose), 세파셀(sephacel), 마이크로 셀룰로오스(micro-cellulose), 및 알지네이트비드(alginate-beads)로 구성된 군으로부터 선택된 폴리사카라이드(polysaccharide) 매트릭스이다. 다른 측면에서, 상기 고체지지체는 유리구슬 및/또는 폴리펩티드 매트릭스로 구성될 수 있다.

[0035]

[0034] 일 측면에서, 상기 고체지지체는 본 발명의 항체와 연결될 수 있다. 일 측면에서, 상기 “연결된”은 안정하게 연결되거나 안정하게 연합하는 것을 의미한다. 다른 측면에서, “연결된”은 간접적 또는 직접적, 비가역적 또는 가역적, 물리적 또는 화학적, 정전기의 및/또는 공유결합과 같은 상호작용을 포함한다. 일 측면에서, 상기 항체는 공유적으로 결합되거나 직접적 또는 연결 분자를 통해 고체지지체에 연결된다. 상기 항체는 작은 분자 화합물 및 펩티드(또는 폴리펩티드) 연결분자와 같은 링커(linker)를 통해 고체지지체에 결합한다. 사실상 상기 고체지지체는 결합된 항체가 그것의 항원에 결합할 수 있는 만큼 구조적인 구성이나 배치가 가능하다. 따라서, 상기 매트릭스 또는 고체지지체는 구슬, 또는 원통형, 테스트튜브의 내부 표면, 또는 로드(rod)의 외부표면과 같은 구형이다. 대안적으로, 상기 표면은 불규칙하거나 시트 또는 검사지와 같이 납작하다.

[0036]

[0035] 상기 고체지지체에 연결된 항체는 예를 들어, 본 발명의 방법을 제조하거나 또는 진단방법에서 사용될 수 있다. 일 측면에서, 상기 제조방법은 친화성크로마토그래피(affinity chromatography) 단계를 포함하는데, 여기에서 상기 친화성크로마토그래피는 고체지지체에 연결된 항체를 근거로 한다. 일 구체예에서, 상기 항체는 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드에 특이적으로 결합한 항체이다. 또 다른 구체예에서, 상기 항체는

본 발명의 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체이다.

- [0037] [0036] 다른 측면에서, 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드의 제조방법은 부가적인 구성을 포함하는 혼합물로부터 본 발명의 폴리펩티드를 정제하는 단계를 포함한다. 정제는 예를 들어, 극성, 전화 및 크기를 기초로 한다. 따라서, 일 측면에서 상기 방법은 보통의상 HPLC(normal-phase HPLC), 반전위상 HPLC(reversed-phase HPLC), 친수성 상호작용 색충분석(HILIC), 소수성 상호작용 색충분석(HIC), 음이온교환 색충분석 및 양이온교환 색충분석을 포함하는 이온교환 색충분석(IEC), 사이즈 배제 크로마토그래피(SEC), 젤-여과크로마토그래피(GPC)으로 구성된 군으로부터 선택된 분리단계를 하나 또는 그 이상 포함한다.
- [0038] [0037] 따라서, 일 측면에서 상기 방법은 보통의상 HPLC(normal-phase HPLC), 반전위상 HPLC(reversed-phase HPLC), 친수성 상호작용 색충분석(HILIC), 소수성 상호작용 색충분석(HIC), 음이온교환 색충분석 및 양이온교환 색충분석을 포함하는 이온교환 색충분석(IEC), 사이즈 배제 크로마토그래피(SEC), 젤-여과크로마토그래피(GPC)으로 구성된 군으로부터 선택된 분리단계를 하나 또는 그 이상 포함한다.
- [0039] [0038] 크로마토그래피 컬럼에서 수집된 하나 또는 그 이상의 절편은 예를 들어, 침전여과 또는 한외여과(ultrafiltration)에 의해 농축될 수 있다.
- [0040] [0039] 일 측면에서, 상기 본 발명은 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드를 포함하는 구성과 관련된다. 본 명세서에 개시된 방법을 이용하여, 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드가 상당히 없는 본 발명의 단백질 가수분해 활성의 폴리펩티드 제조가 가능하다. 다시 말하면, 본 발명의 방법은 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드와 본 발명의 폴리펩티드의 비활성 전구체 단백질로 실질적으로 오염되지 않은 조성물을 제공한다. 실질적 오염이 없거나 또는 전혀 없는 단백질 가수분해 비활성 전구체 폴리펩티드를 포함한 조성물은 만약, 웨스턴 블랏 기초 검출방법을 사용하면, 단백질 가수분해 비활성 전구체가 5% 미만으로 측정될 수 있고, 여기에서 상기 5%는 단백질 가수분해 활성 및 비활성 폴리펩티드의 전체양에 대하여 단백질 가수분해 비활성 전구체의 양을 의미한다. 다른 측면에서, 상기 조성물은 대체적으로 순수하고, 적어도 본 발명의 50%의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드를 포함하는데, 여기에서 상기 50%는 조성물에 포함된 단백질의 총량에 대하여 단백질 가수분해 활성 전구체의 양을 의미한다. 다른 측면에서, 상기 대체적으로 순수한 조성물은 적어도, 75%, 80%, 90% 또는 적어도 98%의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드를 포함한다.
- [0041] [0040] 다른 측면에서, 본 발명은 또한 상기 및 실시예에서 설명하고 있는 바와 같이 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드의 제조를 위한 방법에서 얻을 수 있는 폴리펩티드와 관련된다. 일 측면에서, 상기 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1의 폴리펩티드 서열을 가지는 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드이다. 다른 측면에서, 상기 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드이다. 또 다른 측면에서, 상기 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50% 서열동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함한 폴리펩티드이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “얻을 수 있는 폴리펩티드”는 일 측면에서, 본 발명의 핵산으로부터 번역되는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 폴리펩티드는 아실레이션(acylation), 알킬레이션(alkylation), 아미노산 부가, 아미노산 결실, 글리코실레이션(glycosylation), S-글루타티오닐레이션(S-glutathionylation), 인산화, 설피테이션(sulphatation), 단백질 분해 과정 등과 같은 전사 후 수정과정을 연속적으로 수행한다. 게다가, 상기 폴리펩티드는 Li⁺, Na⁺, K⁺, Ag⁺, Cs⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ or Zn²⁺과 같은 금속이온과 결합한다. 바람직하게는, 상기 금속이온으로 Zn²⁺, Mn²⁺ 또는 Co²⁺이다.
- [0042] [0041] 일 측면에서 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드와 특이적으로 결합하는 항체와 관련된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “항체”는 단일클론의 항체, 다클론성 항체, 단일사슬 항체, 인간, 인간화, 영장류 또는 키메라 항체, 이중특이성 항체, 합성항체, 화학적 또는 효소적으로 변형된 유도체, 자연적으로 발생 및/또는 화학적으로 변형된 핵산으로 구성된 항체 또는 앱타머(aptamer) 어느 하나의 절편을 포함한다. 상기 항체절편은 F(ab')₂, F(ab), Fv 또는 scFv 절편 또는 이러한 절편 중 하나가 화학적 또는 효소적으로 변형된 유도체를 포함한다.
- [0043] [0042] 일 측면에서, 본 발명의 상기 항체는 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드 또는 그것의 단백질 가수분해 비활성 전구체에 특이적으로 결합한다. 일 측면에서, 상기 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드에 특이적인 항체는 본 명세서에서 설명된 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드와 교차 반응한다. 다른 측면에서, 상기 항체는 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드와 그것의 비활성 전구체 사이를 결정할 수 있다. 다른 측면에서, 상기 항체를 위한 에피토프(epitope)는 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드가 아닌 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드에 존재하는 아미노산 영역에 특이적으로 위치한다. 예를 들어, 상기 에피토프는 SEQ ID

NO: 2의 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 아미노산 잔기 1 내지 248의 폴리펩티드로 구성된 폴리펩티드 영역의 에피토프일 수 있다.

[0044] 다른 측면에서, 상기 에피토프는 SEQ ID NO: 2의 서열과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 폴리펩티드의 N-말단 아미노산 249에 위치한 아미노산 잔기에 의해 형성될 수 있다. 다른 측면에서, 상기 에피토프는 본 명세서에서 설명된 단백질 분해과정에 의해 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드로부터 제거된다.

[0045] 다른 측면에서, 본 발명의 항체를 위한 에피토프는 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드를 포함한 폴리펩티드 N-말단에 위치한 에피토프에 특이적이다. 본 발명의 일 측면에서 사용된 용어 “N-말단”은 상기 폴리펩티드 서열의 N-말단 50개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열의 N-말단 25개의 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩티드의 영역을 의미한다. 특정 측면에서, 상기 용어는 N-말단 14개의 아미노산 잔기를 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 용어 “에피토프”는 본 발명의 항체에 의해 인식되는 항원결정기(antigenic determinant)와 관련된다. 일 측면에서, 상기 에피토프는 직선의 에피토프이고, 다른 측면에서 상기 에피토프는 구조적인 에피토프이다. 특정 측면에서, 상기 항원결정기는 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드의 N-말단의 아미노산 서열을 가지는 웨티드로 구성되는데, 여기에서 상기 웨티드는 7 내지 14개의 아미노산 길이를 가지고, 바람직하게는 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개의 아미노산 잔기를 가진다.

[0046] 일 측면에서 용어 “특이적으로 결합” 또는 “특이적으로 ~에 결합하는”은 본 발명의 항체가 본 발명 또는 다른 일반적인 폴리펩티드의 다른 에피토프를 포함하는 상당히 넓은부위에 결합하지 않는다는 것을 의미한다. 에피토프 특이성은 본 발명 항체의 중요한 특징이다. 일 측면에서, 단백질 가수분해 활성 대 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드와 관련한 항체특이성은 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%일 수 있다. 특이적인 결합은 예를 들면, 경쟁연구와 같은 잘 알려진 다양한기술에 의해 측정될 수 있다. 또 다른 중요한 특징은 항체의 고감도성(sensitivity)이다. 일 측면에서, 본 발명의 고감도성은 샘플에 의해 포함된 에피토프가 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%가 결합될 수 있음을 나타낸다. 고감도성은 잘 알려진 기술에 의해 테스트될 수 있다. 이 기술분야의 당업자는 통상적인 실험으로 각각의 결정을 하기위해 이용 준비를 할 수 있고 최적인 분석조건을 결정할 수 있다. 결합연구를 위한 종래기술은 방사면역분석 (radioimmunoassay), 엘라이자(ELISA), 평형투석(equilibrium dialysis), 등온선 미세열량측정(isothermal microcalorimetry), BIACORE® 분석(표면 플라스몬 판단, SPR), 또는 다른 계면흡착방법을 포함한다. 상기 BIACORE® SPR 시스템은 항원-항체 상호작용을 측정한다. SPR 반응은 결합 또는 해리 등의 분석으로서 검출기 표면에서의 질량 농도 변화를 반영한다. SPR에 근거하여, 실시간 측정 BIACORE® 측정은 직접적으로 그들이 일으키는 상호작용을 관찰한다. (BIAapplications Handbook, version AB (1998 종쇄), BIACORE® code No: BR-1001-86; BIATechnology Handbook, version AB (1998 종쇄), BIACORE® code No: BR-1001-84 참조) 원칙적으로, 본 발명의 항체 고감도성과 같은 결합속성은 센서표면에서 나타나는 고정화항원(리간드 [ligand])를 사용한 결합연구에 의해 결정될 수 있다. 테스트(분석)된 항체는 이동상, 즉 용액상에 제공될 것이다. 몇몇 경우에, 상기 항원은 포획분자라 불리는 다른 고정화분자에 결합함으로써 세표표면에 직접적으로 부착된다. 항체가 고정화 항원으로 표면을 통과하여 이산펄스(discrete pulse)에 주입되면, 필수적으로 세 단계로 세분화될 수 있다: (i) 샘플주입시 항원과 항체의 결합; (ii) 샘플주입동안 즉, 항원-항체 복합체의 해리로 항체결합의 비 균형이 맞춰진 평형 또는 정상상태; (iii) 버퍼가 흐르는 동안 표면에서의 항체해리. 대안적으로, 이와 같은 분석은 조사된 고정화항체와 이동상 용액에 포함되는 항체로 수행될 수 있다. 결합 및 해리단계는 분석-리간드 상호작용에 대한 역학에 대한 정보를 제공한다 (ka 및 kd , 복합체 형성 및 해리의 비, $kd/ka=KD$). 상기 평형단계는 분석-리간드 상호작용에 대한 친밀도에 대한 정보를 제공한다(KD). 본 발명의 측면에서, 본 발명의 항체는 $0.5 \mu M$ 미만의 KD 를 가지고, 다른 측면에서는 $0.05 \mu M$ 미만, 다른 측면에서 $0.02 \mu M$ 미만이다.

[0047] 본 발명에 나타난 항체는 예를 들어, Harlow and Lane, 1988 (Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988 참조)에서 설명된 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 단일클론 항체는 종래 Kohler & Milstein, 1975 (Kohler & Milstein 1975, Nature 256: 495 참조) 및 Galfre & Milstein, 1981 (Galfre & Milstein 1981, Meth Enzymol 73: 3 참조)에서 설명하고 있는 기술로 제조될 수 있다. 상기 기술은 마우스 골수종 세포를 접종한 포유류로부터 파생된 비장세포와 융합한 것을 포함한다. 또한 항체는 해당 기술분야에서 잘 알려진 기술에 의해 향상될 수 있다. 예를 들어, BIACORE® 시스템에서 적용된 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance)은 이미 언급한 본 발명 폴리펩티드 내의 에피토프에 결합할 수 있는 과지항체의 효율성을 증가시키는데 사용될 수 있다. (Schier 등., 1996, Human Antibodies Hybridomas

7: 97; Malmborg 등., 1995, J. Immunol Methods 183: 7 참조).

[0048]

[0047] 본 발명의 일 측면에서, 상기 항체는 이미 언급한 에피토프를 포함 또는 구성하는 웨პ티드를 사용하여 생성될 수 있다. 상기 웨პ티드는 예를 들어, 합성 또는 재조합 발현에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 항체는 본 발명의 단백질 가수분해 활성 또는 비활성 폴리웨პ티드를 발생시키는 자연에 적용함으로써 생성될 수 있다. 후자의 경우에, 항체 생성은 또한 본 발명의 폴리웨პ티드와 관련된 특이성을 위한 테스트도 수행될 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 단일클론 항체는 에피토프 면역활적으로 사용 가능할 수 있도록 세제(detergent)에 의해 처리될 수 있는 본 발명의 폴리웨პ티드를 이용하여 생성될 수 있다. 그러나, 이러한 경우 항체는 형태적인 에피토프에 직접적으로 대항하고, 같은 세제처리는 수행될 수 없다는 점도 이해될 것이다. 또 다른 측면에서, keyhole limpet hemocyanin (KLH)과 같은 면역-자극 제제 또한 이 같은 과정, 특히 합성 웨პ티드를 사용할 때 적용될 수 있다.

[0049]

[0048] 예를 들어, 본 발명의 항체는 시료 또는 재조합 유기체에서 상기 폴리웨პ티드의 존재를 관찰하는 것뿐만 아니라, 친화성크로마토그래피, 면역침강, 및 본 발명 폴리웨პ티드의 면역조직화(immunolocalization)에서도 사용될 수 있다. 게다가, 본 발명의 항체는 검출방법이나 또는 진단방법에서 사용될 수 있다. 특정 측면에서, 본 발명의 항체는 웨스턴 블랏 또는 엘라이자에서 사용된다. 게다가, 본 발명의 항체는 치료적인 출원에서 사용될 수 있다. 특히, 항체는 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리웨პ티드의 활성을 저해하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 또한 하기에서 설명되는 바와 같이 다양한 치료적인 출원을 가진다.

[0050]

[0049] 일 측면에서, 본 발명은 하기의 접촉단계를 포함한 단백질 가수분해 처리된 폴리웨პ티드 제조를 위한 방법과 관련된다: (a) 첫째 폴리웨პ티드, 상기 첫째 폴리웨პ티드는 본 발명의 폴리웨პ티드인 것을 특징으로 함, (b) 둘째 폴리웨პ티드, 상기 둘째 폴리웨პ티드는 상기 첫째 폴리웨პ티드에 의한 단백질 분해에 취약한 것을 특징으로 하고, 여기에서 상기 접촉단계는 상기 둘째 폴리웨პ티드가 적어도 두 개의 절단생성물로 단백질 분해처리되는 것이다.

[0051]

[0050] 본 발명은 또한 라이조박터 엔지모제네(Lysobacter enzymogenes)에서 Lys-N 및/또는 Lys-C 및/또는 아르기닐 엔도웨პ티다아제(엔도웨პ티다아제Arg-C, LeR)의 사용과 관련된다(Wright DS, Graham LD, Jennings PA. Biochim Biophys Acta. 1998 Dec 22;1443(3):369-74 참조). 게다가, 또한 BoNT/A와 같은 CNT를 단백질 가수분해 처리하기 위한 방법에서 (Arg/Lys)-(Arg/Lys) 모디프(motif)를 절단하는 세린(serine) 프로테아제와 막-결합하는 플라스민(plasmin) 및/또는 옴프틴(omptin)(OmpT)의 사용을 포함한다. 일 측면에서, 본 발명은 하기의 접촉단계를 포함하는 단백질 가수분해 처리 폴리웨პ티드의 제조를 위한 방법과 관련된다: (a) 첫째 폴리웨პ티드, Lys-C 또는 Lys-N을 특징으로 하는 상기 첫째 폴리웨პ티드, (b) 둘째 폴리웨პ티드, 첫째 폴리웨პ티드에 의해 단백질 가수분해에 취약한 것을 특징으로 하는 상기 둘째 폴리웨პ티드, 여기에서 상기 접촉 단계는 상기 둘째 폴리웨პ티드가 적어도 두 개의 절단생성물로 단백질 가수분해 처리되고, 상기 둘째 폴리웨პ티드는 단일사슬의 BoNT/A이다. 상기 용어 “Lys-C”은 라이조박터 엔지모제네(리실 엔도웨პ티다아제, LeK, GenBank acc. Q7M135)에서 웨პ티드 결합 C-말단을 적어도 60% 서열동일성을 가지는 리신 또는 그의 동족체로 특이적 절단하는 33kDa 세린 엔도프로테아제 Lys-C를 의미한다. 상기 용어 “Lys-N”은 그리풀라 프론도사(Grifola frondosa) 및 프레우로투스 오스트레아투스(Pleurotus ostreatus)에서 분리된 메탈로엔토웨პ티다아제(metalloendopeptidase) Lys-N을 의미한다(Nonaka T 등., 1997, J Biol Chem. 272:30032-30039; Nonaka T 등., 1998, J Biochem. 1998 124:157-162; Hori T et al., 2001, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 57:361-368 참조). 또한, 상기 용어는 적어도 60%의 서열동일성을 가지는 상기 프로테아제의 동족체를 포함한다.

[0052]

[0051] 예를 들어, 이 방법은 단백질 가수분해 처리된 신경독 (CNT) 또는 보툴리눔 신경독 (BoNT)을 제조하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명에서 전반적으로 사용되는 상기 용어 “BoNT”는 보툴리눔 신경독을 의미하고, 혈청형 A, B, C1, D, E, F 또는 G의 BoNT와 같은 클로스트리듐 보툴리눔에서 얻을 수 있는 신경독을 의미한다. 또한, 상기 용어 “CNT” 및 “BoNT”는 화학적 변형 또는 유전적 변형을 포함한 하나 또는 그 이상의 변형을 포함하는 재조합 및 변형된 신경독을 포함한다. 상기 용어 “유전적 변형”은 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 결실, 치환 또는 부가를 의미한다. 본 발명의 방법을 사용하여, 오염물질은 효율적으로 이중사슬 신경독으로 처리될 수 있기 때문에, 이제는 미처리 또는 부분적으로 처리된 신경독에 의한 상당히 적은 오염을 가진 신경독 조성물을 얻는 것이 가능하다. 일 측면에서, 상기 이중-사슬 신경독은 천연 이중-사슬 신경독이고, 여기에서는 경쇄의 C-말단 및 중쇄의 N-말단을 야생형 클로스트리디아(clostridia)에서 분리하여 완전히 처리된 이중-사슬 신경독과 대응된다.

[0053]

[0052] 본 명세서에서 사용된 용어 “접촉(contacting)”은 물리적으로 근접한 곳에서 상기 화합물의 물리적 및

/또는 화학적인 상호작용이 일어나도록 적어도 두개의 상이한 화합물이 접근하는 것을 의미한다. 본 발명의 방법에 따라, 상기 두개의 상이한 화합물은 일 측면에서, 상기 용액에 포함된 첫째 및 둘째 폴리펩티드이다. 접촉은 첫째 및 둘째 폴리펩티드의 상호작용이 일어나기에 충분한 조건 및 시간 하에서 발생한다. 본 명세서에서 사용된 용어 “단백질 가수 분해 처리된 폴리펩티드”는 일 측면에서, 하나 또는 그 이상의 웨პ티드 결합에서 가수 분해 또는 절단되는 폴리펩티드 사슬을 의미한다. 다른 측면에서, 상기 용어는 엔도프로테아제 또는 엔도펩티다아제에 의해 단백질 가수분해 절단된 폴리펩티드를 의미한다. 다른 측면에서, 상기 용어는 적어도 50% 정도 절단된 폴리펩티드를 의미한다. 또 다른 측면에서, 상기 단백질 가수분해 처리된 폴리펩티드는 둘째 폴리펩티드는 의미한다. 또 다른 측면에서 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 단백질 가수분해 처리된 것을 의미한다.

[0054] 본 명세서에서 사용된 용어 “첫째 폴리펩티드”는 본 발명의 폴리펩티드를 의미하는데, 즉, 상기 단백질 가수분해 활성 또는 활성화된 폴리펩티드, 또는 지정된 “활성 BoNTHydrolase”를 의미한다. 활성 BoNTHydrolase는 클로스트리듐 보톨리눔에서 얻을 수 있기 때문에, 이것은 처음에 천연의 BoNTHydrolase로 지정되었고, 축약형은 “nBH”이다. 그러나 상기 용어 “첫째 폴리펩티드” 및 “nBH”는 또한 다른 원천으로부터 얻을 수 있는 BoNTHydrolases를 나타낸다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “둘째 폴리펩티드”는 상기 첫째 폴리펩티드의 기질을 의미한다. 상기 용어 “단백질 분해되기에 취약한”은 둘째 폴리펩티드의 특징 또는 요구를 나타내는데, 둘째 폴리펩티드가 상기 첫째 폴리펩티드에 의해 단백질 가수분해 절단될 수 있는 의미로 본 명세서에서 사용된다. 다시 말해서, 상기 용어 “단백질 분해되기 취약한”은 상기 첫째 폴리펩티드의 기질로서의 기능하기 위해 허락하는 프로테아제 인식 및 절단 부위를 포함하는 둘째 폴리펩티드를 의미한다. 상기 “둘째 폴리펩티드”는 첫째 폴리펩티드의 기질이고 두개 또는 그 이상의 절단 생성물로 단백질 가수분해 처리될 수 있다. 상기에서 설명하고 있는 분석을 이용하여, 당업자는 주어진 폴리펩티드가 첫째 폴리펩티드의 기질이고, 또한 본 발명 정의에 따른 “둘째 폴리펩티드”인지 테스트 할 수 있다. 예를 들어 상기 용어 “적어도 두 개의 절단생성물”은 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 및 여섯 개 이상의 절단생성물을 포함한다.

[0055] 예를 들어, 이 방법은 클로스트리듐 신경독을 포함하는 약제학적 조성물의 제조나 또는 질량분석 방법에서 사용되는 폴리펩티드 절편을 생성에서 사용될 수 있다. 상기의 첫째 폴리펩티드 및 둘째 폴리펩티드는 단백질 가수분해 처리된 폴리펩티드의 제조과정에서의 다양한 단계에서 접촉될 수 있다. 일 측면에서, 상기 첫째 폴리펩티드 및 둘째 폴리펩티드의 접촉단계는 세포 내에 있다. 실시예의 특정 측면에서, 상기 첫째 및 둘째 폴리펩티드는 상기 세포내에서 발현된다.

[0056] 다른 측면에서, 상기 접촉단계는 세포 용해질 또는 정제된 세포 용해질 내에서 일어난다. 이러한 측면은 첫째 폴리펩티드를 상기 용해질 또는 정제된 용해질에 부가하는 것도 포함한다. 상기 첫째 폴리펩티드는 세포 용해질에서 둘째 폴리펩티드를 정제하는 동안 다양한 단계에서 부가될 수 있다. 예를 들어, 첫째 폴리펩티드는 하기와 같은 단계 이전 또는 후에 부가될 수 있다: 단백질 침전, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및/또는 사이즈 배제 크로마토그래피. 게다가, 첫째 폴리펩티드를 약제학적 조성물에 부가하는 것도 포함된다. 이 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드는 예를 들어, 둘째 폴리펩티드의 단백질 가수분해 절단을 위해, 예를 들어, 약제학적 조성물에서 치료학적 조성물에 포함된 치료적 에이전트인 둘째 폴리펩티드를 활성화하기 위해 사용된다. 또한, 피시험체에서 둘째 폴리펩티드의 단백질 가수분해 처리를 위하여 첫째 폴리펩티드를 피시험체에 투여하는 것도 구상중에 있다. 또한 투여에는 첫째 및 둘째 폴리펩티드의 공동-투여(co-administration)도 포함된다. 또한, 이 방법은 둘째 폴리펩티드를 절단하기에 충분한 조건 및 시간에서의 배양 단계도 포함한다. 일 측면에서, 상기 조건은 100mM Tris-HCl, pH 8.0 또는 PBS (50 mM Na2HPO4, 150mM NaCl, pH 7.4)로 구성된 균으로부터 선택된 버퍼의 부가도 포함할 수 있다. 바람직한 버퍼 조건은 100mM Tris-HCl, pH 8.0이다. 상기 “절단하기에 충분한 시간”은 상기에서 설명된 분석을 이용하여 결정할 수 있다. 일 측면에서, 상기 “절단하기에 충분한 시간”은 단백질 가수분해 처리된 폴리펩티드 또는 그것을 반드시 포함하는 조성물의 절단정도에 의존한다. 일 측면에서, 상기 방법은 적어도 30분, 60분, 120분 또는 적어도 240분동안 첫째 및 둘째 폴리펩티드를 배양하는 단계를 포함한다. 또 다른 측면에서, 상기 첫째 및 둘째 폴리펩티드는 30분, 60분, 120분, 240분 또는 600분 이상까지 배양한다. 또 다른 측면에서, 상기 방법은 4° C 또는 37° C에서 상기 첫째 및 둘째 폴리펩티드를 배양하는 단계를 포함한다. 또 다른 측면에서, 상기 방법은 1시간 이상, 2시간, 4시간, 6시간, 10시간, 또는 16시간 이상까지 배양하는 단계를 포함한다.

[0057] 일 측면에서, 상기 둘째 폴리펩티드의 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NOs: 4 내지 25의 어느 하나로부터 선택된 서열을 포함한다. 좀 더 특정한 측면에서, 상기 둘째 폴리펩티드의 폴리펩티드 사슬은 SEQ ID NOs: 4 내지 25의 어느 하나로부터 선택된 서열을 포함하고 여기에서 상기 둘째 폴리펩티드는 C-말단이 상기 SEQ ID NOs: 4 내지 25의 서열 내 기본 아미노산 잔기로 절단된다. 상기 서열은 본 발명의 단백질 가수 분해 활성 폴리펩티드

의 기질로 알려진 아미노산 서열을 나타낸다. 여기에서 볼 수 있는 바와 같이, 상기 기질은 C-말단(표 1, 컬럼 LC 및 HN 참조)이 상기 서열에 포함되는 기본 아미노산 잔기로 절단된다. 좀 더 바람직하게, 상기 둘째 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 4 내지 10에서 선택된 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 측면에서, 상기 둘째 폴리펩티드는 예를 들어, SEQ ID NO: 3의 폴리펩티드 또는 그의 유도체를 포함하는 BoNT/A이거나 그것의 유도체이다. 본 발명의 지금 및 다른 측면과 관련되어 사용되는 용어 “유도체(derivative)는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 부가, 치환, 결실 및 절단과 같은 아미노산 돌연변이를 포함한다.

[0058] 일 측면에서, 상기 둘째 폴리펩티드는 SEQ ID NOs: 4 내지 25, 또는 SEQ ID NO: 3의 어느 하나의 유도체를 포함하는데, 여기에서 상기 유도체는 하나 또는 그 이상의 점 돌연변이 및/또는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기 부가를 포함한다. 또 다른 측면에서, 상기 유도체는 하나 이상, 두 개 이상, 세 개 이상, 네 개 이상, 다섯 개 이상, 여섯 개 이상, 일곱개 이상, 여덟개 이상, 아홉개 이상, 열개 이상, 열 다섯개 이상의 점 돌연변이를 포함한다. 상기에서 설명한 바와 같이, 프로테아제 활성을 결정하는 활성 분석법을 사용하여, 당업자는 주어진 유도체가 본 발명의 단백질 가수 분해 활성 폴리펩티드에 의해 처리되었는지 확인할 수 있다. 또 다른 측면에서, 상기 유도체는 염기성 아미노산 잔기가 비-염기성 아미노산 잔기로 변환되는 점 돌연변이를 포함한다. 또 다른 측면에서, 상기 유도체는 SEQ ID NOs: 4 내지 25의 어느 하나를 포함한 적어도 50% 서열동일성을 가진다. 또 다른 측면에서, 상기 유도체 또는 폴리펩티드는 첫째 폴리펩티드의 기질이고 첫째 폴리펩티드에 의해 단백질 가수분해 절단된 유도체를 포함한다. 전형적인 예시로는 예를 들어, 경쇄 또는 중쇄에서 하나 또는 그 이상의 점 돌연변이를 포함하는 SEQ ID NO: 3의 유도체이다.

[0059] 또 다른 측면에서, 상기 둘째 폴리펩티드는 (a) SEQ ID NO: 3 [(BoNT/A of ATCC 3502, Genbank acc. AAA23262)]의 서열과 적어도 30% 서열동일성을 가지는 폴리펩티드 서열; 또는 (b) 테타누스 신경독, 응고 캐스케이드 관여인자 X(coagulation cascade Factor X) 또는 프로트롬빈(Prothrombin)(Factor II)의 단백질, 트립신, 키모트립신, 펩신, 파파인과 같은 체장의 소화효소로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드 서열을 포함한다. 적어도 30%는 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 85%를 의미한다. 특정 측면에서, 상기 SEQ ID NO: 3의 서열과 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 둘째 폴리펩티드의 서열동일성은 SEQ ID NO: 3의 아미노산 위치 420 내지 466에 근거하여 결정되고, 다른 측면에서 상기 서열동일성은 SEQ ID NO: 4 내지 25의 어느 하나에 근거하여 결정된다. 다시 말하면, 상기 측면은 예를 들어 SEQ ID NO: 3의 아미노산 위치 420 내지 466 사이에서 발견되는 폴리펩티드 서열과의 적어도 30% 서열동일성을 가지거나 SEQ ID NOs: 4 내지 25의 어느 하나의 폴리펩티드 서열과 적어도 30%의 서열동일성을 포함하는 둘째 폴리펩티드를 나타낸다. 이 정의에 따른 폴리펩티드는 예를 들어, 클로스트리듐 보툴리눔, 클로스트리듐 테타니 또는 클로스트리듐 스포르게네스에서 얻을 수 있다. 상기 둘째 폴리펩티드는 예를 들어 BoNT/A, B, C1, D, E, F 또는 G, 또는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 부가, 치환, 결실 또는 절단과 같은 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하는 그들의 유도체와 같은 신경독을 자연적으로 발생시킨다. 경쇄의 부가 또는 BoNT의 경쇄 N-말단에 융합된 단백질성 화물 분자를 포함한 유도체뿐만 아니라 다른 예, 결실 파생물, 예를 들어 천연 신경독 HC 도메인 또는 그의 부분 또는 신경독 HC 도메인이 치환되는 다른 아미노산 잔기를 가진 유도체도 포함된다.

[0060] 또 다른 측면에서, 상기 둘째 폴리펩티드는 N-또는 C-말단에서, 또는 내부 위치에서 부가되는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 상기 부가되는 아미노산 잔기는 하나 또는 그 이상의 프로테아제 절단부위에 의해 측면에 배치될 수 있다. 또 다른 측면에서, 상기 부가되는 아미노산 서열기능은 검출 태그 및/또는 고체지지체에 결합하는 기능일 수 있다. 예시로는 그의 히스티딘 태그 또는 GST 태그이다. 또 다른 예시는 Streptag를 포함하는 아미노산 서열 VPPTPGSAWHPQFEK이고, 바람직하게는 C-말단에 부가된다.

[0061] 특정 측면에서, 상기 둘째 폴리펩티드는 적어도 50%의 서열동일성을 가지는 GenBank no: CBZ04958.1, YP_002805603.1, ZP_02994746.1, YP_001788403.1, YP_001782718.1, ZP_02616437.1, ZP_02614241.1, YP_001392361.1, YP_001255575.1에서 보여지는 폴리펩티드 서열 또는 그들의 동족체를 포함하는 폴리펩티드이다.

[0062] 다른 측면에서, 상기 둘째 폴리펩티드의 생물학적 활성은 단백질 분해 절단에 의해 조절된다. 많은 단백질의 기능이 단백질 분해과정에 의해 조절된다는 것은 당업자에게 잘 알려져 있다. 본 명세서에서 사용되는 “조절되는(modulated)”은 증가 또는 감소, 활성 또는 비활성을 의미한다. 예를 들어, 상기 많은 클로스트리듐 신경독의 생물학적 활성은 단일사슬 신경독이 이중-사슬 신경독으로 단백질 가수분해 처리됨으로써 증가되거나 기폭되는데, 여기에서 상기 이중-사슬 신경독은 이황화결합을 통해 공유적으로 연결된 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드 사슬로 구성되어 있다. 상기 신경독의 생물학적 활성은 적어도 세가지 활성을 포함한다: 첫번째 활성은 신경독의 경쇄에 의해 야기되고, 세포 막 융합의 조절과 관련된 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드의 펩티드 결합을 가

수분해하는데 책임이 있는 “단백질 가수분해 활성”이다. 두번째 활성은 처리된 신경독의 중쇄 N-말단에서 야기되고, 리소좀 막을 통하여 세포질로 경쇄를 전달하는 것과 관련된 “전위활성”이다. 세번째 활성은 처리된 신경독의 중쇄 C-말단 끝에서 야기되고, 목표한 세포로 신경독의 결합 및 흡수와 관련되는 “수용체 결합활성”이다. 바람직한 측면에서, 본 명세서에서 사용되는 상기 용어 생물학적 활성은 단백질 분해활성을 의미한다. 좀 더 바람직한 측면에서, 상기 용어는 단백질 분해활성의 증가를 의미한다.

[0063] [0062] 클로스트리듐 신경독의 생물학적 활성은 해당기술분야의 당업자에게 잘 알려진 다양한 테스트를 통해 측정될 수 있다. 상기 테스트는 상기에서 언급된 바와 같이 하나 또는 그 이상의 활성을 측정할 수 있도록 한다. 예를 들어, 1994년 Pearce((Pearce LB, Borodic GE, First ER, MacCallum RD (1994), Toxicol Appl Pharmacol 128: 69-77 참조)등, 1980년 Habermann 등(Habermann E, Dreyer F, Bigalke H.(1980), Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 311:33-40 참조)에 의해 설명된 마우스 LD50 분석 또는 횡경막 신경 반격막(phrenic nerve hemidiaphragm) 분석은 살아있는 유기체 또는 분리된 신경근육 제조에서 주어진 신경독 제조의 독성효과를 결정할 수 있도록 한다. LD50 분석에서 독성효과를 설정하기 위하여, 상기 신경독은 상기에서 언급한 세 개의 활성 각각이 생물학적으로 활성되어야 한다. 게다가, 다양한 다른 분석들, 예를 들어 신경독 또는 신경독의 경쇄가 단백질 가수분해 활성인지를 결정하는 것도 가능하다. 이와 같은 분석들은 예를 들어 SNAP-25를 포함한 접촉 BoNT/A에 근거한다. 대안적으로, SNAP-25의 절단부위를 나타내는 웨პ티드가 사용될 수 있고, 여기에서 상기 웨პ티드는 검색을 용이하게 할 수 있도록 표시될 수 있다. 바람직한 측면에서, 생물학적 활성은 상기에서 설명된 바와 같이 MPN 분석을 사용하여 결정된다.

[0064] [0063] 또 다른 측면에서, 상기 첫째 폴리펩티드는 비활성 전구체 폴리펩티드, SEQ ID NO: 2의 서열과 적어도 60%의 서열동일성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 비활성 전구체 폴리펩티드를 단백질 가수분해 처리함으로써 활성화된다. 이러한 측면들은 SEQ ID NO: 2의 폴리펩티드 서열을 가지는 폴리펩티드가 단백질 가수분해 비활성인 반면, 그들의 N-말단 절단은 단백질 가수분해 활성 양상은 관찰에 달려 있다. 또한 상기에서 설명된 방법에서 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드의 사용도 본 발명에 의해 예상될 수 있다. 본 명세서에서 설명된 단백질 가수분해 비활성 폴리펩티드는 예를 들어 SEQ ID NO: 2의 아미노산 잔기 1 내지 248을 포함하는 N-말단의 절편 또는 전체 N-말단을 제거함으로써 활성화 될 수 있다. 일 측면에서, N-말단은 프로테아제에 의해 제거되고, 또 다른 측면에서, N-말단은 SEQ ID NO: 2의 자가분해를 통해 제거된다. 60%의 서열동일성은 전체 길이 NT02CB1447을 가지는 서열정렬을 의미한다.

[0065] [0064] 또 다른 측면에서, 단백질 가수분해 처리된 폴리펩티드의 제조를 위한 본 발명의 방법은 단백질 가수분해 처리된 둘째 폴리펩티드의 정제단계 또는 그의 절단생성물로 적어도 하나 또는 두개 또는 그 이상을 포함한다. 클로스트리듐 보툴리눔의 발현된 BoNT/A 정제는 예를 들어 종래기술에서 필수적으로 설명된 바와 같이 행해진다(DasGupta 1984, Toxicon 22, 415; Sathyamoorthy 1985, J Biol Chemistry 260, 10461 참조). 특히, 신경독의 정제는 하나 또는 그 이상의 침전 및 추출단계, 하나 또는 그 이상의 농축단계, 및 별개의 크로마토그래피 단계가 더 포함될 수 있다. 재조합 단일사슬 BoNT/A 및 그의 정제는 종래기술에서 설명된다(Rummel 등., 2004, Mol Microbiol. 51:631-43 참조).

[0066] [0065] 바람직한 실시예에서, 클로스트리듐 균주는 예를 들어 BoNT/A나 그의 유도체를 생성하는 클로스트리듐 보툴리눔이다. 발효를 위해서는 DasGupta B. R. 등. in Toxicon, vol. 22, No.3, 414-424 페이지, 1984에서 설명되는 과정이 이용될 수 있다. 따라서 0.5% 효모 추출물과 0.6%의 멸균된 효모 페이스트는 N-Z-아민 형 A 배지의 2%가 부가되고, pH 7.2는 4N의 수산화나트륨으로 조절되며, 이와 같은 방식으로 제조된 배지는 후에 멸균된다. 이 배지에 분리되고 멸균처리된 글루코스(부피당 20 중량%)가 부가되고, 배지에 글루코스의 최종농도가 0.5%가 된다. 배양은 교반(stirring)없이 37°C에 일어나고, 여기에서 상기 발효는 예를 들어 96시간 후에 중단된다. 또한, 반회분식(semi-batch) 발효 전에 묘사된 회분식(batch) 발효가 반복 회분식 발효 또는 연속발효가 되는 것도 본 발명의 범위 내이다.

[0067] [0066] 실제로 발효가 일어나고 세포에서 발효배지를 분리한 후에 발표 배지는 큰 단백질의 제거를 목표로 첫째 침전을 수행한다. 상기 침전은 바람직하게는 산(acid) 침전이다. 이와 같은 산 침전을 위한 반응조건은 당업자에게 알려져 있다. 전형적으로 1.5 M H₂SO₄는 상층액을 pH 3.5로 산성화하기 위하여 사용된다. 원심분리는 보통 4°C에 2400 x g으로 20분간 한다. 상기 원심분리를 통한 펠렛(pellet)은 물로 세수되고, 반복되는 것이 바람직하다. 그 후, 상기 펠렛은 pH가 5.5인 0.1M 시트르산-시트르산나트륨 버퍼에서 추출될 수 있다. 그 후, 원심분리 단계가 예를 들어 4°C, 9800 x g에서 20분간 더 수행될 수 있다. 상기에서 얻어진 펠렛은 선택적으로 전에 설명한 바와 같이 다시 추출될 수 있다. 추출된 상층액과 반복된 추출의 상층액 모두는 이후 프로타민 황산염 침전을 실시할 수 있다. 상기 침전은 예를 들어, 8°C에서 밤새 지속될 수 있다. 그 후, 상기 침전은 예를 들어,

4°C에 12,000 x g에서 20분간 원심분리된다. 원심분리의 상층액(supernatant)은 다른 더 큰 단백질이 제거되도록 암모늄 살레이트 침전과 같은 침전을 수행할 수 있다. 상기 암모늄 살레이트 침전 단계 후에 또 다른 원심분리 단계가 더 수행되고 이 후 얻어진 펠렛은 임의적으로 용해되고, 투석을 받을 수 있다. 바람직하게는 상기 추출물은 다시 투석 및 원심분리되고 신경독의 정제를 위한 목표로 연속적인 크로마토그래피 단계에 적용될 수 있다. 보툴리눔 신경독 단백질 복합체의 혈구응집소(hemagglutinin)뿐 아니라, 프로타민 살레이트, 잔류 DNA, 작은 단백질 및 중간 크기의 단백질 부분과 같은 오염물질을 제거하기 위해 크로마토그래피 단계 각각이 제공된다. 이러한 목적을 위해, 하나 또는 그 이상의 크로마토그래피 단계가 더 바람직한 실시예에서 수행된다. 선택적으로, 마지막 크로마토그래피 단계의 용출액은 세균을 감소시키기 위해 여과될 수 있다. 선택적으로 상기 용출액은 여과 전에 희석될 수 있고, 적합한 보조제(adjuvants)를 첨가할 수 있다. 보조제의 첨가 후에 또 다른 멸균여과단계가 더 수행될 수 있다. 일 측면에서, 상기 여과는 동결건조단계 대상이 될 수 있는 반응 컨테이너에서 수행된다.

[0068]

[0067] 또한 본 발명은 단백질 가수 분해적으로 처리된 폴리펩티드의 제조를 위한 본 발명의 방법에 의해 얻을 수 있는 조성물과 관련된다. 일 측면에서, 상기 조성물은 처리 및 미처리된 둘째 폴리펩티드의 혼합물을 포함하는데, 여기에서 상기 혼합물은 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 미만의 미처리된 둘째 폴리펩티드를 포함한다. 상기 조성물의 일 측면에서, 상기 둘째 폴리펩티드는 BoNT이거나 그의 유도체이다. 상기 BoNT는 예를 들어 그의 유도체를 포함하는 혈청형 A, B, C, D, E, F 및 G의 BoNT로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 조성물은 예를 들어 지방 또는 고체 조성물이고, 하나 또는 그 이상의 보조제 및/또는 부형제를 포함할 수 있다.

[0069]

[0068] 다른 측면에서, 본 발명은 또한 약제, 즉, 이미 언급된 방법의 단계를 포함하고 약제로서 정제된 이중-사슬 신경독을 조직화하는 단계를 더 포함하는 약제학적 조성물의 제조방법과 관련된다. 일 측면에서, 상기 약제는 처기 및 미처리된 둘째 폴리펩티드의 혼합물을 포함하는데, 상기 혼합물은 5% 미만의 미처리된 둘째 폴리펩티드를 포함한다. 바람직한 실시예에서, 상기 혼합물은 4%, 3%, 2% 미만 또는 1% 미만의 미처리된 둘째 폴리펩티드를 포함한다.

[0070]

[0069] 또한 본 발명은 본 명세서에 개시된 화합물의 다양한 의료적 사용과 관련된다. 일 측면에서, 본 발명은 약제 또는 약제학적 조성물로의 사용을 위한 본 발명에 따라 단백질 가수 분해적으로 활성화된 폴리펩티드와 관련된다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 약제 또는 약제학적 조성물로의 사용을 위한 본 발명에 따른 조성물과 관련된다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 약제 또는 약제학적 조성물로의 사용을 위한 본 발명에 따른 항체와 관련된다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 약제 또는 약제학적 조성물로의 사용을 위한 본 발명에 따른 억제제와 관련된다. 특히, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 항체, 본 발명의 조성물 또는 본 발명의 억제제가 포함된 약제학적 조성물과 관련된다.

[0071]

[0070] 본 명세서에서 사용된 용어 “조성물”은 고체, 액체, 에어로졸(또는 기체) 형태 등으로 형성된 어떤 조성물을 의미한다. 상기 조성물은 선택적으로 희석제 또는 담체와 또는 추가성분과 같은 적절한 보조 화합물이 결합된 본 발명의 치료학적으로 활성화된 화합물을 포함한다. 일 측면에서, 상기 치료학적으로 활성화된 화합물은 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드이다. 또 다른 측면에서, 상기 치료학적인 화합물은 상기에서 설명된 이중-사슬 신경독과 같은 단백질 가수 분해적으로 처리된 둘째 폴리펩티드이다. 또 다른 측면에서, 상기 치료학적으로 활성인 화합물은 본 발명의 항체이다. 또 다른 측면에서, 상기 치료학적으로 활성인 화합물은 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드의 억제제이다.

[0072]

[0071] 이와 관련하여, 본 발명은 보조 화합물, 즉 본 발명의 화합물에 의해 유도된 효과에 기여할 수 없는 화합물인 소정의 목적을 위해 조성물에 적용되는 화합물과 추가성분, 즉, 본 발명의 화합물의 효과에 또 다른 효과를 미치거나 조절하는데 공헌하는 화합물과 구별된다. 적절한 보조제 및/또는 운반자(carriers)는 조성물이 사용되고 다른 성분이 되기 위한 목적에 의존한다. 해당 기술분야의 당업자는 이와 같은 적절한 보조제 및/또는 운반자를 자체 없이 결정할 수 있다.

[0073]

[0072] 상기 운반자는 상기 제제의 다른 성분과 호환되고 그들의 수신자(recipient)에 유해하지 않는 의미에서 수용되어야 한다. 적용되는 약제학적 운반자는 고체, 젤, 또는 액체를 포함한다. 고체 운반자의 예시로는 락토오스, 백토, 수크로스, 탈크, 젤라틴, 한천, 펩틴, 아카시아, 스테아린산마그네슘, 스테아린산 등이다. 액체 운반자의 예시로는 염분, 시럽, 오일, 물, 애밀전, 다양한 유형의 습윤제 등이 완충된 인산염이다. 유사하게, 상기 운반자 또는 보조제는 글리세릴 모노-스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트 단독이거나 또는 왁스와 함께 사용되는 것과 같이 해당기술분야에서 잘 알려진 시간 지연 물질을 포함한다. 상기 적절한 운반자는 상기에서 언급된 것들과 해당 기술분야에서 잘 알려진 다른 물질을 포함한다(예를 들어, Remington's

Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 참조).

- [0074] [0073] 상기 보조제(들)은 상기 조합의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 선택된다. 이와 같은 보조제의 예시로는 중류수, 생리 식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액 및 행크 용액(Hank's solution)이 있고, 또한, 약제학적 조성물 또는 제제 또한 다른 운반자, 보조자, 또는 비-독성, 비-치료적, 비-면역학적 안정화제 등을 포함한다.
- [0075] [0074] 일 측면에서, 본 명세서에서 사용되는 약제학적 조성물은 본 발명의 방법에 의해 얻어진 생물학적으로 활성인 신경독과 선택적으로 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 수용 가능한 운반자를 포함한다. 상기 신경독은 액체 또는 동결건조 형태로 존재할 수 있다. 일 측면에서, 상기 화합물에는 글리세롤, 단백질 안정화제(예를 들어, 인간 세럼 알부민(HSA)) 또는 폴리비닐파롤리돈(polyvinylpyrrolidone) 또는 히알루론산(hyaluronic acid)과 같은 비-단백질이 존재할 수 있다. 일 측면에서, 상기 약제학적 조성물은 국소적으로 투여된다. 종래에 사용되는 약제투여는 근육 내, 피하(분비선 근처)에 투여된다. 그러나, 다른 루트에 의해서도 약제학적 조성물의 화합물 활성 격 및 유형에 의존하여 투여될 수 있다. 상기 이중-사슬 신경독 폴리페티드는 조성물의 활성 성분이고, 일 측면에서 기존의 절차에 따른 표준 약제학적 운반자를 가진 약제와 결합함으로써 제조된 기준용량 형태로 투여된다. 이러한 절차들은 적절하게 원하는 제조를 하기위한 성분을 혼합, 과립, 또는 용해하는 것과 관련된다. 약제학적으로 수용가능한 운반자 또는 보조제의 형태 및 특징은 결합할 수 있는 성분으로 투여경로, 및 기타 잘 알려진 변수를 가진 활성성분의 양에 의해 검출될 수 있다.
- [0076] [0075] 치료학적으로 효과적인 용량은 명세서에 나타난 질병 또는 증상과 동반하는 증상을 방지, 개선 또는 치료할 수 있는 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용되는 상기 화합물, 상기 신경독의 양을 의미한다. 상기 화합물의 치료학적 효능 및 독성은 세포배양 또는 ED50(인구 50%에서 치료학적으로 효과적인 용량) 및 LD50(인구의 50%에 대한 치사량)와 같은 동물 실험의 표준 약제학적 절차에 의해서 결정될 수 있다. 상기 치료학적이고 독성 효과 사이의 용량 비율은 치료학적 지수이고 이것은, LD50/ED50의 비율로서 표현될 수 있다.
- [0077] [0076] 상기 투여계획은 담당 의사와 다른 임상적 요인에 의해 결정될 수 있다. 의학계에서 알려진 바와 같이, 어떤 한 환자를 위한 용량은 환자의 체격, 신체의 표면 영역, 나이, 투여되는 특정 화합물, 성별, 투여시간 및 루트, 일반적인 건강 및 현재 다른 약물이 투여되는지 여부를 포함한 많은 요소들에 의존한다. 진행은 주기적인 평가에 의해 관찰될 수 있다. 본 명세서에서 설명된 상기 약제학적 조성물과 제형은 본 명세서에 기재된 질병 또는 상태를 치료 또는 개선 또는 방지하기 위해서 적어도 한 번 투여된다. 그러나, 상기 약제학적 조성물은 한번 이상 투여될 수 있다.
- [0078] [0077] 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 이미 언급된 조성물은 약제 또는 화장품 조성물이다. 일 측면에서 상기의 생물학적으로 활성인 신경독을 포함하는 약제는 적어도 다음과 같은 질병 및 장애 중 하나를 예방 및/또는 치료하기 위해 사용될 수 있다: 자발적인 근육의 힘, 초점 근긴장, 자궁경부 포함, 두개골 근육 긴장 이상, 및 양성필수 안검경련, 반점 경련, 및 국소적 경련, 위장 장애, 다한증, 및 화장품의 주름보정, 또 다른 양태의 안검경련, 입하악 근육긴장이상, 턱 개방유형, 턱 폐쇄형, 이같이, 마이그 신드롬, 혀의 근육긴장 이상, 눈꺼풀 운동불능, 개방 경부 이상근긴장증, 전굴, 목후굴, 측경, 사경, 인두근육 긴장이상, 후두근육 긴장이상, 연축성 발성장애/내전근 유형, 연축성 발성장애/외전 유형, 경련호흡곤란, 사지근육긴장이상, 팔근육긴장이상, 작업특정근육긴장이상, 터의경련, 음악가의 경련, 골퍼의 경련, 다리근육 긴장이상, 허벅지내전, 허벅지 무릎굴곡, 무릎화장, 발목굴곡, 발목화장, 내번침족, 기형발 근육긴장이상, 선조체발가락, 발가락굴곡, 발가락 화장, 축근육 긴장이상, 피사신드롬, 벨리댄서 근육긴장이상, 분절근육긴장이상, 반신성, 전반적인 긴장이상, 근육긴장이상, 피질기저 퇴행 피질변성, 근육긴장이상, 지연성 근육긴장이상, 척수소뇌실조증에서의 근육긴장이상, 파킨슨병에서의 근육긴장이상, 현팅텅 무도병에서의 근육긴장이상, 할러포르텐-스파츠병에서의 근육기장이상, dopa유도운동장애/ dopa 에 의한 근육긴장이상, 지연성 운동장애/지연성 근육긴장이상, 발작 운동장애/근긴장, 키네시오제닐 비-키네시오제닉 작용에 의한 활동-유도성 구개음 간대성 근경련, 근과동증 섬유성 근간대경련, 경직, 양성 근육경련, 유전 턱의 멀립, 기이 턱 근육 활동, 턱 근육의 경련 및 무의식적 수축(hemimasticatory spasm), 비후성 아가미 근육병증, 비대증, 전 경골근 비대, 안구진탕, 핵상응시마비, 간질, 부분간질, 경성사경, 성대목청마비, 난저장성 변질 증상, 상부식도 팔약근 기능장애, 성대육아증, 망가질 드 라 뚜렷 증후군, 중이 대성근 경련, 보호 후두 폐쇄, 후두절제술 후의, 언어장애, 보호성 안검하수증, 멀립 팔약근 오디 장애, 거짓이완 불능증, 노나찰시아(nonachalsia), 식도운동장애, 질경, 수술 후 고정화 멀립, 방광 기능장애, 배뇨근 팔약근 긴장이상, 방광 팔약근의 경련, 반점 경련, 재신경지배 운동장애, 모이주머니 피트의 화장품 사용(cosmetic use craw's feet), 얼굴 비대칭 찌푸림, 융기보조개, 스티프 펠슨 신드롬, 테타누스 전립선 비대증, 비만증, 유아 뇌성 마비 사시 치료, 혼합 마비 수반, 망막 박리 수술 후, 백내장 수술 후, 무수 정체 외안근 사시에서, 근병

성 사시증, 해리된 수직 편위, 사실 수술에 대한 보조, 내사시, 외사시, 식도이완 불능증, 항문균열, 외분비샘 항진, 프레이 신드롬, 악어눈물 증후군, 다한증, 겨드랑이 발바닥 손바닥 비루, 뇌졸중에 상대적인 타액분비항진, 파킨슨 병에서, 근 위축성 측삭 경련 조건 경화증, 뇌염과 척수염 자가면역 과정에서, 다발성 경화증, 횡단 척수염, 배포장치 증후군, 바이러스 감염, 세균감염, 기생충감염, 진균감염, 유전경련 증풍발작 후 대부분 마비 반검 경색, 뇌간경색, 심근경색, 편두통, 중추신경계 외상, 반구 병변, 뇌간 병변, 심근병변, 중추 신경계 출혈에서, 뇌출혈, 지주막하 출혈, 경막하 출혈, 척수내 출혈, 신생물, 반구종양, 뇌간종양, 심근종양, 코골이 (WO 2000/033863).

[0079] 자세한 내용 및 증상은 Jost 2007, Drugs 67(5), 669 or Dressler 2000 in Botulinum Toxin Therapy, Thieme Verlag, Stuttgart, New York를 참조할 수 있다.

[0080] [0078] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 조성물은 상기 약제학적 조성물에서 설명된 바와 같이 제조된 화장품 조성물이다. 마찬가지로, 화장품 조성물을 위해, 일 측면에서 본 발명의 화합물이 실질적으로 순수한 형태라는 것은 예상된다. 또 다른 측면에서, 화장품 조성물은 근육 내로 적용된다. 본 발명의 또 다른 측면에서 심지어 신경독을 포함하는 화장품 조성물은 주름-예방 용액으로 제조될 수 있다.

[0081] [0079] 또 다른 측면에서, 상기 약제학적 조성물은 본 발명의 항체 또는 억제제를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드는 클로스트리듐 신경독의 활성화에 책임이 있기 때문에 상기 항체는 클로스트리디아 감염시 관찰되는 독성 효과를 감소시키기 위해 유용하다. 따라서, 본 발명의 항체는 일 측면에서 클로스트리듐 페르프린젠스, 클로스트리듐 디피실리균(*Clostridium difficile*), 클로스트리듐 테타니, 클로스트리듐 보툴리눔, 클로스트리듐 바라티, 클로스트리듐 부티리쿰, 클로스트리듐 스포로게네스(*Clostridium sporogenes*), 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리듐 해몰리티쿰(*Clostridium haemolyticum*), 클로스트리듐 노비균(*Clostridium novyi*) 및 클로스트리듐 오에데마티엔스(*Clostridium oedematiens*)를 포함하는 클로스트리디아에 의한 감염을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 게다가, 본 발명의 항체는 다른 측면에서 상기 감염과 연관된 증상의 치료를 위해 사용될 수 있다. 게다가, 상기 항체는 보툴리눔 식중독(Botulism), 과상풍, 가막성대장염(Pseudomembranous colitis), 괴저, 식중독 등에서 선택된 상태와 결합된 증상 또는 상태를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0082] [0080] 또 다른 측면에서, 상기 약제학적 조성물은 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드를 포함한다. 일 측면에서 상기 단백질 가수분해 절단된 폴리펩티드를 위해 사용될 수 있는 약제학적 조성물은 특히 하이포공동 응집(hypocoagulation)을 가진 환자를 치료하기 위한 공동응집(coagulation)과 관련된다. 또 다른 측면에서, 상기 약제학적 조성물은 특히 심근경색, 폐색전증, 김픈 정맥 혈전 색전증을 가진 환자를 치료하기 위해, 즉 혈전을 제거하기 위해, 피브린용해(fibrinolyticum)를 위해 사용될 수 있다. 또한, 뇌졸중의 치료에서도 상기 약제학적 조성물이 사용되는 것을 예상할 수 있다. 게다가, 다른 측면에서, 상기 약제학적 조성물은 트립신, 키모트립신, 펩신 중 하나를 대체하기 위한 외부 체장 부전을 치료하는 데에서도 사용될 수 있다. 게다가, 다른 측면에서, 상기 약제학적 조성물은 염증반응에 의해 영향받는 환자의 치료 특히, 표면노출된 종양항원을 단백질 가수분해 절단하기 위한 암 환자 치료에서도 사용될 수 있다. 게다가, 또 다른 측면에서, 상기 약제학적 조성물은 유두종(papilloma)의 치료에서 사용될 수 있다.

[0083] [0081] 본 발명은 또한 (a) 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드를 기질과 함께 및 사실상 억제제(putative inhibitor)와 함께 접촉하는 단계; 및 (b) 기질이 절단 생성물로의 변환에서 사실상 억제제의 효과를 결정하는 단계, 여기에서 절단 생성물의 양 감소는 사실상 억제제의 상기 억제하는 효과를 나타내는 단계를 포함하는 억제제를 위한 스크리닝(screening) 방법과 관련된다. 일 측면에서, 상기 사실상 억제제는 SEQ ID N0s: 4 내지 25의 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 웨프티드이고, 여기에서 상기 아미노산 서열의 적어도 하나의 염기성 아미노산은 비-염기성 아미노산으로 대체된다. 또 다른 측면에서, 상기 웨프티드는 하나 또는 그 이상의 화학적인 변형을 포함한다. 또 다른 측면에서, 상기 억제제는 상기 웨프티드의 웨프티드동족체(peptidomimetic)이다. 또 다른 측면에서, 상기 사실상 억제제는 화학적 화학물 마이크로어레이(microarray), 즉, 유기화학의 화합물의 접합의 부분이다. 또 다른 측면에서, 상기 억제제는 본 발명의 항체이다. 이 방법은 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드를 억제할 수 있는 화합물을 확인하는데 유용하다. 첫 스크리닝은 예를 들어 SEQ ID N0s: 4 내지 25의 어느 하나에서 선택된 아미노산 서열을 포함한 웨프티드를 근거하여 이뤄진다. 본 발명의 폴리펩티드를 저해할 수 있는 웨프티드는 억제를 증가하기 위하여 변형될 수 있다. 변형은 아미노산 치환 또는 화학적 변형을 포함한다. 전형적으로, 이 방법은 본 발명의 폴리펩티드를 사실상 억제제의 존재 및 부재 하에 알려진 기질과 접촉시키거나((a) 단계의 방법), 기질을 절단생성물로 변환하는데 있어 사실상 억제제의 효과를 비교함으로써 수행된다. 사실상 억제제 존재하에 변환비의 감소는 억제제의 효과를 나타낸

다.

[0084] [0082] 본 발명은 또한 본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드의 억제제와 관련되는데, 여기에서 상기 억제제는 (a) SEQ ID NOs: 4 내지 25 서열의 어느 하나에서 보여지는 아미노산 서열을 포함한 억제제로, 그 속에 비-염기성 아미노산으로 대체된 염기성 아미노산이 포함된 억제제; 또는 (b) 본 발명의 항체인 억제제와 관련된다.

[0085] [0083] 본 명세서에서 인용된 모든 참조는 그들의 전체 개시내용과 본 명세서에서 구체적으로 언급된 개시내용에 대하여 참조로 인용된다.

[0086] 서열은 하기와 같다:

[0087] SEQ ID NO: 1: 클로스트리듐 보툴리눔 계통 ATCC 3502, 진뱅크 접근번호 No: "CAL82988.1", 결실 248 N-말단 아미노산 잔기에서 유래된 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드.

[0088] SEQ ID NO: 2: 클로스트리듐 보툴리눔 계통 ATCC 3502, 진뱅크 접근번호 No: "CAL82988.1"에서 유래된 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드.

[0089] SEQ ID NO: 3: BoNT/A of ATCC 3502, Genbank acc. "AAA23262"

[0090] SEQ ID NO: 4: Loop of BoNT/A1

[0091] SEQ ID NO: 5: Loop of BoNT/A2/A6

[0092] SEQ ID NO: 6: Loop of BoNT/A3

[0093] SEQ ID NO: 7: Loop of BoNT/A3

[0094] SEQ ID NO: 8: Loop of BoNT/A4

[0095] SEQ ID NO: 9: Loop of BoNT/A5

[0096] SEQ ID NO: 10: Loop of BoNT/A7

[0097] SEQ ID NO: 11: Loop of BoNT/B1/B4bv/B6

[0098] SEQ ID NO: 12: Loop of BoNT/B2/B3

[0099] SEQ ID NO: 13: Loop of BoNT/B5np

[0100] SEQ ID NO: 14: Loop of BoNT/C/CD

[0101] SEQ ID NO: 15: Loop of BoNT/D

[0102] SEQ ID NO: 16: Loop of BoNT/DC

[0103] SEQ ID NO: 17: Loop of BoNT/E1-E5

[0104] SEQ ID NO: 18: Loop of BoNT/E6

[0105] SEQ ID NO: 19: Loop of BoNT/F1/F6

[0106] SEQ ID NO: 20: Loop of BoNT/F2/F3

[0107] SEQ ID NO: 21: Loop of BoNT/F4

[0108] SEQ ID NO: 22: Loop of BoNT/F5

[0109] SEQ ID NO: 23: Loop of BoNT/F7

[0110] SEQ ID NO: 24: Loop of BoNT/G

[0111] SEQ ID NO: 25: Loop of TeNT

[0112] SEQ ID NO: 26 SEQ ID NO: 1을 코딩하는 핵산서열.

[0113]

SEQ ID NO: 27: SEQ ID NO: 2을 코딩하는 핵산서열.

[0114]

하기와 같은 실시예와 그 무엇이든지 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

발명의 효과

[0115]

본 발명의 단백질 가수분해 활성 폴리펩티드는 다양한 적용에서 사용된다. 상업적으로 관련 있는 적용은 클로스트리듐 보툴리눔에서 분리된 것들과 같이 치료적인 신경독 생성에서의 사용에도 가능하다. 클로스트리듐 보툴리눔의 세포용해 후 본 발명의 단백질 가수분해 활성 또는 활성화된 폴리펩티드의 사용은 미처리 및/또는 부분처리 신경독을 포함한 조성물로 치료될 수 있고, 이에 따라 이러한 오염물질은 완전히 처리된 신경독으로 변환된다. 결과적으로, 상업적인 생성물은 신경독의 증가된 특이활성에 제공될 수 있고, 박테리아 단백질의 전체 양은 감소될 수 있으며, 또한 항체형성에 의한 환자위험은 감소된다.

도면의 간단한 설명

[0116]

도면 1: HiPrep 16/10 Q FF에서 수집된 절편의 활성 테스트. HiPrep 16/10 Q FF에서 수집된 $5\mu\text{l}$ 의 절편으로 37°C에서 1시간 동안 $2\mu\text{g}$ scBoNTA(1ane 2)을 배양하고 이후 10%의 SDS-PAGE를 하여 효소활성을 분석하였다. Lane 1: 저분자량 마커(LMW): 116kDa, 66kDa, 45kDa, 35kDa.

도면 2: 12.5% SDS-PAGE에 의해 1~37.3kDa 분자량을 가진 nBH 내용과 관련하여 SEC (HiLoad 16/60 Superdex 75)에서 수집된 절편의 분석. 절편 9 내지 11은 다양한 nBH를 포함한다. (Lane 1: LMW: 116kDa, 66kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa, 18.4kDa, 14.4kDa)

도면 3: nBH의 세개의 회분식 정제의 순도 및 단백질 농도의 결정을 위한 12.5% SDS-PAGE 분석. Lane 1, LMW (116kDa, 66kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa, 18.4kDa, 14.4kDa); Lane 2, nBH Lot TE311206 (192ng/ μl 의 성숙한 NT02CB1446/CB01444, 진뱅크 접근번호. CAL82987.1의 아미노산 254-594, 분자량: 38.6kDa); Lane 3, nBH Lot TIK301009 (130ng/ μl 의 성숙한 NT02CB1447/CB01445, SEQ ID NO: 1, 진뱅크 접근번호. CAL82987.1의 아미노산 249-581, 분자량: 37.3kDa); Lane 4, nBH Lot TIK280509 (114 ng/ μl 의 성숙한 NT02CB1447/CB01445, SEQ ID NO: 1, 진뱅크 접근번호. CAL82988.1의 아미노산 249-581, 분자량: 37.3kDa).

도면 4: ESI-MS/MS 스펙트럼 분석 보고. nBH lot TE311206의 38.6kDa 단백질 벤드(band)는 마스코트 점수(Mascot score) 725를 가진 NT02CB1446/CB01444와 전체 오픈리딩프레임(ORF)에 걸친 29.6%의 웹티드 MS/MS 서열범위로 확인된다. N-말단 253개 아미노산에서 유도된 웹티드(회색박스, 확인된 MS 웹티드; 빨간색 사각형, MS/MS 봉괴 후 확인된 웹티드의 아미노산 y-/b-이온)는 확인되지 않는다. nBH를 형성하는 254-594개의 C-말단 아미노산에 따라 많은 TE311206의 MS/MS 분석은 52%의 서열범위를 나타낸다.

도면 5: ESI-MS/MS 스펙트럼 분석 보고. nBH lot TIK301009의 37.3kDa 단백질 결합이 마스코트 점수(Mascot score) 555를 가진 NT02CB1447/CB01445와 전체 오픈리딩프레임(ORF)에 걸친 28.4%의 웹티드 MS/MS 서열범위로 확인된다. 하나를 제외한 모든 웹티드는(회색박스, 확인된 MS 웹티드; 빨간색 사각형, MS/MS 봉괴 후 확인된 웹티드의 아미노산 y-/b-이온), C-말단 333개 아미노산에서 유도되는 것으로 확인된다. nBH를 형성하는 C-말단 아미노산 249-581에 따라 따라 많은 TE311206의 MS/MS 분석은 49.5%의 서열범위를 나타낸다.

도면 6: 세 개의 회분식 정제에서 유래된 nBH의 단백질 분해 활성에 의존한 농도 비교. A 농축된 nBH의 회석이 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000과 같을 때, 회분식 TIK301009, TIK280509 및 TE311206에서 유도된 nBH 분석하는 활성 테스트의 12.5% SDS-PAGE. 상기 분석은 $1\mu\text{g}$ 의 scBoNT/A와 $2\mu\text{l}$ 의 dH2O 및 37°C에서 60분간 대응 회석된 $1\mu\text{l}$ 의 nBH를 배양함으로써 수행되었다. SDS-PAGE 분석을 위해, $3\mu\text{l}$ 의 감소하는 4xSDS Laemmli 버퍼가 $10\mu\text{l}$ 의 최종부피에 첨가되었다. 150kDa scBoNT/A가 100kDa의 중쇄와 50kDa의 경쇄로 절단되었다. B 정량화된 중쇄, 경쇄 및 scBoNT/A의 단백질 벤드의 최적밀도와 경쇄 및 중쇄 생성물 벤드의 합이 LC, HC 및 scBoNT/A 단백질 벤드의 합으로 분할되었다. 첫째 폴리펩티드의 더 높은 회석은 절단비를 감소시킨다. 특이적인 세개의 다른 회분식 단백질 분해활성을 거의 동일하다.

도면 7: nBH에 의해 변형된 루프를 포함하는 scBoNT/A 야생형 및 돌연변이의 시간에 의존한 분열. A 루프 서열의 변형. scBoNTAS Throm에서 모든 리신 잔기는 제거되고 트롬빈 인식서열 LVPRGS는 주입되는 반면, scBoNT Res에서 상기 루프는 어떤 염기성 아미노산이 부족하다. 여덟개의 작은잔기 또는 부피가 큰 측쇄를 포함한 다섯개

의 아미노산으로 루프를 축소하는 것은 각각 scBoNTAS (GGSG)2 및 scBoNTAS FQWYI를 생성한다. scBoNTAS CGS-C에서 전체 루프는 제거되고 상기 시스테인을 형성하는 이화화 결합은 글리신과 세린으로 대체된다. **B** scBoNT/A 및 돌연변이의 시간-의존 절단의 SDS-PAGE 분석. **C** scBoNTAS 야생형은 nBH에 의해 시간 의존적으로 120분 내에 경쇄 및 중쇄로 활성화된다. 리신의 결실 및 단일 아르기닌(arginine) 잔기의 주입은 루프의 절단(scBoNTAS 트롬빈)을 연장한다. 어떤 염기성잔기가 결실된 루프는 여전히 절단된다(scBoNTAS 해상도). 부피가 큰 측쇄를 포함한 다섯개의 아미노산의 도입 또는 전체 루프의 결실로 8mer의 웨티드로 루프를 축소하는 것은 절단되지 않은 scBoNT/A를 생성한다.

도면 8: nBH를 포함한 scBoNT/A의 소화시 50kDa 및 100kDa 절단 생성물의 MS/MS 분석. **A** 마스코트 점수 1460을 가진 BoNT/A의 경쇄가 확인되는 50kDa 절단 생성물의 분석. 대부분의 C-말단에 할당된 웨티드는 생리학적으로 관찰되는 BoNT/A LCC에 해당하는 C-말단 G433 내지 K438의 아미노산을 포함한다. **B** 마스코트 점수 96을 가지는 BoNT/A의 중쇄로 확인되는 100kDa 절단 생성물의 분석. 대부분의 N-말단에 할당된 웨티드는 생리학적으로 관찰되는 BoNT/A HC에 해당하는 N-말단 A449 내지 K456의 아미노산을 포함한다.

도면 9: **A** 세개의 이후 풀(pool)의 anti-nBH-IgY 단백질 함량이 12.5% SDS-PAGE에서 분석되었다. **B** ELISA: Nunc Maxisorp F96 마이크로티터(microtiter) 플레이트는 4°C에서 밤새도록 많은(500ng/mL) PBS에서 다양한 nBH로 코팅되었고, 그 후 0.1%의 Tween-20과 2%의 무지방 우유를 포함하는 PBS의 블로킹 버퍼(blocking buffer)에서 1시간동안 차단되었다. 수세 후에, 각각의 풀(블로킹 버퍼 10 μg/mL)의 IgY 희석이 1시간동안 첨가되었고, 비오틴-표지된 당나귀 닭 항체 IgY, 스트렙타아비딘-홀스래디쉬(streptavidin-horseradish) 웨티다아제(디아노바, 함부르크, 독일 모두) 및 3,3',5,5' -테트라 메틸(3,3',5,5' -tetramethylbenzidine)(Sigma)을 사용하여 검출되었다.

도면 10: **A** Talon IMAC에 의해 비활성 BH 1-581 (63kDa)의 재조합 발현 및 분리. Talon IMAC 절편의 10% SDS-PAGE 분석(LMW: 116kDa, 66kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa; SS34, 깨끗한 용해물; TD, 통과액; W, 수세정도; E1-E7, 이미다졸(imidazol) 용출정도 1 내지 7). **B** 37°C에 1시간 후((Lane 6)(LMW: 116kDa, 66kDa, 45kDa, 35kDa, 25kDa) 재조합 iBH (SEQ ID NO: 2; "E" ; 63kDa)로 scBoNT/A의 LC (50kDa) 및 HC (100kDa)로의 단백질 가수분해는 관찰되지 않았다.

도면 11: 단백질 가수분해 처리된 폴리웨티드를 얻을 수 있는 정제된 활성 BoNTHydrolase (nBH)의 사용. **A** 200 μg의 재조합 정제된 scBoNT/A는 350ng의 정제된 활성 BoNTHydrolase로 12시간동안 37°C에서 배양되었다. 반응을 중지하기 위해서 nBH는 SEC (컬럼 Superdex 200 10/300GL, 버퍼: 50mM NaP pH 7.5, 150mM NaCl, 시료 부피=0.3mL, 유속=0.25mL/min)에 의해 제거되었고 절단된 양은 10% SDS-PAGE로 분석되었다. **B** 절편 1 (1800 μL) 포함~40% 처리된 BoNT/A는 350ng의 정제 활성 BoNTHydrolase로 15분동안 37°C에서 배양되었고, 한외여과(ultrafiltration)에 의해 300 μL까지 농축되었다. 반응을 중지시키기 위해 nBH는 SEC (컬럼 Superdex 200 10/300 GL, 버퍼: 50mM NaP pH 7.5, 150mM NaCl, 시료부피=0.3mL, 유속=0.25mL/min)에 의해 제거되었고 절단된 양은 10% SDS-PAGE로 분석되었다. **C** 절편 1 및 2 (1800 μL) 포함~80% 처리된 BoNT/A는 120ng의 정제된 활성 BoNTHydrolase로 25분동안 37°C에서 결합 및 배양되었고, 한외여과(ultrafiltration)에 의해 300 μL까지 농축되었다. 반응을 중지시키기 위해 nBH는 SEC (컬럼 Superdex 200 10/300GL, 버퍼: 50mM NaP pH 7.5, 150mM NaCl, 시료부피=0.3mL, 유속=0.25mL/min)에 의해 제거되었고 절단된 양은 10% SDS-PAGE로 분석되었다. **A** > 95%의 처리된 BoNT/A (SEQ ID NO. 3)가 획득되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0117]

실시예

[0118]

실시예 1: 특이적으로 단일사슬 BoNT/A를 그것의 활성 이중-사슬 형태로 절단하는 천연 BoNTHydrolase (nBH)의 정제 및 특성.

[0119]

(1) 판독 시스템/활성 테스트: 클로스트리듐 보툴리눔 배양 상층액에서 보툴리눔 신경독 A (BoNT/A)를 50kDa의 경쇄(LC) 및 100kDa의 중쇄(HC)로 가수분해하는 효소활성을 특이적으로 검출하고 정제하여, 대장균에서 단일사슬(sc) 폴리웨티드로서 150kDa BoNT/A를 발현하는 크로마토그래피 단계. 적절한 효소활성(nBH)을 가진 재조합 scBoNT/A의 배양은 10-13% SDS-PAGE를 감소시킴으로써 가시화된 50kDa LC 및 100kDa HC를 생성해야 한다.

[0120]

(2) 클로스트리듐 프로테아제 발현: 클로스트리듐 보툴리눔 계통 ATCC 3502의 단일 콜로니(colony)는 뇌심장침출액(BHI) 배지에서 접종되고 상기 배지는 혐기성 상태하에 37°C에서 밤새 배양되었다. O/N 배양의 10mL가 11

BHI 배지에 접종되고 48-72시간동안 혼기적으로 배양되었다.

[0121] (3) 암모늄 설페이트 침전: 상기 11 배지 상층액은 원심분리(4°C, 6500xg, 25분)에 의해 채취되었다. 암모늄 설페이트가 최종 농도 85%(여기에서는 575g)로 첨가되었고, 상기 혼탁액은 4°C에서 6시간동안 교반되었으며 이후 원심분리되었다(4°C, 6500xg, 30분). 상기 펠렛화된 암모늄 설페이트 침전은 50mM NaP pH 7.5의 작은 부피(여기에서는 5mL)에서 용해되었고 50mM NaP, 150mM NaCl pH 7.5에 맞서 투석되었다. 마지막으로, 상기 투석물은 원심분리되었고(4°C, 40000xg, 60분) 상기 상층액은 IEC를 위해 사용되었다.

[0122] (4) 이온 교환 크로마토그래피(IEC, 컬럼 HiPrep 16/10 Q FF): (3)의 상층액(도 1, 1ane 3)은 HiPrep 16/10 Q FF 음이온 교환 열 평형에 적용되었고 50mM NaP pH 7.5, 150mM NaCl을 포함하는 버퍼에서 수행되었다. 상기 작동(run)은 1 mL/min의 유속에서 수행되었다. 활성 테스트는 37°C에서 1시간동안 2 μg의 scBoNTA를 포함한 5μL의 다른 모든 부분을 배양하고 이후 SDS-PAGE (도 1)에서 분석함으로써 수행되었다. 절편 6-24는 결합되었고 그들의 부피는 한외여과(Amicon-Ultra MWCO 10,000)에 의해 3.5mL로 농축되었다.

[0123] (5) 크기 배제 크로마토그래피(SEC, HiLoad 16/60 Superdex 200): 이후, 상기 (4)의 농축된 단백질 용액은 HiLoad 16/60 Superdex 200 컬럼에 놓여져서 50 mM NaP pH 7.5, 150mM NaCl로 평형화되었다. 분리는 1mL/min의 유속에서 수행되었다. 80mL 및 100mL 사이의 고정부피를 가진 절편들은 (1)의 활성 테스트를 이용하여 분석되었고 효소활성 (nBH)를 포함하는 적절한 절편들은 농축되었으며(~10 mL) 한외여과에 의해 3mL까지 농축되었다. 이후, 암모늄 설페이트가 12.5% = 500mM(+0.2g)의 최종농도까지 첨가되었다.

[0124] (6) 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC, HiTrap Phenyl Sepharose): nBH는 버퍼 A (50 mM NaP pH 7.5, 500 mM 암모늄 설페이트)에서 페닐 세파로스와 결합되었다. 결합된 nBH는 유속 1mL/min에서 버퍼 B(50mM NaP pH 7.5)를 가진 선형의 증가하는 경사도 때문에 암모늄 설페이트의 양을 감소시킴으로써 용출되었다. 절편들을 포함하는 모든 단백질은 효소활성(1)을 이용하여 분석되었고 상기 적절한 절편들은 한외여과로 3.5mL까지 결합 및 농축되었다. 상기 용액의 상기 버퍼는 50mM NaP pH 7.5; 150mM NaCl로 조절되었다.

[0125] (7) SEC (HiLoad 16/60 Superdex 75): 마지막으로 상기 nBH는 50mM NaP pH 7.5, 150mM NaCl 및 유속 1mL/min에서 HiLoad 16/60 Superdex 75컬럼을 이용한 SEC에 의해 정제되었다. 70mL 및 80mL 사이의 고정부피를 가진 절편들은 12.5% SDS-PAGE (도 2)에 의해 분석되었고 상기 ~37.3kDa까지 이동하는 nBH를 포함하는 절편 8-12는 결합되고(~10mL) 한외여과에 의해 1mL까지 농축되었다.

[0126] (8) 약 37.3kDa (nBH)을 이동시키는 상기 현저한 단백질은 에드만(Edman) 분해 프로토콜에 따른 N-말단 웨티드 배열에 의해 분석된다. 상기 확인된 웨티드 서열은 V Q G Q S V K G V G이고 SEQ ID NO: 1의 처음 10개 잔기에 대응된다.

[0127] (9) 두개의 nBH(NT02CB1447, 37.3kDa, 도면 3, lane 3: TIK301009, lane 4: TIK280509)은 상기에서 설명된 절차에 따라 분리되었다. 하기와 같은 분리절차의 변형은 nBH 동형단백질(isoform) NT02CB1446(38.6kDa, 도면 3, lane 2, lot TE311206)을 생산한다: (i) 클로스트리듐 보툴리눔 배양의 증가: 48 내지 72시간대신 18시간; (ii) 크로마토그래피 단계의 변화: IEC → SEC Superdex 75 → IEC 대신 HIC 페닐 세파로스 → SEC Superdex 200 → HIC 페닐 세파로스 → SEC Superdex 75.

0128] 실시예 2: 질량분석(MS)에 의한 클로스트리듐 보툴리눔으로부터 nBH의 서열동일성

[0129] (1) 트립신 소화: SDS-PAGE에서 약 38kDa (nBH)를 이동시키는 상기 단백질 밴드가 트립신 소화를 위해 적출되었고, 50mM의 NH4HCO3, 50%의 아세토니트릴(acetonitrile)에서 37°C의 온도에서 30분간 부드럽게 흔들어 탈색시켰다. 겔 스팽이 깨끗해질 때까지 탈색이 반복되었다. 아세토니트릴 (100%)이 첨가되었고 3분 후에 제거되었다. 이 후, 스팽은 속도 진공 청소기 시스템(에펜도르프, 독일)에서 건조되었다. 50mM NH4HCO3에 트립신 (10ng/μL)이 첨가되었고 1시간동안 얼음 위에서 배양되었다. 그러고나서, 잔류된 트립신 용액은 제거되고, 적은 부피의 50mM NH4HCO3이 첨가된 후 37°C에서 밤새도록 소화가 진행되었다. 상층액을 모아 5% TFA, 10% 아세토니트릴을 이용하여 2회 겔 조각을 추출하였다. 모든 유체들이 혼합되고, 속도 진공청소기에서 건조된 후 추출된 웨티드가 4°C에 저장되었다.

[0130] (2) 비행 (MALDI-TOF/TOF) MS의 레이저 탈착 이온화 시간이 지원된 매트릭스: 샘플들은 MALDI-TOF/TOF 질량분석계 (Ultraflex1 Bruker Daltonik GmbH)에서 25kV 가속전압의 선형모드에서 분석되었다. 질량이 700m/z에서 4,500m/z 검출되었다. 샘플(2μL)은 스테인리스 강 MALDI 목표판에서 50%의 아세토니트릴과 0.2%의 트리프루오릭

아세트산(trifluoric acetic acid)(TFA)을 포함하는 $2\mu\text{l}$ 의 시내피닉산(sinappinic acid) 용액에서 결정화된다. 500개의 레이저 스팟이 각 샘플에서 수집되었다.

[0131] (3) 역상 크로마토그래피에 의한 웨티드 분리: 웨티드 분리는 nano-HPLC 시스템(Agilent Technologies, Waldbronn, 독일)을 이용하여 자동 샘플 주입기 및 경사도 펌프로 구성된 역상 크로마토그래피에 의해 수행되었다. 상기 샘플들은 베퍼 A(5% 아세토니트릴, 0.1% 포름산)에서 용해되고, 최대 $10\mu\text{l}$ 로 나뉘어져 C18 컬럼에 주입되었다(Zorbax SB-C18, $5\mu\text{m}$, 300A, 내경 0.5mm , 길이 15cm). 로딩 후에, 상기 컬럼은 15분간 베퍼 A에서 수세되고 상기 웨티드는 용리제(eluent) A와 0% 내지 100%인 용리제 B(0.1% (v/v) 포름산에 70% (v/v) 아세토니트릴)의 경사도를 사용하여 75분간 용리되었다.

[0132] (4) 전자분무 이온화((ESI)-내부이온 트랩 질량분석계): 상기 HPLC 출구는 직접적으로 이온 트랩 질량 분석계의 nanoESI 소스와 연결되고 상기 Agilent 동축 시스-액체 스프레이가 사용되었다(Agilent 기술). 상기 출구 모세관은 주변 강철 바늘로 블들려 있고 그것의 0.1 내지 0.2mm 을 관찰하였다. 상기 스프레이는 네뷸라이저(nebulizer) 가스(5 l/min)로서 N_2 에 의해 안정화되었다. 이온화 전압은 $4,500\text{V}$ 로 설정되고 건조가스는 5 psi 및 250°C 로 설정되었다. 스펙트럼은 Esquire3000+ 이온 트랩 질량 분광계(Bruker Daltonik)로 초당 $13,000\text{m/z}$ 의 스캔속도로 수집되었다. 긍정적인 모드에서 ESI를 사용하여, 스크리닝 모드 및 MS 및 MS/MS 분석 간의 데이터의 존적 전환에서 질량 스펙트럼은 50 내지 1600m/z 로 취득되었다. MS/MS 스펙트럼 양의 증가를 위해 한 스펙트럼에서 오직 두개의 전구체 이온이 MS/MS 분석을 위해 선택되고 활성차단이 이미 측정된 전구체 이온을 추출하기 위해 2분간으로 설정되었다.

[0133] (4) 데이터 처리: 데이터 처리는 Data Analysis (version 3.0) 및 BioTools (version 3.0) 소프트웨어 패키지(Bruker Daltonik)로 수행되었다. 단백질 확인은 MASCOT 소프트웨어 (version 2.1) 및 MSDB 데이터베이스(Matrix Science, 런던, 영국)으로 수행되었다.

[0134] (5) 결과:

[0135] 표2: MS에 의해 확인된 nBH

표 2

lane	Lot nBH	단백질 concentr.	ORF의 이름	진뱅크 접근번호	ORF의 아미노산	MW [kDa]	마스코트점수
2	TE311206	192 ng/㎕	NT02CB1446 CB01444	CAL82987.1	254-594	38.6	725
3	TIK301009	130 ng/㎕	NT02CB1447 CB01445	CAL82988.1	249-581	37.3	555
4	TIK280509	114 ng/㎕	NT02CB1447 CB01445	CAL82988.1	249-581	37.3	609

[0137] 상기 lane 2 (nBH lot TE311206)의 38.6kDa 단백질 밴드가 마스코트 점수가 725이고, 전체 오픈리딩프레임(ORF)에 걸쳐 29.6%의 웨티드 MS/MS 서열범위인 NT02CB1446/CB01444로 확인되었다. N-말단 253 아미노산에서 유래된 웨티드는 없는 것으로 확인되었다(도면 4). lot TE311206의 MS/MS 분석은 nBH를 형성하는 C-말단 아미노산 254-594에 따른 52%의 서열범위를 표시한다. lane 3 (nBH lot TIK301009) 및 lane 4 (nBH lot TIK280509)의 37.3kDa 단백질 밴드가 각각 마스코트 점수 555 및 609를 가진 NT02CB1447/CB01445로 확인되었다. C-말단 333 아미노산에서 유래된 웨티드가 하나만 제외하고 모두인 것으로 확인되었다. 상기 lot TIK301009의 MS/MS분석은 nBH를 형성하는 C-말단 아미노산 249-581에 따른 49.5%의 서열범위를 표시한다.

실시예 3: nBH의 효소적인 특이성의 특징화

[0139] (1) 세 개의 회전식 정제에서 유래된 nBH의 단백질 분해활성에 의존한 농도가 비교되었다(도면 6). nBH의 다양한 회석을 사용하여 회전식 TIK301009, TIK280509 및 TE311206에서 유래된 nBH를 분석하는 활성 테스트는 회석이 더 많이 될수록 절단률이 더 감소된다는 것을 증명한다. 세 개의 다른 회전식의 단백질 분해활성은 성숙한 동형 단백질 NT02CB1446 (TE311206)가 성숙한 NT02CB1447 (SEQ ID NO: 1)와 같은 특이적인 활성과 거의 유사하다는 것을 나타낸다.

[0140]

(2) scBoNT/A 야생형의 시간-의존 절단과 nBH에 의한 돌연변이는 활성테스트를 적용하여 분석되었다(도면 7). scBoNTAS 야생형은 nBH에 의해 시간에 의존하여 95% 이상까지 120분 내에 경쇄 및 중쇄로 활성화되었다. 상기 루프 서열은 절단부위를 특징화하기 위해 변형되었다. scBoNTAS Throm에서 모든 리신 잔기는 제거되었고, 절단부위를 연장할 수 있는 트롬빈 인식 서열 LVPGRS가 삽입되었다. scBoNT 잔기에서, 상기 루프는 절단부위에 리신 및 아르기닌과 같은 염기성 잔기에 대한 nBH의 강한 인식 선호도를 나타내는 가수분해를 크게 지연시키는 어떤 염기성 아미노산을 결실시킨다. 게다가, nBH의 상기 루프에 대한 접근성은 루프를 8개의 작은 잔기 또는 부피가 큰 측쇄 5개의 아미노산(scBoNTAS (GGSG)2 및 scBoNTAS FQWYI)으로 축소화함으로써 손상시킨다.

[0141]

(3) nBH로 scBoNT/A를 소화하여 50kDa의 절단생성물에 대한 MS/MS 분석은 BoNT/A LC의 C-말단에서 생리학적으로 관찰되는 대응인 아미노산 G433 내지 K438를 덮는 C-말단의 대부분을 나타낸다. BoNT/A의 중쇄와 동일한 100kDa 절단생성물의 분석은 대부분의 N-말단으로 할당된 웨티드는 BoNT/A HC의 N-말단에서 생리학적으로 관찰되는 아미노산 A449 내지 K456를 나타낸다는 것을 증명한다. 따라서, 상기의 분리된 nBH는 생리학적으로 처리된 BoNT/A를 생성하고 우선적으로 웨티드 결합 C-말단을 리신 및 아르기닌 잔기로 가수분해한다.

[0142]

실시예 4: BoNTHydrolase의 진화적인 보존과 그의 동형 단백질

[0143]

SEQ ID NO: 2 (진뱅크 접근번호. CAL82988.1/YP_001253958.1)의 단백질 서열 분석은 세개의 보존된 도메인을 드러냈다. 잔기 18-573는 Blast 점수가 738인 아미노산 전달 및 대사와 관련된 아연 메탈로프로테아제(Zinc metalloprotease)(엘라스타제(elastase)) 또는 LasB에 해당한다. 잔기 148-212는 웨티다제 프로웨티드 및 YPEB 도메인 또는 PepSY (Blast score 97)에 해당한다. 잔기 336-573은 서몰리신(thermolysin), 프로테마리신(protealysin), 아무레오리신(aureolysin) 및 천연 프로테아제(Blast score 803)을 포함하는 웨티다제 M4 패밀리의 일부이다. 클로스트리듐 보툴리눔ATCC 3502의 게놈서열은 iBH 동형 단백질을 코딩하는 6개의 ORF의 존재를 나타낸다(Sebaihia 등, 2007, Genome Res. 17(7):1082-1092 참조). 또한 게놈 데이터는 iBH를 코딩하는 5 내지 7개의 ORF 사이를 포함하는 클로스트리듐 스포로게네스를 분비하는 비-BoNT 뿐만 아니라, 10그룹의 클로스트리듐 보툴리눔 계통을 위해서도 이용할 수 있다. 상기 nBH (SEQ ID NO: 1)는 다른 63개의 동형 단백질과 최소 64%의 아미노산 서열동일성을 나눈다.

[0144]

실시예 5: BoNTHydrolase에 대한 특이적인 항체의 발생

[0145]

(1) IgY의 발생: 16주된 닭 [ISA Brown and Lohmann Selected Leghorn (LSL), Spreenhagener Vermehrungsbetrieb fur Legehennen GmbH, Bestensee, 독일]은 개별 닭장에서 보호되었고 닭을 유지하기 위해 독점적으로 구성되었다(Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany). 음식(ssniff Legehuhner-Zucht 1 and 2; ssniff Spezialitaten GmbH, Soest, Germany) 및 물은 무제한으로 이용 가능하였고, 상기 닭은 23 내지 25 주 사이에 알을 낳기 시작했다. 알은 매일 수집되어 표시되고 그들이 더 처리될 때까지 4°C에 저장되었다. 모든 동물 유지 및 실험은 베를린의 지방자치 단체 가이드 라인에 따라 수행되었다(No. H0069/03). 닭은 근육(왼쪽 및 오른쪽의 흉근)을 통해 1년의 기간 동안 4 내지 8주 간격으로 총 10회 예방접종되고 신장시켰다. 이전 작업에 근거하여 사용된 상기 간격은 적어도 3주의 기간동안 후 면역(postimmunisation)될 때까지 입증할 수 있는 기억세포는 보이지 않았다. 예방접종마다 500 μ l의 항원용액을 주입하였다. Freund의 완전 부형제가 첫 예방접종을 위해 사용되었고, FIA가 이후의 신장을 위한 접종에서 사용되었다. IgY 정제를 위한 방법이 Polson 등에 의해 적용되었다 (1980). 간략하게, 상기 알 노른자는 멸균 PBS(pH 7.4, Roche, Mannheim, Germany)와 1:2로 희석되었다. 지방 및 지방단백질의 제거를 위해, 3.5% (w/v)의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 6000((Roth, Karlsruhe, Germany)이 첨가되었다. 원심분리(4°C에서 20분간 10,000 \times g) 후에 부드럽게 흔든 후, 상층액을 옮기고 최종 농도 12%(w/v)를 위해 고체 PEG 6000이 첨가되었다. 이 혼합물은 이후 상기와 같이 원심분리되었다. 상기 침전물은 10ml의 PBS에 용해시키고, PEG가 12%(wt/vol) 첨가된 후, 상기 용액은 원심분리되었다. 마지막으로, 상기 침전물은 PBS 1.2ml에 용해되고, 미소투석법(microdialysis) 장치(QuixSep, Roth, Germany)로 이동시킨 후 4°C에서 PBS에 대해 투석되었다. 상기 단백질 내용물(mg/ml)은 12.5% SDS-PAGE에 의해 분석되고(도면 9A) 280nm에서 광도 측정으로 측정되었으며 IgY를 위한 1.33의 흡광계수를 가진 Lambert-Beer law에 따라 계산되었다.

[0146]

(2) ELISA: Nunc Maxisorp F96 마이크로티터 플레이트 (VWR International GmbH, Darmstadt, 독일)는 다양한 lots (500 ng/mL)의 nBH로 4°C에서 PBS에서 밤새도록 코팅되고 이 후 0.1% Tween-20 및 2% 무지방 우유 (Merck, Darmstadt, Germany)를 포함하는 PBS 블로킹 버퍼로 1시간동안 블락되었다. 수세 후에, IgY 희석(블로킹 버퍼

10 μg/ml)이 1시간동안 첨가되었고 비오틴이 표시된 당나귀 항치킨(antichicken) IgY, 스트렙타아비딘-홀스래디쉬 퍼옥시다제(streptavidin-horseradish peroxidise)(모두 Dianova, Hamburg, Germany) 및 3,3',5,5' -테트라메틸벤지다인 (Sigma)를 사용하여 검출되었다. 검출된 nBH는 도면 9B에 나타나 있다.

[0147] (3) Western blot: nBH는 12.5% SDS-PAGE로 분리되고, 표준 면역기술을 사용하여 폴리비닐리텐의 불소 (fluoride) 막(Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany)로 이동되었다. 상기 막은 4°C에 밤새도록 블락되고 1시간동안 IgY(블로킹 버퍼에서 1:5,000)에서 배양되었다. 수세 후에, 상기 막은 비오틴-표시된 당나귀 항-치킨 IgY로 30분동안 탐침되었고, 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase) 및 CDP-Star (Perkin Elmer, Waltham, MA)를 사용하여 현상하였다.

[0148] 실시예 6: BoNTHydrolase의 제조합 발현

[0149] (1) 플라스미드 구조: 천연 BH(SEQ ID NO: 1)를 코딩하는 유전자 영역과 그의 프로펩티드(SEQ ID NO: 2)는 적절한 올리고뉴클레오티드 클로스트리듐 보툴리눔ATCC 3502의 DNA를 이용하여 PCR에 의해 증폭하고, His6Tag를 코딩하는 올리고뉴클레오티드에 융합하고, 각각 발현 플라스미드 pQ-BH1445H6-249-581 및 pQ-BH1445H6-1-581을 생산하는 pQE3 (Qiagen)로 주입되었다. 염기서열은 DNA 시퀀싱에 의해 검증되었다.

[0150] (2) 제조합 단백질의 정제: His6Tag 카르복실 말단에 융합된 nBH 및 iBH는 대장균 계통 M15pREP4 (Qiagen)를 이용하여 상온에서 10시간의 배양을 통해 생성되었고, 다음과 같은 제조업체의 지시에 따라 Talon-sepharose beads (Clontech Inc.)로 정제되었다. 원하는 단백질을 포함하는 절편들이 모여, 액체질소로 냉동되고 70°C로 유지되었다. iBH는 63kDa의 MW를 가지는 제조합 단백질로 분리되었다(도면 10A). iBH의 비활성은 활성 테스트를 이용하여 증명되었다: 37°C에서 1시간 후에 scBoNT/A wt가 LC 및 HC에서 가수분해되지 않았다(도면 10B).

[0151] 실시예 7: BoNTHydrolase의 억제

[0152] (1) BH의 웨프티드 억제를 위한 스크리닝: SEQ ID NOs: 4 내지 25에 근거한 웨프티드는 하나 또는 그 이상의 염기성 잔기가 결실되도록 합성된다. 각 웨프티드는 각 활성 테스트에 따라 혼합물로 첨가될 것이다. 처리된 scBoNT/A의 양을 감소, 완전히 처리된 scBoNT/A에서 요구되는 지속기간을 연장 또는 처리된 scBoNT/A를 차단할 수 있는 웨프티드는 nBH의 억제제로 간주된다.

[0153] (2) 항체에 근거한 억제제를 위한 스크리닝: 실시예 5의 IgY와 같은 nBH에서 유도된 애피토프에 맞서 발생한 항체들은 nBH에서 배양되고 이후 활성 테스트가 적용된다. 처리된 scBoNT/A의 양을 감소, 완전히 처리된 scBoNT/A에서 요구되는 지속기간을 연장 또는 처리된 scBoNT/A를 차단할 수 있는 항체는 nBH의 억제제로 간주된다.

[0154] 실시예 8: 단백질 가수분해 처리 폴리펩티드를 억기 위한 정제된 활성 BoNTHydrolase (nBH) 용도

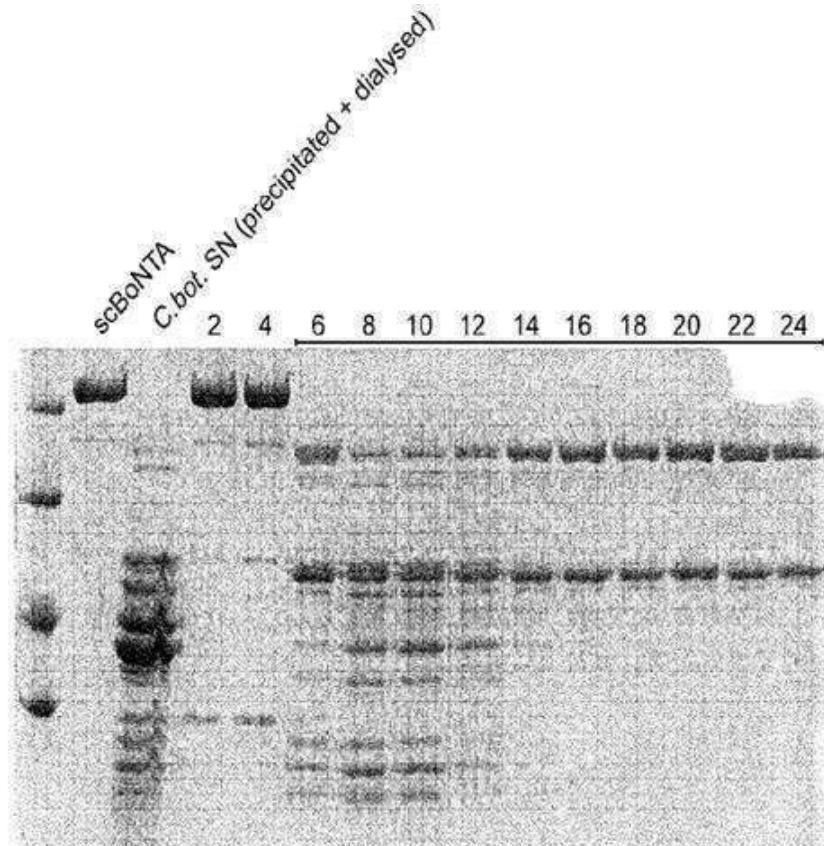
[0155] (1) 제조합 정제된 scBoNT/A의 200 μg은 350ng의 정제된 활성 BoNTHydrolase와 함께 37°C에서 12분간 배양된다. 반응을 중단하기 위해 nBH는 SEC (column Superdex 200 10/300 GL, 버퍼: 50mM NaP pH 7.5, 150mM NaCl, 샘플부피=0.3ml, 유속=0.25ml/min)에 의해 제거되고, 절단량은 10% SDS-PAGE에 의해 분석되었다(도면 11A).

[0156] (2) ~40% 처리된 BoNT/A를 포함하는 절편 1(1800 μl)는 350ng의 정제된 활성 BoNTHydrolase와 함께 37°C에서 15분간 배양되고 한외여과에 의해 300 μl까지 농축되었다. 반응을 최종적으로 중단하기 위해 nBH는 SEC (column Superdex 200 10/300 GL, 버퍼: 50mM NaP pH 7.5, 150mM NaCl, 샘플부피=0.3ml, 유속=0.25ml/min)에 의해 제거되고, 절단량은 10% SDS-PAGE에 의해 분석되었다(도면 11B).

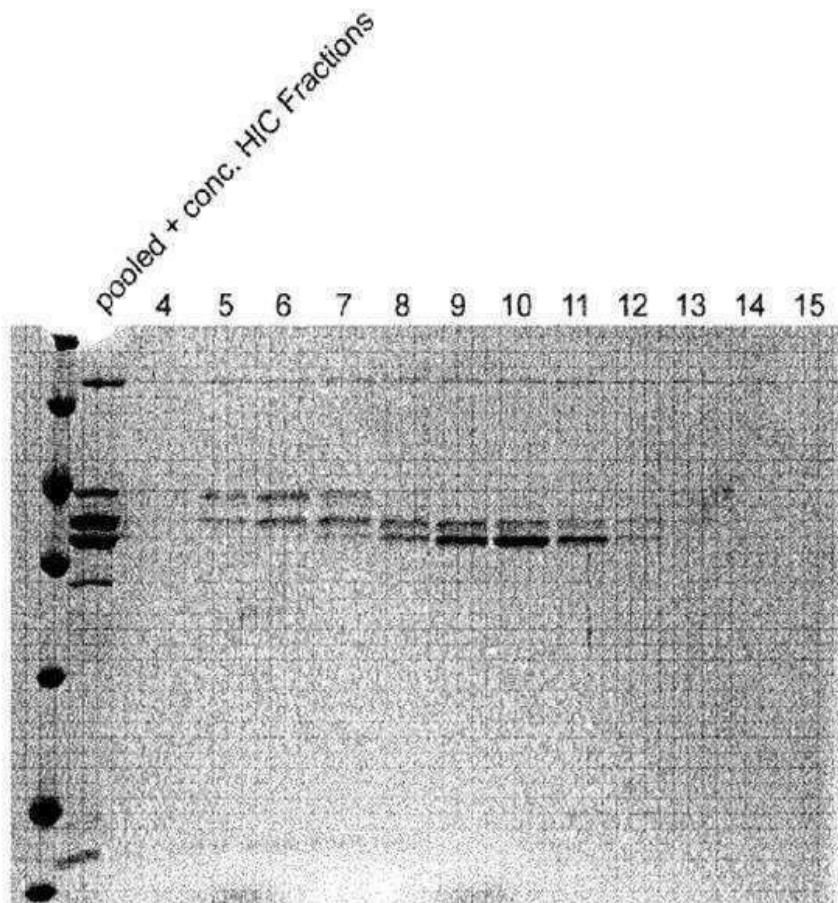
[0157] (3) ~80% 처리된 BoNT/A를 포함하는 절편 1 및 2(1800 μl)는 정제된 활성 BoNTHydrolase와 함께 37°C에서 25분간 배양되고 한외여과에 의해 300 μl까지 농축되었다. 반응을 최종적으로 중단하기 위해 nBH는 SEC (column Superdex 200 10/300 GL, 버퍼: 50mM NaP pH 7.5, 150mM NaCl, 샘플부피=0.3ml, 유속=0.25ml/min)에 의해 제거되고, 절단량은 10% SDS-PAGE에 의해 분석되었다(도면 11C). A > 95% 처리된 BoNT/A (Seq ID NO. 3)가 획득되었다. 만약 둘째 폴리펩티드가 37°C에서 50분간 한 스텝에서 처리된다면 상기와 동일하게 완전히 처리된 둘째 폴리펩티드(>95% 처리된 BoNT/A)도 획득된다(350ng의 nBH와 함께 200 μg의 scBoNT/A 배양됨). 37°C에서 1시간동안 배양된 후에, BoNT/A의 97% 이상이 처리되었다.

도면

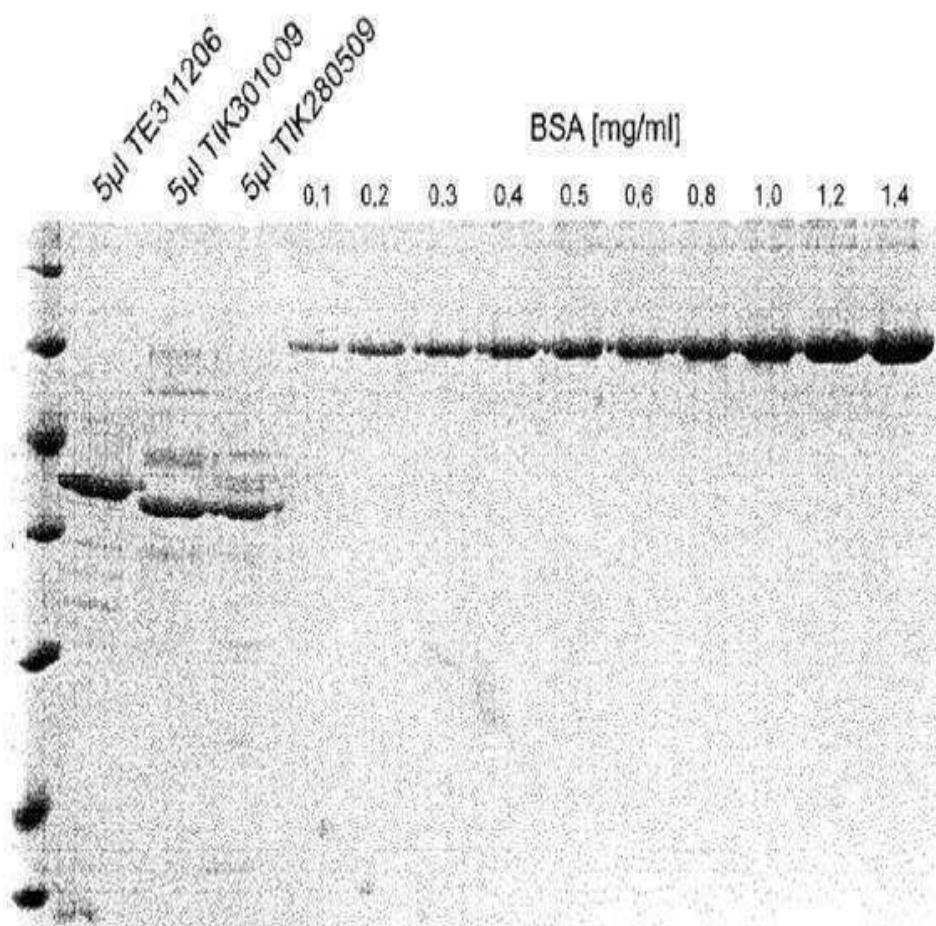
도면1



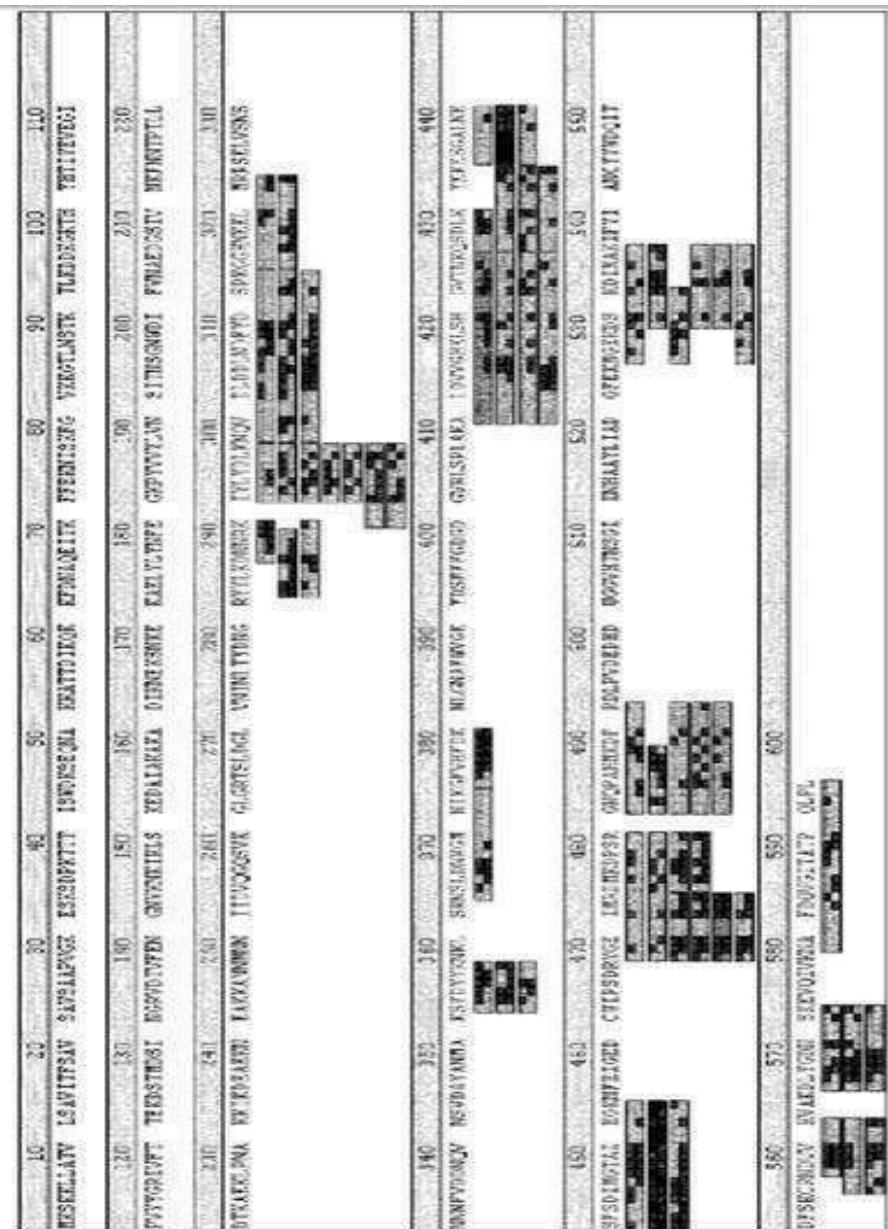
도면2



도면3



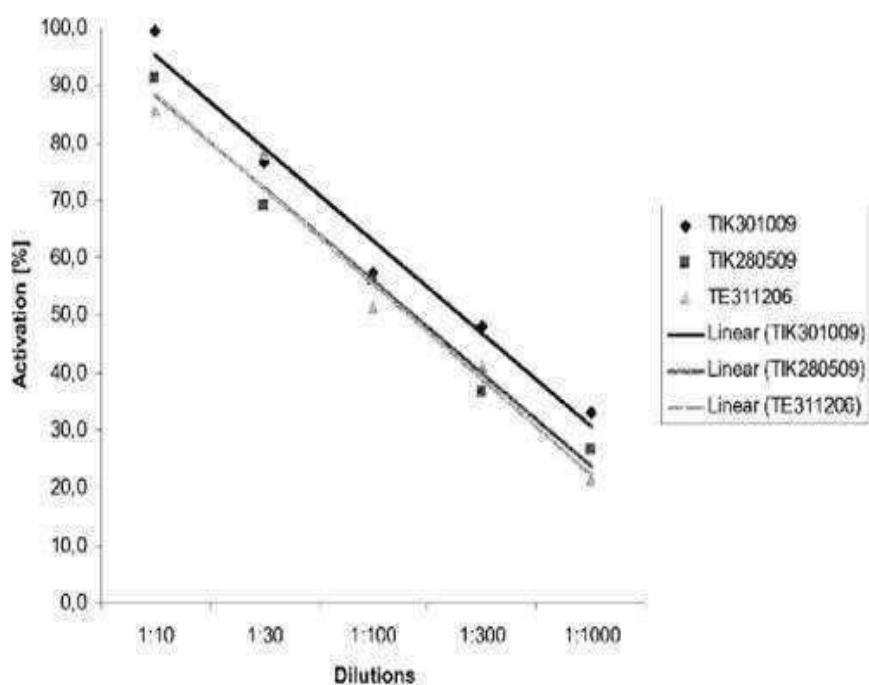
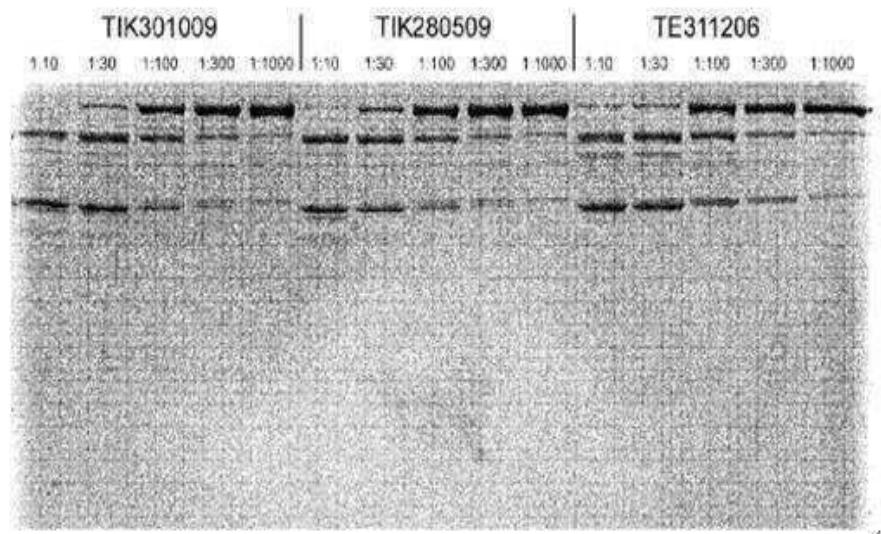
도면4



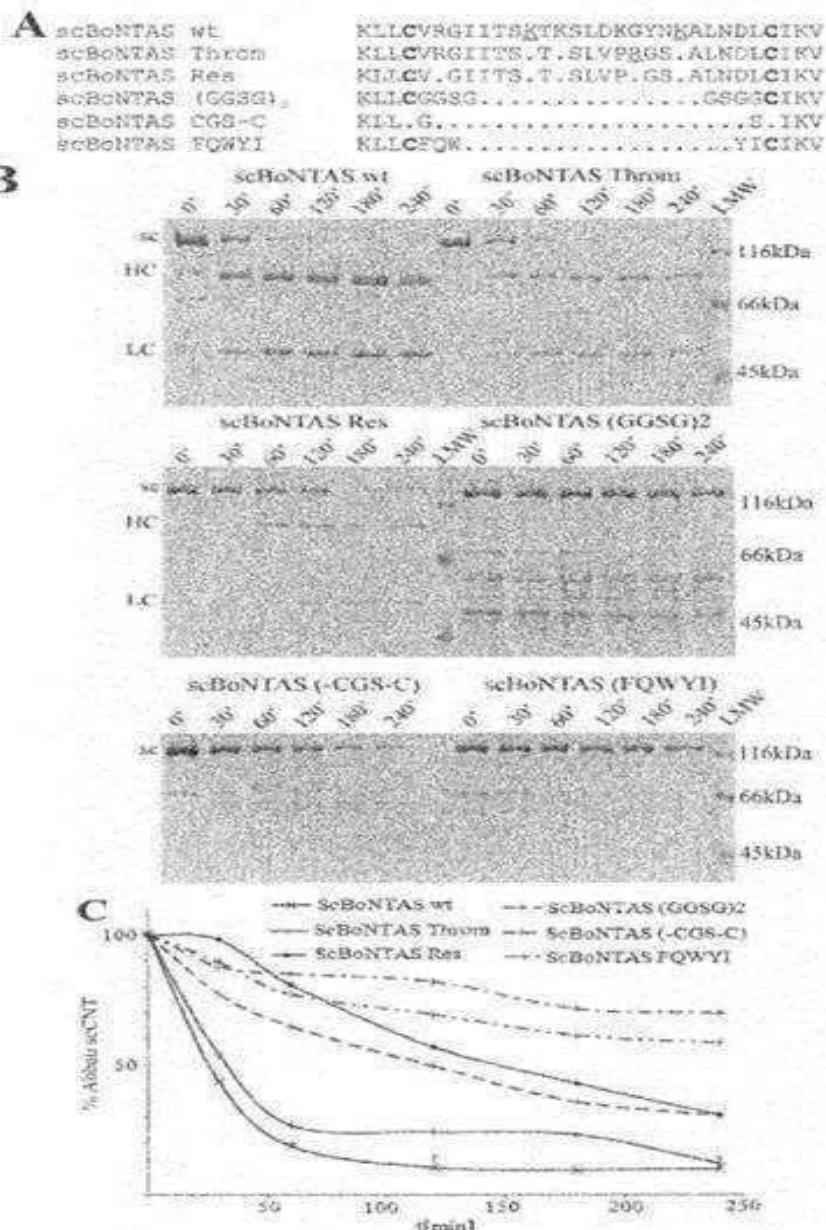
도면5

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340
330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540
540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760
760	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870
870	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980
980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090
1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200

도면6



도면7



도면8

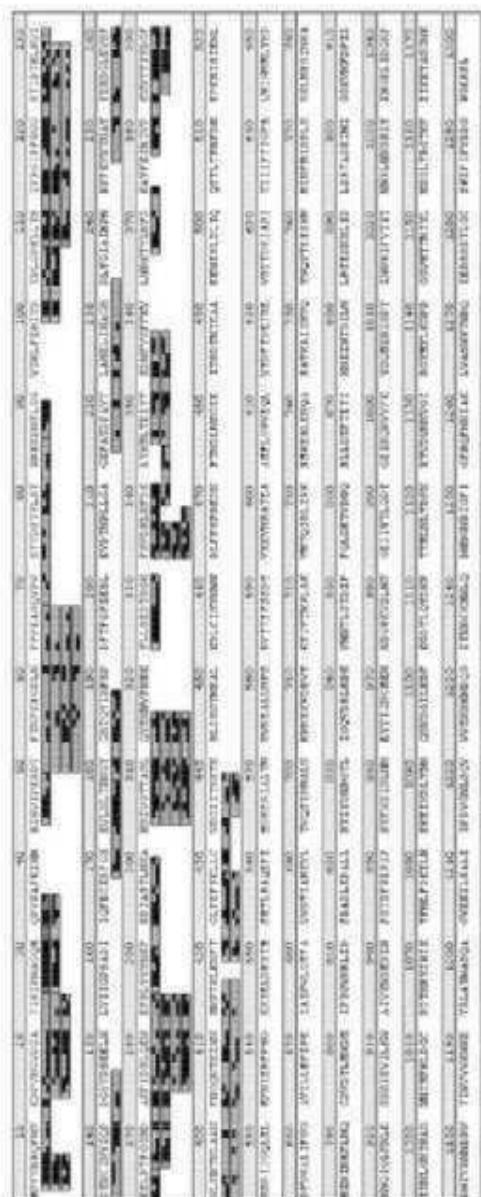


Figure 8A

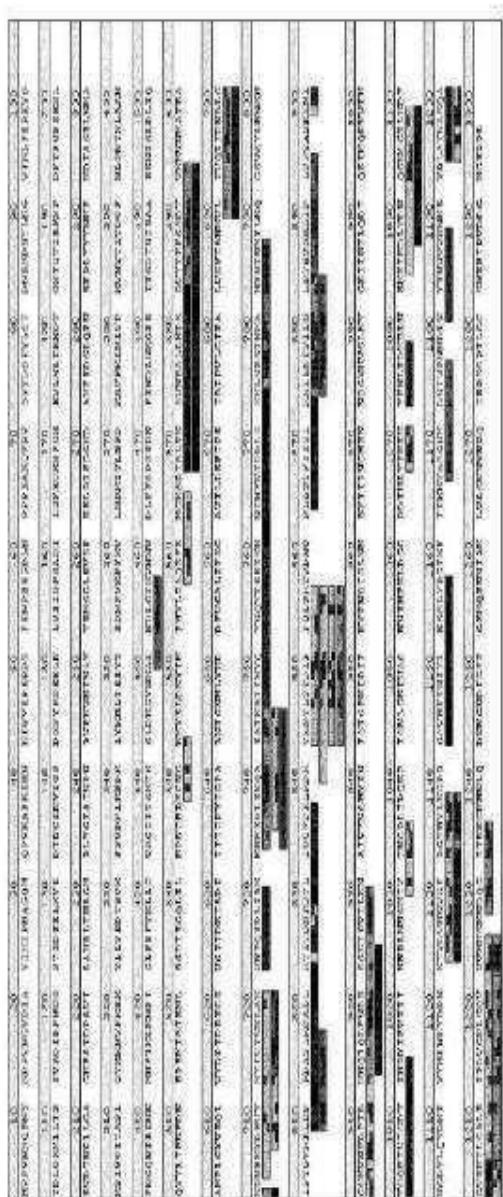
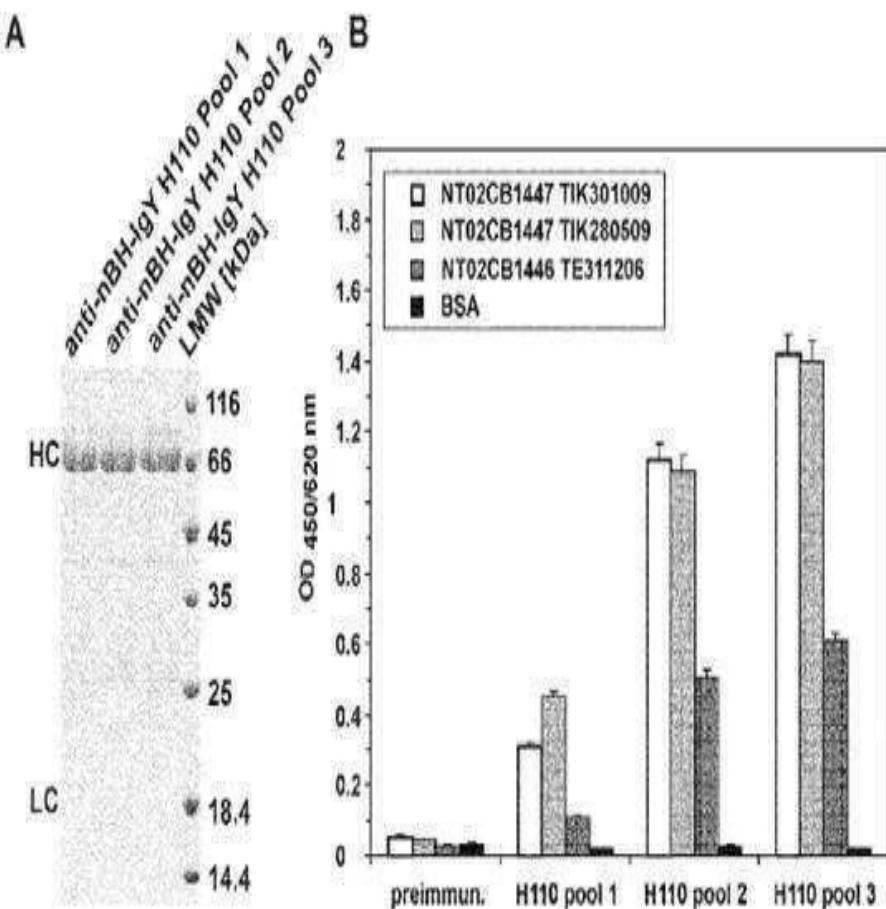


Figure 8B

도면9



도면10

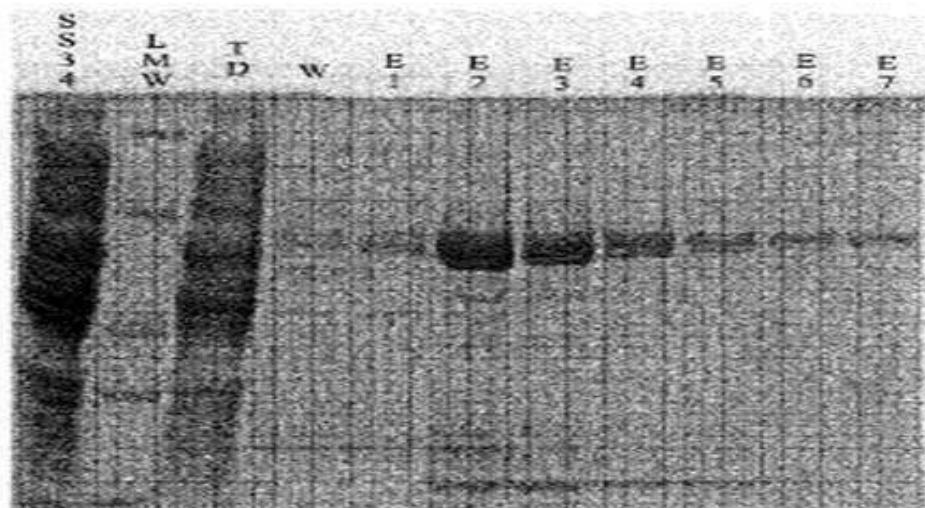


Figure 10A

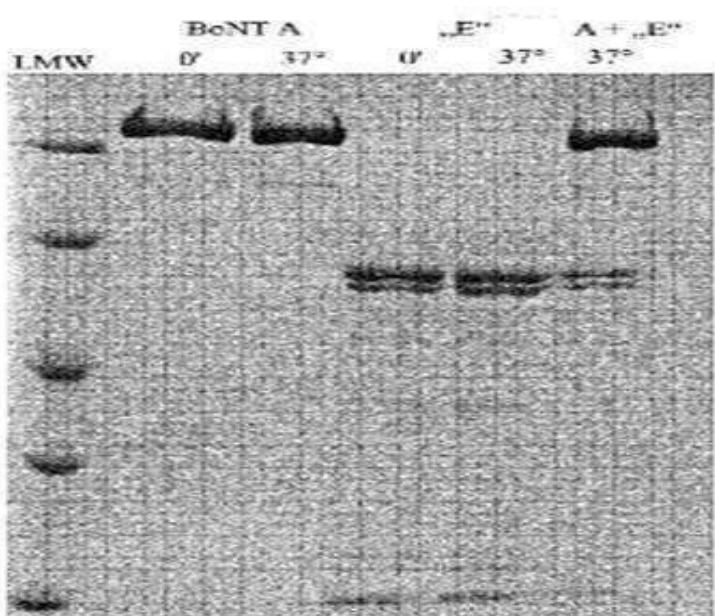


Figure 10B

도면11

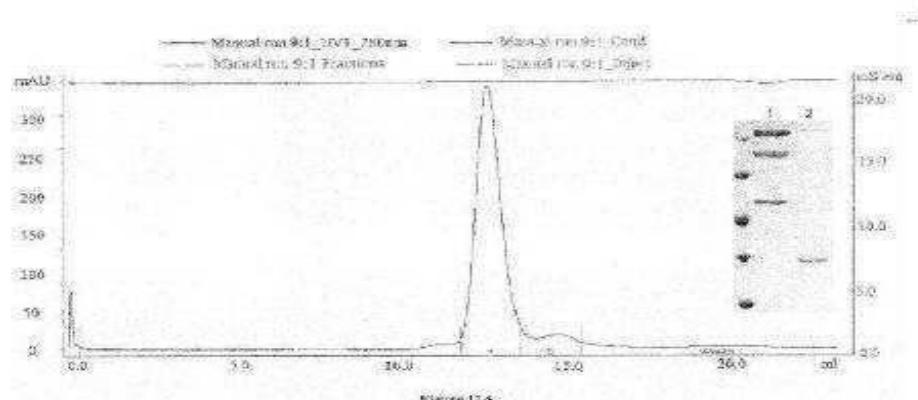


Figure 11A

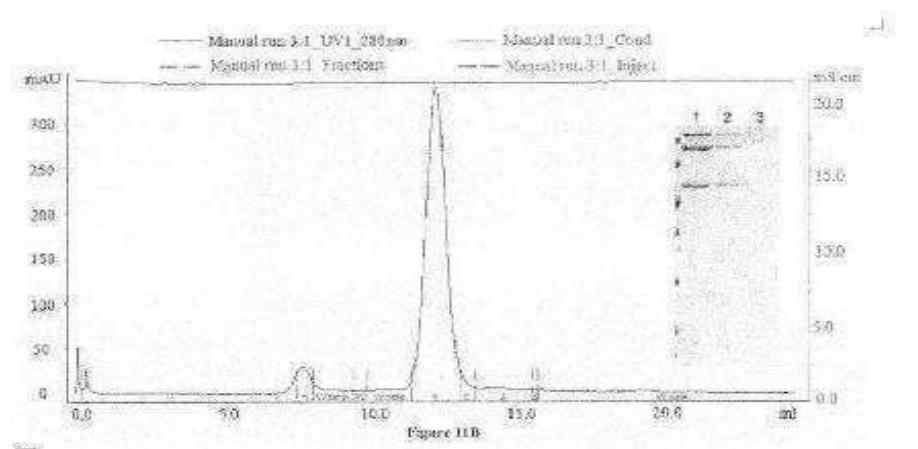


Figure 11B

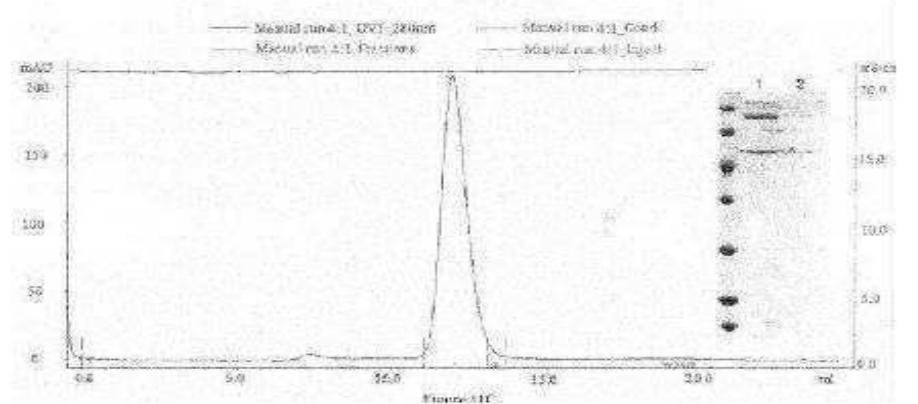


Figure 11C

서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> toxogen GmbH

<120> Methods for the manufacture of proteolytically processed polypeptides

<130> 757-1

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 333

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<400> 1

Val Gln Gly Gln Ser Val Lys Gly Val Gly Lys Thr Ser Leu Asp Gly

1 5 10 15

Leu Val Asn Ile Asp Val Thr Tyr Gly Asn Gly Lys Tyr Tyr Leu Lys

20 25 30

Asp Ser Asn Lys Asn Ile Tyr Leu Tyr Asp Leu Lys Asn Gln Val Asp

35 40 45

Glu Tyr Asp Leu Tyr Asn Tyr Leu Ser Arg Pro Asn Tyr Lys Gln Ile

50 55 60

Leu Met Ser Lys Ser Glu Leu Ile Ser Asn Tyr Asn Asn Asn Phe Ile

65 70 75 80

Ala Asn Asn Gln Val Asn Ser Val Asp Ala Tyr Val Asn Thr Asn Lys

85 90 95

Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Lys Leu Asn Arg Asn Ser Ile Asp Asn

100 105 110

Lys Gly Met Asn Ile Asn Gly Phe Val His Val Gly Arg Asn Tyr Gly

115 120 125

Asn Ala Phe Trp Tyr Gly Pro Tyr Asp Gly Met Phe Phe Gly Asp Gly

130 135 140

Asp Gly Ile Tyr Phe Ser Ser Leu Ala Lys Ser Leu Asp Val Val Gly

145 150 155 160

His Glu Leu Ser His Gly Val Thr Asn Lys Glu Ser Asn Leu Lys Tyr

165 170 175

Glu Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Ile Met Gly

180 185 190

Val Ala Val Glu Gly Lys Asn Phe Val Leu Gly Glu Asp Cys Trp Val

195 200 205

Ala Gly Gly Val Met Arg Asp Met Glu Asn Pro Ser Arg Gly Gly Gln

210 215 220

Pro Ala His Met Lys Asp Tyr Lys Tyr Lys Thr Met Asn Asp Asp Asn

225 230 235 240

Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly Ile Ile Asn His Ala Ala Tyr Leu

245 250 255

Val Ala Asp Gly Ile Glu Lys Thr Gly Ala Lys Asn Ser Lys Asp Ile

260 265 270

Met Gly Lys Ile Phe Tyr Thr Ala Asn Cys Tyr Lys Trp Asp Glu Thr

275 280 285

Thr Asn Phe Ala Lys Cys Arg Asn Asp Val Val Gln Val Thr Lys Glu

290 295 300

Leu Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Tyr Val Lys Ile Val Glu Lys Ala Phe

305 310 315 320

Asp Gln Val Gly Ile Thr Ala Thr Pro Gln Leu Pro Leu

325 330

<210> 2

<211> 581

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<400> 2

Met Lys Ser Lys Lys Leu Leu Ala Thr Val Leu Ser Ala Val Ile Thr

1 5 10 15

Phe Ser Thr Val Ser Ala Val Tyr Ala Ala Pro Val Gly Lys Glu Ser

20 25 30

Lys Val Glu Pro Lys Thr Thr Ile Thr Trp Glu Lys Asn Glu Gln

35 40 45

Asn Thr Lys Lys Ala Ala Thr Asp Ile Thr Glu Lys Lys Phe Asn Asn

50 55 60

Ser Glu Glu Ile Thr Lys Phe Phe Glu Lys Asn Ile Ser Lys Phe Gly

65 70 75 80

Val Gln Lys Gly Ser Leu Lys Asn Thr Lys Thr Val Lys Asp Glu Lys

85 90 95

Gly Lys Thr Asn Tyr His Met Ile Tyr Glu Val Glu Gly Ile Pro Val

100 105 110

Tyr Tyr Gly Arg Ile Val Phe Thr Thr Glu Lys Asp Ser Ser Met Asp

115 120 125

Ser Ile Asn Gly Arg Ile Asp Thr Val Phe Glu Asn Gly Asn Trp Lys

130 135 140

Asn Lys Ile Lys Leu Ser Lys Glu Asp Ala Ile Ala Lys Ala Lys Asn

145 150 155 160

Asp Ile Lys Asp Glu Lys Ala Thr Ser Lys Lys Thr Asp Leu Tyr Leu

165 170 175

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

180 185 190

Thr Asp Asn Gly Ser Trp Thr Val Phe Val Asn Ala Glu Asp Gly Ser

195 200 205

Ile Val Asn Lys Phe Asn Asn Thr Pro Thr Leu Ile Asp Thr Lys Asp

210 215 220

Gln Lys Leu Pro Asn Ala Lys Lys Ile Lys Asp Glu Ala Lys Lys Ala

225 230 235 240

Ser Asn Ala Asn Asn Val Ile Asp Val Gln Gly Gln Ser Val Lys Gly

245 250 255

Val Gly Lys Thr Ser Leu Asp Gly Leu Val Asn Ile Asp Val Thr Tyr

260 265 270

Gly Asn Gly Lys Tyr Tyr Leu Lys Asp Ser Asn Lys Asn Ile Tyr Leu

275 280 285

Tyr Asp Leu Lys Asn Gln Val Asp Glu Tyr Asp Leu Tyr Asn Tyr Leu

290 295 300

Ser Arg Pro Asn Tyr Lys Gln Ile Leu Met Ser Lys Ser Glu Leu Ile

305 310 315 320

Ser Asn Tyr Asn Asn Asn Phe Ile Ala Asn Asn Gln Val Asn Ser Val

325	330	335	
Asp Ala Tyr Val Asn Thr Asn Lys Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Lys			
340	345	350	
Leu Asn Arg Asn Ser Ile Asp Asn Lys Gly Met Asn Ile Asn Gly Phe			
355	360	365	
Val His Val Gly Arg Asn Tyr Gly Asn Ala Phe Trp Tyr Gly Pro Tyr			
370	375	380	
Asp Gly Met Phe Phe Gly Asp Gly Asp Gly Ile Tyr Phe Ser Ser Leu			
385			
390	395	400	
Ala Lys Ser Leu Asp Val Val Gly His Glu Leu Ser His Gly Val Thr			
405	410	415	
Asn Lys Glu Ser Asn Leu Lys Tyr Glu Asn Glu Ser Gly Ala Leu Asn			
420	425	430	
Glu Ser Phe Ser Asp Ile Met Gly Val Ala Val Glu Gly Lys Asn Phe			
435	440	445	
Val Leu Gly Glu Asp Cys Trp Val Ala Gly Gly Val Met Arg Asp Met			
450			
455	460		
Glu Asn Pro Ser Arg Gly Gly Gln Pro Ala His Met Lys Asp Tyr Lys			
465	470	475	480
Tyr Lys Thr Met Asn Asp Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser Gly			
485	490	495	
Ile Ile Asn His Ala Ala Tyr Leu Val Ala Asp Gly Ile Glu Lys Thr			
500	505	510	
Gly Ala Lys Asn Ser Lys Asp Ile Met Gly Lys Ile Phe Tyr Thr Ala			
515			
520	525		
Asn Cys Tyr Lys Trp Asp Glu Thr Thr Asn Phe Ala Lys Cys Arg Asn			
530	535	540	
Asp Val Val Gln Val Thr Lys Glu Leu Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Tyr			
545	550	555	560
Val Lys Ile Val Glu Lys Ala Phe Asp Gln Val Gly Ile Thr Ala Thr			
565	570	575	
Pro Gln Leu Pro Leu			

580

<210

> 3

<211> 1296

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<400> 3

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 Asp Lys Gly Tyr Asn Lys			
435	440	445	

Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
 450 455 460
 Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
 465 470 475 480
 Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
 485 490 495
 Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro

 500 505 510
 Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
 515 520 525
 Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
 530 535 540
 Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
 545 550 555 560
 His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu

 565 570 575
 Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
 580 585 590
 Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
 595 600 605
 Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
 610 615 620
 Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala

 625 630 635 640
 Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
 645 650 655
 Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
 660 665 670
 Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
 675 680 685
 Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu

690	695	700
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys		
705	710	715
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu		
725	730	735
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn		
740	745	750
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp		
755	760	765
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile		
770	775	780
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met		
785	790	795
Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys		
805	810	815
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly		
820	825	830
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp		
835	840	845
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser		
850	855	860
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn		
865	870	875
Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser		
885	890	895
Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn		
900	905	910
Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu		
915	920	925
Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser		
930	935	940

Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn

945 950 955 960

Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val

965 970 975

Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu

980 985 990

Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser

995 1000 1005

Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg

1010 1015 1020

Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln

1025 1030 1035

Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile

1040 1045 1050

Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp

1055 1060 1065

Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu

1070 1075 1080

Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys

1085 1090 1095

Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met

1100 1105 1110

Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val

1115 1120 1125

Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val

1130 1135 1140

Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr

1145 1150 1155

Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile

1160 1165 1170

Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn

1175	1180	1185
Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu		
1190	1195	1200
Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser		
1205	1210	1215
Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn		
1220	1225	1230
Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly		
1235	1240	1245
Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala		
1250	1255	1260
Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu		
1265	1270	1275
Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu		
1280	1285	1290
Arg Pro Leu		
1295		
<210> 4		
<211> 25		
<212> PRT		
<213> Clostridium Botulinum		
<220><221> Loop BoNT/A1		
<222> (1)..(25)		
<400> 4		
Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly		

1	5	10	15
Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys			
20	25		
<210> 5			
<211> 25			
<212> PRT			
<213> Clostridium Botulinum			

<220><221> Loop BoNT/A2/A6

<222> (1)..(25)

<400> 5

Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly

1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys

20 25

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/A3

<222> (1)..(25)

<400> 6

Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly

1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys

20 25

<210> 7

<211> 25

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/A3

<222> (1)..(25)

<400> 7

Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly

1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Tyr Leu Cys

20 25

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/A4

<222> (1)..(25)

<400> 8

Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly

1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Glu Leu Cys

20 25

<210> 9

<211> 25

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/A5

<222> (1)..(25)

<400> 9

Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly

1 5 10 15

Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys

20 25

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/A7

<222> (1)..(25)

<400> 10

Trp Val Arg Gly Ile Ile Pro Phe Lys Pro Lys Ser Leu Asp Glu Gly

1 5 10 15

Ser Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys

20 25

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/B1/B4bv/B6

<222> (1)..(10)

<400> 11

Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/B2/B3

<222> (1)..(10)

<400> 12

Cys Lys Ser Val Arg Ala Pro Gly Ile Cys

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213>

> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/B5np

<222> (1)..(10)

<400> 13

Cys Lys Ser Val Lys Val Pro Gly Ile Cys

1 5 10

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/C/CD

<222> (1)..(17)

<400> 14

Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Lys Thr Leu Asp

1 5 10 15

Cys

<210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/D
 <222> (1)..(14)
 <400> 15
 Cys Leu Arg Leu Thr Lys Asn Ser Arg Asp Asp Ser Thr Cys
 1 5 10

<210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum
 <220><221> Loop BoNT/DC
 <222> (1)..(14)
 <400> 16

Cys Leu Arg Leu Thr Arg Asn Ser Arg Asp Asp Ser Thr Cys
 1 5 10

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum
 <220><221> Loop BoNT/E1-E5

<222> (1)..(15)
 <400> 17
 Cys Lys Asn Ile Val Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys

1 5 10 15
 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Clostridium Botulinum
 <220><221> Loop BoNT/E6
 <222> (1)..(15)

<400> 18

Cys Lys Asn Ile Val Phe Ser Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys

1 5 10 15

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/F1/F6

<222> (1)..(17)

<400> 19

Cys Lys Ser Val Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu

1 5 10 15

Cys

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/F2/F3

<222> (1)..(17)

<400> 20

Cys Lys Ser Ile Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Gln Ser Pro Ser Leu

1 5 10 15

Cys

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/F4

<222> (1)..(17)

<400> 21

Cys Lys Ser Ile Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu

1 5 10 15

Cys

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/F5

<222> (1)..(15)

<400> 22

Cys Leu Asn Ser Ser Phe Lys Lys Asn Thr Lys Lys Pro Leu Cys

1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/F7

<222> (1)..(15)

<400> 23

Cys Lys Ser Ile Val Ser Lys Lys Gly Thr Lys Asn Ser Leu Cys

1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Clostridium Botulinum

<220><221> Loop BoNT/G

<222> (1)..(15)

<400> 24

Cys Lys Pro Val Met Tyr Lys Asn Thr Gly Lys Ser Glu Gln Cys

1 5 10 15

<210> 25

<211> 29

<212> PRT

<213> Clostridium Tetani

<220> Loop TeNT

<222> (1)..(29)

<400> 25

Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile Arg Glu Asn Leu Tyr Asn

1 5 10 15

Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly Glu Leu Cys

20 25

<210> 26

<211> 1005

<212> DNA

<213> C. Botulinum

<400> 26

atggttcaag gtcaaagcgt taaaggagta ggaaaaacta gcttggatgg actagtaaat	60
attgatgtaa ctatggaaa tggaaaatac tatttaaaag atagcaacaa aaatatttat	120
ctatatgact taaaaatca agttgtatgaa tatgtatctt acaattatct tagtagacct	180

aactataaac aaatattaat gagcaaatct gaattaatct ctaattacaa taataatttt	240
atagccaaca atcaggttaa ttctgttagat gctttagttaa acacaatataa aacctatgtat	300
tattataaaa acaaattaaa tagaaacagt attgataata agggatgaa tattatggg	360
tttggtcatg taggtagaaa ttatggtaat gcttttggt acggccata ttagggatg	420
ttctttggcg atggcgacgg aataacttc tcttcctt caaaatctt agatgttgc	480
ggccacgaat taagtcatgg tgtaacaaat aaagagtcta atcttaata tgaaaatgaa	540
tctggtgcct taaaatgaatc ttctcagat attatggag tagctgttgc gggtaaaaac	600

tttgtactag gtgaagattt ctgggttgc ggaggagtaa tgagagatat ggaaaatcca	660
tccagaggag gccaaccgc tcataatgaaa gattataat acaaaactat gaatgacgat	720
aacggtggtg ttcatacaaa ttcatgtata ataaaccatg ctgttattt agttgcagat	780
ggaatagaaa aaactggtgc aaaaaatagt aaagatatta tggaaaaat attctataca	840
gctaatttgc ataaatggta taaaacaaca aattttgcata agtgcagaaaa ttagtgc	900
caagttacta aagaacttta tggcgaaaat agcaactatg taaaattgt tgaaaagct	960
tttggaccaag ttggataaac tgctacaccc caattaccat tataa	1005

<210> 27

<211> 1746

<212> DNA

<213> Clostridium Botulinum

<400> 27

atgaaaagta aaaaattatt agctacagtg ctaagtgccg tgatcactt ttctactgtt	60
tctgcagtt atgctgcgcc tgttagaaaa gaaagtaaag ttgaaccaa aactacaaca	120
ataacttggg aaaaaaatga acaaaatact aaaaaagctg ctactgatat aactgaaaag	180
aaattnaaca attctgagga gataactaa ttcttgaaa aaaatatac taaatttgtt	240
gtacaaaaag gttctcttaa aaacaccaag actgtaaaag acgaaaaagg taaaactaac	300
tatcatatga tttatgaagt agaaggtata cctgtatact atggaagaat tgttttaca	360

actgaaaaag actcctccat ggattctata aacggtagaa ttgatactgt ttttgaaaat	420
gggaatttga aaaacaaaat caaactatca aaagaagatg ctatagcaaa agctaaaaat	480
gatattaaag atgaaaaagc aactagtaaa aagaccgatt tatactgtta taattttgag	540
ggccaaacctt atgttagttt ttttagtagat ctaattacag acaacgggag ttggacggtt	600
ttcgtaatg ctgaggatgg ttctatagta aataaattta ataatactcc tactttatt	660
gatactaaag atcaaaaattt acccaatgct aaaaaaaattt aagatgaagc taaaaaaagct	720
agtaatgcaaaataatgtat ttagtttcaa ggtcaaaagcg ttaaaggagt agggaaaaact	780

agcttggatg gactagtaaa tattgatgta acttatggaa atggaaaata ctatttaaa	840
gatagcaaca aaaatattt tctatatgac taaaaaaatc aagttgatga atatgatcta	900
tacaattatc ttagtagacc taactataaa caaatattaa tgagcaaatc tgaattaata	960
tctaattaca ataataattt tatagccaac aatcaggta attctgtaga tgcttatgta	1020
aacacaaata aaacctatga ttattataaa aacaattaa atagaaaacag tattgataat	1080
aagggtatga atattaatgg gtttgtcat gtaggttagaa attatggtaa tgcttttgg	1140
tacggtccat atgatggat gttttggc gatggcgacg gaatatactt ctctccctt	1200

gcaaaatct tagatgttgt aggccacgaa ttaagtcatg gtgtAACAAA taaAGAGTCT	1260
aatcttaaat atgaaaatga atctgggcc ctaaatgaat ctttctcaga tattatggaa	1320
gtagctgtg agggtaaaaa ctgtacta ggtgaagatt gctgggtgc tggaggaga	1380
atgagagata tggaaaatcc atccagagga ggccaaccag ctcatatgaa agattataaa	1440
tacaaaacta tgaatgacga taacgggtgt gttcatacaa attcaggtat aataaaccat	1500
gctgcttatt tagttgcaga tggaaatagaa aaaactggtg caaaaaatag taaagatatt	1560
atggggaaaaa tattctatac agctaattgc tataaatggg atgaaacaac aaattttgtc	1620

aagtgcagaa atgatgtagt ccaagttact aaagaacctt atggcgaaaa tagcaactat 1680

gtaaaaattt	ttgaaaaagc	tttgaccaa	gttggataa	ctgctacacc	tcaattacca	1740
ttataa						1746