



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0072008
(43) 공개일자 2020년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) C07K 16/12 (2006.01)
C12N 5/0793 (2010.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5058 (2013.01)
C07K 16/1282 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0159701
(22) 출원일자 2018년12월12일
심사청구일자 2018년12월12일

(71) 출원인
주식회사 에이비바이오
서울시 관악구 관악로 1, 105동 309호(신림동, 서울대학교 유전공학연구소 창업보육센터)
(72) 발명자
이치건
경기도 용인시 수지구 동천로135번길 21, 1313동 1602호 (동천동, 한빛마을래미안이스트팰리스3단지)
엄지현
경기도 성남시 분당구 궁내로40번길 36, 104동 301호 (궁내동, 하나홈타운)
(74) 대리인
이재영

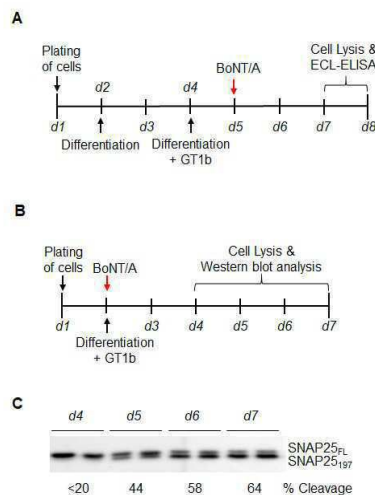
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 세포 기반 방법

(57) 요약

본 발명은 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 방법에 관한 것이다. 현재 보툴리눔 독소 역가 측정 분야에서는 마우스 LD50 생물검정(mLD50)을 대체하기 위한 세포 기반 역가 분석법(CBPA)의 개발 필요성이 요구되고 있다. 본 발명은 N2-42F 세포, 및 SNAP25에 대한 결합 친화력과 특이성이 현저하게 높은 단일 클론 항체를 이용한 최적의 CBPA 분석법에 관한 것으로, 보툴리눔 독소 0.5 U 이하의 역가를 측정하는 것이 가능하다. 본 발명의 세포 및 항체를 이용한 CBPA 분석법은 신뢰성 및 재현성이 높은 보툴리눔 독소의 세포 기반 역가 분석법이 될 것으로 기대된다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12N 5/0619 (2013.01)

G01N 33/53 (2018.05)

G01N 33/68 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C12N 2500/30 (2013.01)

C12N 2500/32 (2013.01)

G01N 2333/33 (2013.01)

(72) 발명자

아제이비제야쿠마

서울시 관악구 신림로 12길 30-8, 209호

계향애

경기도 수원시 영통구 도청로 10, B동 1432호

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) Neuro-2a 기원의 신경세포를 배양하는 단계;
- (b) 상기 신경세포에 신경 독소를 처리하는 단계;
- (c) 상기 신경세포, 또는 신경세포로부터 얻어진 시료에 SNAP25_{FL} 및 SNAP25₁₉₇에 특이적으로 결합하는 항체를 처리하는 단계; 및
- (d) 상기 (c)에 SNAP25_{FL}에는 결합하지 않고, SNAP25₁₉₇에만 특이적으로 결합하는 항체를 처리하는 단계;를 포함하는, 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 Neuro-2a 기원의 세포주는 N2-42F(수탁번호: KCTC 13712BP) 세포주인 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 신경 독소는 보툴리눔 독소인 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 (b)단계의 신경 독소는 GT1b(Ganglioside GT1b trisodium salt)가 포함된 배지로 희석하여 처리하는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 (c)단계의 항체는,

중쇄 CDR1 영역이 서열번호 55, 또는 56으로 구성되고,

중쇄 CDR2 영역은 서열번호 57, 또는 58로 구성되며,

중쇄 CDR3 영역은 서열번호 59, 또는 60으로 구성되며,

경쇄 CDR1 영역은 서열번호 61, 또는 62로 구성되며,

경쇄 CDR2 영역은 서열번호 63, 또는 64로 구성되며,

경쇄 CDR3 영역은 서열번호 65, 또는 66으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 55, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 57, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 59, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 61, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 63, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 65로 구성되는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 56, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 58, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 60, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 62, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 64, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 66으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 (d)단계의 항체는,

중쇄 CDR1 영역이 서열번호 28 내지 33으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되고,

중쇄 CDR2 영역은 서열번호 34 내지 39로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되며,

중쇄 CDR3 영역은 서열번호 40 내지 46으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되며,

경쇄 CDR1 영역은 서열번호 47 내지 49로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되며,

경쇄 CDR2 영역은 서열번호 50 내지 51로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되며,

경쇄 CDR3 영역은 서열번호 52 내지 54로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 28, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 34, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 40, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 47, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 52로 구성되는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 29, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 35, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 41, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 48, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 52로 구성되는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 11

제 8항에 있어서,

상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 29, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 36, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 42, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 47, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 52로 구성되는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 12

제 8항에 있어서,

상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 33, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 35, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 43, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 48, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 52로 구성되는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 13

제 8항에 있어서,

상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 30, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 37, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 44, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 48, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 52로 구성되는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 14

제 8항에 있어서,

상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 31, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 38, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 45, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 47, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 53으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 15

제 8항에 있어서,

상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 32, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 39, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 46, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 49, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 51, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 54로 구성되는 것을 특징으로 하는, 역가 분석 방법.

청구항 16

GT1b(Ganglioside GT1b trisodium salt)를 포함하는, 신경세포에 대한 신경 독소 처리용 세포 배양액.

청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 배양액 내의 GT1b 농도는 30 내지 70 mg/ml인 것을 특징으로 하는, 세포 배양액.

청구항 18

제 16항에 있어서,

상기 배양액은 크레아틴, 및 아르기닌을 추가로 포함하는, 세포 배양액.

청구항 19

제 18항에 있어서,

상기 배양액 내의 크레아틴 농도는 0.1 내지 10 mM이고, 아르기닌 농도는 0.5 내지 50 mM인 것을 특징으로 하는, 세포 배양액.

청구항 20

제 16항에 있어서,

상기 배양액은 RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute 1640) 배지인 것을 특징으로 하는, 세포 배양액.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경세포주를 사용하여 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 현재 마우스 LD50 생물검정(mLD50)은 식품, 임상, 또는 환경 시료에 존재하는 보툴리눔 독소(BoNT)의 검출을 위해 일반적으로 인정되는 방법이다. 특히, 제약 분야에서는 미학적 또는 의학적 용도로 사용되는 보툴리눔 독소의 역가를 측정하기 위한 표준 분석법으로 mLD50을 이용한다. 그러나 mLD50을 이용한 보툴리눔 독소의 역가 측정은 시험자, 시험 기관, 및 시설 등에 영향을 많이 받으므로, 보툴리눔 독소의 생물학적 효능을 정확하고 재현적으로 정량화하기에 어려움이 있는 실정이다. 이에, 실험에 사용되는 동물의 수와 고통을 최소화하고 보툴리눔 독소 역가 측정법을 표준화하고자, mLD50 대안 측정법의 개발을 장려하기 위해 ZEBET 회의가 개최되었다(Altern Lab Anim. 2010 Aug;38(4):315-30). 다양한 국가에서 많은 연구소와 산업체가 특이성, 민감성, 및 재현성 측면에서 mLD50을 대체하기에 만족할만한 세포 기반 역가 분석법(CBPAs), 또는 세포 기반 생물 검정법(CBB)을 개발하고자 다양한 연구에 착수하였다. 성공적인 CBPA 또는 CBB의 구축을 위해 고려되는 사항은 ① SNAP25₁₉₇에 특이적인 단일 클론, 또는 다클론 항체 항체, 및 ② 저농도(~pM)의 보툴리눔 독소에 높은 민감성을 나타내는 신경 세포주를 획득하는 것이다. 2004년 초 Chapman 박사와 그의 동료들은 두 개의 형광 단백질과 융합된 보툴리눔 독소를 이용하는 형광 리포터 분석을 발명하였고(Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Oct 12;101(41):14701-6), BoCell™ 분석법으로 명명하여 상업화하였다(BioSentinel Inc). 그러나 BoCell™ 분석이 98웰 배양 접시에서 배양되는 동물 세포로 보툴리눔 독소의 엔도펩티다아제 활성을 검출 할 수 있는 최초의 분석법이라는 의의에도 불구하고, 마우스를 이용한 분석보다 2-3배 민감도가 떨어지는 문제점이 있었다(Appl Environ Microbiol vol. 78,21 (2012): 7687-97).

[0004] 상기 기술한 바와 같이 mLD50을 대체하기 위한 CBPA를 개발하고자 전 세계적인 노력이 지속되고 있으므로, 궁극적으로 동물을 이용한 분석법은 중단될 것으로 보인다. 효과적인 CPBA 개발을 위해 해결해야 할 과제들이 남아 있으나, 효과적인 CBPA 개발은 다양한 보툴리눔 독소 제품의 활용성 확장을 용이하게 하고, 품질 관리 수준을 향상시키며, 소비자에게 보다 높은 수준의 신뢰를 제공하므로써 보툴리눔 독소 제품의 경쟁력을 고취시킬 것이다.

[0005] 따라서 본 발명자들은 종래의 CPBA가 가진 한계점을 극복하고자 각고의 노력을 기울인 결과, 본 발명을 완성하였다. 본 발명은 N2-42F 세포, 및 SNAP25에 대한 결합 친화력과 특이성이 현저하게 높은 단일 클론 항체를 이용한 최적의 CBPA 분석법에 관한 것으로, 보툴리눔 독소 0.5 U 이하의 역가를 측정하는 것이 가능하다. 본 발명의 세포 및 항체를 이용한 CBPA 분석법은 신뢰성 및 재현성이 높은 보툴리눔 독소의 세포 기반 역가 분석법이 될

것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 세포 기반 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0013] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0015] Botox® 제조업체인 Allergan사는 SNAP25₁₉₇에 특이적인 단일 클론 항체를 생산하는 세포주와 보툴리눔 독소에 매우 민감한 신경세포주를 기존에 알려져 있던 숙주 세포인 인간 신경종 세포주 SiMa(human neuroblastoma SiMa)로부터 성공적으로 구축하였다(PLoS One. 2012;7(11):e49516). 상기 항체와 세포로 Allergan사는 새로운 CBPA 분석법을 개발하여 mLD50을 대체 가능한 첫번째 CBPA로 2010년 FDA로부터 승인받았다(US8455213B2, 및 US2010/0204559A1). 또 다른 보툴리눔 독소 제조업체인 독일 MERZ사는 2014년에 CBA-ELISA를 개발하였고(WO2014/207109A1), 2015년 FDA 승인을 획득하였다. CBA-ELISA는 차별화된 신경 세포 고정법(in-situ)을 사용하고, 세포막을 침투하여 내인성 SNAP25을 면역학적으로 검출한다. Allergan사의 CBPA와 MERZ사의 CBA-ELISA는 마우스 바이오 분석법과 동등하게 피코몰 이하 농도(i.e. <1.0 U/well)의 EC50 수치를 보일 만큼 탁월한 감도를 나타낸다. Allergan사와 MERZ사의 기술은 일반적인 상업용 토끼 다클론 항체 항체(Sigma S9684)를 사용하여 최적 조건에서 SNAP25를 검출한다. 세포의 경우, Allergan사의 CBPA에서는 분화된 인간 신경종 세포주 SiMa를 독점적으로 사용하고, MERZ사의 CBA-ELISA는 인간의 분화된 유도다능성 줄기세포(iPS)를 표준화되고 최적화된 숙주 세포로 사용한다. SiMa는 매우 천천히 증식하여 일반적으로 세포수가 2배가 되는데 필요한 시간(population doubling time; PDT)이 70시간 이상이고, iPS 생성 또한 매우 시간 소모적이고, 저장은 더욱 어렵다. 따라서, 보툴리눔 독소에 매우 민감하면서도 PDT가 짧고, 쉽게 보관될 수 있는 CBPA용 신경 세포주 개발의 필요성이 제기되었다. 더하여 위스콘신 대학 David Beebe 박사의 연구 그룹은 SiMa가 운동신경과 유사한 특징을 보이지 않기 때문에 CBPA용 세포로서 SiMa의 적합성에 문제가 있다고 지적하였고(J Biomol Screen. 2016 Jan;21(1):65-73), 7.9 pM 이하 농도의 EC50 수치를 보이는 운동신경 유사 세포주 NG108-15 을 숙주세포로 사용하는 대체 CBPA를 개발하였다. 그러나 상기 개발된 CBPA들은 웨스턴 블랏팅 분석법을 이용하여 SNAP25₁₉₇ 및 SNAP25_{FL}의 내인성 수준을 결정하므로, 고 처리량 분석(high-throughput assay) 시에는 이용이 어려운 실정이다.

[0017] 본 발명의 일 구체예에서 “보툴리눔 독소(Botulinum Toxin)”란, 클로스트리디움 보툴리눔 세균이 만드는 신경독 단백질이다. 클로스트리디움 속은 127 종 이상이며, 형태 및 기능에 따라 구분된다. 혐기성, 그람 양성 박테리아 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)은 사람 및 동물에서 보툴리즘이라는 신경마비 질환을 일으키는, 강력한 폴리펩티드 신경독인, 보툴리눔 독을 생산한다. 클로스트리디움 보툴리눔의 포자는 토양에서 발견되며, 제대로 살균되지 않고 밀봉된, 집에서 통조림된 식품 용기에서 배양될 수 있어, 이러한 것들이 많은 보툴리즘의 원인이 된다. 보툴리즘 증상은 전형적으로 클로스트리디움 보툴리눔 배양물 또는 포자에 감염된 음식을 먹은 후 18 내지 36 시간이 지나서 나타난다. 보툴리눔 독소는 독성이 감소되지 않은 채로 장 내막을 통과할 수 있는 것으로 보이며 콜린성 운동 뉴런에 대해 높은 친화도를 나타낸다. 보툴리눔 독소 중독의 증상은, 보행 장애, 연하장애 및 언어장애, 호흡근육의 마비 및 죽음으로 증상이 진행될 수 있다. 보툴리눔 독소는 활동항진성 골격근을 특징으로 하는 신경근육 장애(즉, 운동 장애)의 치료를 위해 임상에서 사용되고 있다. 1989년에, 보툴리눔 독소 타입 A 컴플렉스는 미국 식품의약청에 의해서, 본태성 안검경련, 사시 및 반측안면 경련의 치료에 사용되는 것이 승인되었다. 이어서, 보툴리눔 독소 타입 A는 또한 FDA로부터 경부 디스토니아의 처치 및 미간 주름의 처치에 대해 승인되었고, 보툴리눔 독소 타입 B도 경부 디스토니아의 처치에 대하여 승인되었다. 독소 타입 A 이외의 보툴리눔 세로타입들은 보툴리눔 독소 타입 A와 비교할 때, 활성에 있어서 더 낮은 효력 및/또는 더 짧은 지속시간을 가지는 것으로 보인다. 말초 근육내 주사된 보툴리눔 독소 타입 A의 임상 효과는 보통 주사 후 일주일 이내에 나타난다. 일회 보툴리눔 독소 타입 A의 근육 내 주사에 의한 증상 구제의 전형적인 지속시간은 평균 약 3 개월이나, 상당히 더 긴 기간 동안의 치료 활성이 보고되었다. 모든 보툴리눔 독소 세로타입이 신경근육 접합부에서 신경전달물질 아세틸콜린의 방출을 억제하는 것으로 보인다 하더라도, 이들은 상이한 신경분비성 단백질에서 작용하며, 이 단백질을 상이한 부위에서 절단한다. 예를 들어, 보툴리눔 타입 A 및 E는 모두 25 kDa 시냅소솜 관련 단백질(SNAP25)을 절단하지만, 이 단백질의 상이한 아미노산 서열을 표적으로 한다. 보툴리눔 독소 타입 B, D, F 및 G는 소포 관련 단백질(VAMP, 소위 시냅소브레빈)에 작용하며, 각각의 세로타입은 이 단백질의 상이한 부위를 절단한다. 마지막으로, 보툴리눔 독소 타입 C1은 선택신 및 SNAP25를 모두 절단하는 것으로 보인다. 이러한 작용 메카니즘의 상이성은 여러 보툴리눔 독소 세로타입들의 작용에 의한 상대적인 효력 및/또는 지속시간에 영향을 미칠 것이다. 특히, 보툴리눔 독소의 기질을 여러 상이한 세포 타입에서 발견할 수 있다. 또한 in vitro 연구에서, 보툴리눔 독소가 뇌간 조직의 일차 세포 배양물로부터 아세틸콜린 및 노르에피네프린의 칼륨 양이온 유도 방출을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 보툴리눔 독소는 척수 뉴런의 일차 배양물에서 글리신 및 글루타메이트의 유발 방출을 억제하며, 뇌 시냅소솜 표본에서 신경전달물질 아세틸콜린, 도파민, 노르에피네프린, CGRP, 물질 P(Substance P) 및 글루타메이트 각각의 방출을 억제하는 것으로 보고되었다. 따라서, 적당한 농도로 사용하는 경우, 보툴리눔 독소에 의해서 대부분의 신경전달물질의 자극-유발 방출이 억제된다.

[0019] 본 발명의 일 구체예에서 “독소의 활성”이란, 표준 검정 방식인 마우스 LD50 생물검정(mLD50)으로 측정하였을 때, 1 U(1 unit)의 보툴리눔 독소가 18-20 g 중량 쥐의 50% 치사율을 나타내는 것으로, 보툴리눔 독소가 갖는 고유의 역가(potency)를 의미한다. 상기 보툴리눔 독소, 특히 보툴리눔 독소 세로타입 A는 사람에게 알려진 가장 치명적인 천연 생물학체로서, 디프테리아보다 18억배, 시안화 나트륨보다 6억배, 코브라 독(cobra toxin)보다 3천만배, 그리고, 콜레라보다 1천2백만배 더 치명적이므로, 보툴리눔 독소에서 약 20%의 역가 차이는 디프테리아 3.6억배, 또는 콜레라 240만배와 같은 현저한 효과 차이를 야기한다.

[0020] 의학 또는 미용 목적의 보툴리눔 독소 제제는 통상적으로 동결 건조, 또는 액상 제형으로 유통되는데, 보툴리눔 독소 자체가 단백질이므로 온도, pH, 빛, 물리적 충격, 또는 gas(공기, 질소, 산소 등)에 의해 활성이 매우 불안정한 문제점이 있다. 이와 같이 보툴리눔 독소의 역가가 감소되는 경우에는 보툴리눔 독소에 의한 기대 효과를 나타내기 어려우므로, 제조단계, 또는 사용단계에서 보툴리눔 독소의 역가를 정확하게 예측하는 것이 반드시 필요하다.

[0022] 본 발명의 일 구체예에서 “항체(antibody)”란, 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 SNAP25 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 통상적인 방법으로 제조될 수 있다. 본 발명의 항체는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 보다 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 다클론 항체 항체, 단일 클론 항체, 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든

면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 본 발명의 항체는 경쇄(Light chain) 및 중쇄(Heavy chain)를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂, 및 Fv 등이 있다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에서 “키트(kit)”란, 특정한 목적을 위해 필요한 조성물 및 부속품들을 모아놓은 세트를 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 키트는 보툴리눔 독소의 활성을 측정하기 위해서 SNAP25_{FL} 또는 SNAP25₁₉₇에 특이적으로 결합하는 항체가 포함하거나, 상기 항체가 포함된 조성물이 포함하거나, 또는 상기 항체가 코팅된 세포 배양용 접시가 포함될 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 구체예에서, (a) Neuro-2a 기원의 신경세포를 배양하는 단계; (b) 상기 신경세포에 신경 독소를 처리하는 단계; (c) 상기 신경세포, 또는 신경세포로부터 얻어진 시료에 SNAP25_{FL} 및 SNAP25₁₉₇에 특이적으로 결합하는 항체를 처리하는 단계; 및 (d) 상기 (c)에 SNAP25_{FL}에는 결합하지 않고, SNAP25₁₉₇에만 특이적으로 결합하는 항체를 처리하는 단계;를 포함하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하고, 상기 Neuro-2a 기원의 세포주는 N2-42F(수탁번호: KCTC 13712BP) 세포주인 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하며, 상기 신경 독소는 보툴리눔 독소인 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하며, 상기 (b)단계의 신경 독소는 GT1b(Ganglioside GT1b trisodium salt)가 포함된 배지로 희석하여 처리하는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공한다.

[0028] 상기 (c)단계의 항체는, 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 55, 또는 56으로 구성되고, 중쇄 CDR2 영역은 서열번호 57, 또는 58로 구성되며, 중쇄 CDR3 영역은 서열번호 59, 또는 60으로 구성되며, 경쇄 CDR1 영역은 서열번호 61, 또는 62로 구성되며, 경쇄 CDR2 영역은 서열번호 63, 또는 64로 구성되며, 경쇄 CDR3 영역은 서열번호 65, 또는 66으로 구성되는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하고, 보다 구체적으로, 상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 55, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 57, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 59, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 61, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 63, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 65로 구성되는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하며, 상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 56, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 58, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 60, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 62, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 64, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 66으로 구성되는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공한다.

[0030] 또한 상기 (d)단계의 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 28 내지 33으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되고, 중쇄 CDR2 영역은 서열번호 34 내지 39로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되며, 중쇄 CDR3 영역은 서열번호 40 내지 46으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되며, 경쇄 CDR1 영역은 서열번호 47 내지 49로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되며, 경쇄 CDR2 영역은 서열번호 50 내지 51로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되며, 경쇄 CDR3 영역은 서열번호 52 내지 54로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나로 구성되는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하고, 보다 구체적으로, 상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 28, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 34, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 40, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 47, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 52로 구성되는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하며, 상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 29, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 35, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 41, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 48, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 52로 구성되는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하며, 상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 29, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 36, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 42, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 47, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 52로 구성되는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하며, 상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 33, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 35, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 43, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 48, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄

CDR3 영역이 서열번호 52로 구성되는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하며, 상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 30, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 37, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 44, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 48, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 52로 구성되는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하며, 상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 31, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 38, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 45, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 47, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 50, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 53으로 구성되는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공하며, 상기 항체는 중쇄 CDR1 영역이 서열번호 32, 중쇄 CDR2 영역이 서열번호 39, 중쇄 CDR3 영역이 서열번호 46, 경쇄 CDR1 영역이 서열번호 49, 경쇄 CDR2 영역이 서열번호 51, 및 경쇄 CDR3 영역이 서열번호 54로 구성되는 것을 특징으로 하는 신경 독소의 세포 기반 역가 분석 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명의 다른 구체예에서, GT1b(Ganglioside GT1b trisodium salt)를 포함하는 신경세포에 대한 신경 독소 처리용 세포 배양액을 제공하고, 상기 배양액 내의 GT1b 농도는 25 내지 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 것을 특징으로 하는 신경세포에 대한 신경 독소 처리용 세포 배양액을 제공하며, 상기 배양액은 크레아틴, 및 아르기닌을 추가로 포함하는 신경세포에 대한 신경 독소 처리용 세포 배양액을 제공하며, 상기 배양액 내의 크레아틴 농도는 0.1 내지 10 mM 이고, 아르기닌 농도는 0.5 내지 50 mM인 것을 특징으로 하는 신경세포에 대한 신경 독소 처리용 세포 배양액을 제공하며, 상기 배양액은 RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute 1640) 배지인 것을 특징으로 하는 신경세포에 대한 신경 독소 처리용 세포 배양액을 제공한다.

[0034] 이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

발명의 효과

[0036] 최근 의료 및 미용 목적에서의 보툴리눔 독소 수요가 급격히 증가하고 있으나, 보툴리눔 독소의 역가 측정에 사용할 수 있는 안정성과 재현성이 높은 세포 기반 역가 분석법이 부재한 실정이다. 보툴리눔 독소는 매우 강력한 신경독 단백질이므로, 무엇보다 재현성 높은 정밀한 세포 기반 역가 측정 방법의 개발이 요구된다.

[0037] 본 발명은 N2-42F 세포, 및 SNAP25에 대한 결합 친화력과 특이성이 현저하게 높은 단일 클론 항체를 이용한 최적의 CBPA 분석법에 관한 것으로, 보툴리눔 독소 0.5 U 이하의 역가를 측정하는 것이 가능하다. 본 발명의 세포 및 항체를 이용한 CBPA 분석법은 신뢰성 및 재현성이 높은 보툴리눔 독소의 세포 기반 역가 분석법이 될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 신경 세포에서 보툴리눔 독소 A(BoNT/A)에 대한 민감도를 측정한 웨스턴 블랏팅 분석 결과를 나타낸 것으로, 레인 M은 단백질 사이즈 마커이며, 레인 1은 BoNT/A 독소화하지 않은 전체 세포 용해물, 레인 2는 BoNT/A 독소화한 전체 세포 용해물의 SNAP25 단백질의 발현 정도를 나타낸 것이다. 또한, N2a는 Neuro-2a 세포를 나타낸 것이고, K-BM1은 KP-N-RT-BM-1 세포를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 3 단계의 클론 선택 과정에서 확인된 SNAP25의 절단 정도를 웨스턴 블랏팅 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것으로, 2 단계의 클론 선택 과정(2nd clonal selection)에서 42번 클론을 포함하는 6개의 클론 중 유의미하게 BoNT/A에 의한 SNAP25의 절단 현상을 나타낸 42번 클론만을 선택하였고, 3 단계의 클론 선택 과정(3rd clonal selection)에서 24번 클론(42F)은 복수의 동일한 실험에서 일관되게 BoNT/A에 의한 SNAP25의 절단 현상을 나타낸다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, SiMa 및 N2-42F 세포에 다양한 농도의 BoNT/A를 처리하였을 때 나타나는 SNAP25의 절단 정도를 웨스턴 블랏팅 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 클론 선택 과정을 통해 얻어진 N2-42F의 계통 안정성을 웨스턴 블랏팅 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명에서 제조한 단일 클론 항체의 항원 결합 특이성을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 방법에서 독소화 시간을 최적화한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 방법에서 독소화 배지를 최적화한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 방법에서 증감제를 최적화한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른, 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 방법에서 GT1b를 최적화한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른, 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 방법에서 N2/B27을 최적화한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른, 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 방법에서 포획 항체 처리에 대한 최적화 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른, 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 방법에서 검출 항체 처리에 대한 최적화 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른, 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 방법에서 HRP 접합체의 활성 검출 방법에 대한 최적화 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 샌드위치 ELISA 방법의 모식도이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른, 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 샌드위치 ELISA 방법의 정확성과 선형성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른, 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 샌드위치 ELISA 방법의 생체 역가 측정 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0042] 실시예 1. BoNT/A에 민감한 신경 세포의 제조

[0043] 실시예 1-1. BoNT/A에 민감한 세포 스크리닝

[0044] 신경세포 Neuro-2a, SiMa 및 KP-N-RT-BM-1 세포들을 각각 24웰 플레이트에 분주하였다. 그런 다음, BoNT/A에 대한 SNAP25 단백질의 절단(cleavage) 현상을 웨스턴 블랏팅 분석을 통해 확인하여, Neuro-2a(N2a), SiMa 및 K-BM1(KP-N-RT-BM-1) 세포는 BoNT/A에 의해 SNAP25가 각각 33%, 66%, 및 29% 절단되는 것을 확인하였다. 상기 결과를 도 1에 나타내었다.

[0045] 상기 결과를 기반으로 Neuro-2a는 클론 선택(clonal selection)을 위해 다음과 같은 이유로 계속하여 사용되었다. 첫째, 통상적으로 쥐의 치사율(즉, mLD50)에 의해 측정되는 BoNT/A의 생체 내 효능은 쥐의 세포에서 더욱 잘 나타낼 수 있다. 둘째, Neuro-2a는 쥐의 세포이지만, KP-N-RT-BM-1은 인간 세포이며, Neuro-2a와 비교하여 KP-N-RT-BM-1은 현저하게 느린 속도로 자란다. 인간 신경 모세포종 세포인 SiMa 세포는 34~100 시간의 분열시간(doubling time)을 갖는다. 셋째, 현미경으로 관찰된 Neuro-2a 세포의 경우, 다양한 세포 유형의 혼합된 집단으로 확인된다. 따라서, BoNT/A에 민감성이 높은 세포가 이종의 Neruo-2a 세포 집단 내에 존재할 가능성이 있을 것으로 판단하였다.

- [0047] **실시예 1-2. BoNT/A에 민감한 Neuro-2a 클론 개발**
- [0048] Neuro-2a 세포는 10%의 우태아혈청, 1x 비필수아미노산(1x non-essential amino acid; 1x NEAA), 1x 피루브산 나트륨(sodium pyruvate), 1x GlutaMAXTM 및 1x 항생제 항균제(1x antibiotic antimycotic; 1x AA)가 포함된 조건의 MEM 배양 배지에서 배양될 수 있도록 하였다.
- [0049] 세포의 밀도(confluence)가 80 내지 90% 되었을 때, 1x TrypLE(GibcoTM, 12604021, 미국)을 처리하여, 상기 세포가 단일 세포 현탁액이 되도록 하였다. 그런 다음, 트리판 블루(trypan blue) 및 헤모사이토미터(hemocytometer)를 사용하여 단일 세포의 생존 수를 측정하고, 이를 기초로 단일 세포 현탁액을 1 ml 당 10 세포 수의 밀도로 희석하였다. 그런 다음, 96웰 플레이트에 희석된 단일 세포 현탁액을 100 μ l씩 넣었다. 현미경 검사를 통해 콜로니의 성장을 주기적으로 관찰하였다. 상기 단일 세포가 60%의 밀도가 되었을 때, 상기과 동일한 방법으로 24웰 플레이트에 옮겼다. 24웰 플레이트에 옮겨진 세포 클론은 1/2로 균등하게 나누어 절반은 BoNT/A 독소화에 대한 민감성 검사를 수행하였고, 나머지 절반은 액체질소동결기에 보관하였다.
- [0050] 상기 세포 클론의 BoNT/A 독소화 검사를 위하여 총 672개의 세포 클론을 24웰 플레이트에서 7 X 96웰 마이크로 플레이트로 서브컬처(sub-cultured)하였다. 이튿날 상기 세포 클론의 배양 배지를 2 mM L-알라닌-L-글루타민, 1x B27, 1x N2 및 1x NEAA(분화 배지)가 포함된 RPMI 1640으로 교체하여 신경 분화를 유도하였다. 신경 분화를 유도한 지 4일째 되는 때에, 최종 농도가 25 μ g/ml가 되도록 GT1b(1x 비독소화 배지에 희석됨)를 상기 분화 배지에 첨가하고, 24시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 배지를 0.1 nM의 BoNT/A가 포함되어 있는 독소화 배지로 교체하고, 2일동안 추가로 배양하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1에 기재되어 있는 방식과 동일하게 웨스턴 블랏팅 분석을 수행하여 SNAP25의 절단 정도를 확인하여 1차 클론 선택 과정을 수행하였다. 이와 같은 클론 선택 과정을 3번 반복하였으며, 각 클론 선택 과정에서 확인된 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0051] 도 2에서 보는 바와 같이, 142개의 클론에 대하여 사소하게 수정되어 있는 Allergan사의 SiMa 세포에 최적화된 상기 클론 선택 과정에 따라 BoNT/A에 대한 민감도를 테스트 하였다. 그 결과, 3번의 클론 선택 과정을 통해 부모 세포인 Neuro-2a에 비하여 19개의 양성 클론에서 BoNT/A에 대한 민감도가 현저하게 높은 것으로 확인되었다. 특히, 다수의 클론 선택 과정에서 선택된 양성 클론 중에서 42번 양성 클론만이, 부모 세포인 Neuro-2a에 비하여 BoNT/A에 대한 민감도가 현저하게 높은 현상을 지속적으로 보였다. 이러한 과정을 통해 최종적으로 선택된 42번 양성 클론을 Rust and Pollok, 2011 및 Sarntivijai et al., 2008에서 권장된 명명법에 따라 N2-42F로 명명하고, 한국생명공학연구원에 수탁하였다(수탁번호: KCTC13712BP, 수탁일자: 20181113).
- [0053] **실시예 1-3. N2-42F에서 BoNT/A에 의한 SNAP25의 절단 현상 확인**
- [0054] SiMa 세포를 대조군으로 사용하여, 폴리-D-라이신이 코팅된 96웰 플레이트에 배양된 N2-42F에 다양한 농도의 BoNT/A가 포함된 1x 독소화 배지를 넣고, N2-42F의 BoNT/A 민감도를 측정하였다. 구체적으로, 상기 조건으로 N2-42F를 4일 동안 배양한 뒤, 수득한 N2-42F에 50 μ l의 1x SDS 샘플 완충액을 처리하였다. 그런 다음, BoNT/A에 대한 SNAP25 단백질의 절단(cleavage) 현상을 웨스턴 블랏팅 분석을 수행하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 이와 같은 실험 수행은 모두 3번씩 반복되었다.
- [0055] 도 3에서 보는 바와 같이, 0.93 pM 또는 그 이하의 BoNT/A에 의한 내인성(Endogenous) SNAP25의 절단은 SiMa 세포 및 N2-42F 모두에서 미비한 수준으로 확인되었다. 2.78~25 pM의 BoNT/A가 처리되었을 때 SNAP25의 절단 정도가 N2-42F에서는 25~75%로 확인되었고, SiMa 세포에서는 33~75%로 확인되었다. 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 N2-42F는 SiMa 세포만큼 BoNT/A에 민감하다는 것을 알 수 있었다.
- [0057] **실시예 1-4. N2-42F의 계통 안정성 확인**
- [0058] 세포를 기반으로 하는 분석 플랫폼으로서 사용되기 위해서 신경 세포의 계통 안정성은 매우 중요한 요소일 수 있다. 이에, N2-42F의 계통 안정성을 확인하였다.
- [0059] N2-42F는 계속해서 다수의 계대로 배양되었다. 마스터 세포 은행을 준비하기 위해서는 초기 계대의 N2-42F를 사용하였으며, 상기 클론의 안정성이 유지될 수 있도록 5계대 마다 액체질소동결기에 보관하였다. 여기서, 5계대

및 15계대에 보관된 N2-42F를 액체질소로부터 해동한 뒤, 상기 N2-42F의 밀도가 약 90%가 되는 때에 BoNT/A에 대한 민감도를 검사하여, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 이와 같은 실험 수행은 모두 3번씩 반복되었으며, 대조군으로 SiMa 세포를 사용하였다. 도 4에서 보는 바와 같이, BoNT/A에 의해 나타나는 SNAP25의 분열은 5계대의 N2-42F(N2-42F(P5))에서 63%(6번 라인), 66%(7번 라인) 및 68%(8번 라인)이고, 15계대의 N2-42F(N2-42F(P15))에서 63(6번 라인), 73%(7번 라인) 및 71%(8번 라인)인 것을 확인하였다.

[0060] 상기와 같은 결과를 통해, Allergan사에 의해 구축된 SiMa 세포의 H1 클론과 유사하게 부모 Neuro-2a로부터 얻어진 N2-42F에서 5계대 뿐만 아니라, 15계대에서도 BoNT/A에 민감도가 유지되는 것을 확인하였다. 따라서, N2-42F는 SiMa 세포의 H1 클론 다음으로 세포 기반 분석 플랫폼에 사용될 수 있는 매우 적절한 클론임을 알 수 있다.

[0062] 실시예 2. SNAP25 단일 클론 항체의 제조

[0063] 실시예 2-1. SNAP25 단일 클론 항체의 제조 및 서열 분석

[0064] 하기 표 1의 펩타이드 항원을 2마리의 토끼에게 주사하여 다클론 항체 혈청을 수득하고, 4마리의 마우스에게 주사하여 단일 클론 혈청을 수득하였다. 이로부터 ①SNAP25_{FL}, ②SNAP25₁₉₇, 또는 ③SNAP25_{FL}, 및 SNAP25₁₉₇에 결합 특이성을 가지는 상이한 3종류의 항체를 제조하고, 단일클론 항체의 서열을 분석하여 CDR 서열, 및 제조된 항체의 V_H, 및 V_L 도메인 서열을 표 2 내지 표 5에 나타내었다. CDR 서열은 ①SNAP25_{FL}에 특이적인 IgGs(표 2), ②SNAP25₁₉₇에 특이적인 IgGs(표 3), 또는 ③SNAP25_{FL}, 및 SNAP25₁₉₇에 특이적인 IgGs(표 4)로 요약되고, 제조된 항체의 V_H, 및 V_L 도메인 서열은 하기 표 5로 요약된다.

표 1

Immunogens/AA Position in SNAP25		서열번호	AA Sequence
N peptide	1-13	서열번호 1	KLH-C-MAEDADMRNELEE
	1-13	서열번호 2	MAEDADMRNELEE-C-KLH
	19-38	서열번호 3	KLH-C-DQLADESLESTRRLQLVEE
	51-70	서열번호 4	KLH-C-DEQGEQLERIEEGMDQINKD
M peptide	122-136	서열번호 5	KLH-C-DEREQMAISGGFIRR
C peptide	170-184	서열번호 6	KLH-C-EIDTQNRQIDRIMEK
	180-194	서열번호 7	KLH-C-RIMEKADSNKTRIDE
	180-197	서열번호 8	KLH-C-RIMEKADSNKTRIDEANQ
	186-197	서열번호 9	KLH-C-DSNKTRIDEANQ
	189-201	서열번호 10	KLH-C-KTRIDEANQPATK

표 2

CDR	서열번호	Sequence	Identified In
V _H CDR1	서열번호 11	GYSITSGYY	D2
	서열번호 12	GYTFTDYN	D6
	서열번호 13	GYTFTNYG	E6
V _H CDR2	서열번호 14	IRYDGSN	D2
	서열번호 15	IYPYNGDT	D6
	서열번호 16	INTYTGEF	E6
V _H CDR3	서열번호 17	ARDRDSSYYFDY	D2
	서열번호 18	VRSGDY	D6
	서열번호 19	ARGYYDY	E6
V _L CDR1	서열번호 20	DHINN	D2
	서열번호 21	QSLDSDGKTY	D6
	서열번호 22	QSLDSDGKTY	E6
V _L CDR2	서열번호 23	DTT	D2
	서열번호 24	LVS	D6, E6

V _L CDR3	서열번호 25	QQYWSAPPT	D2
	서열번호 26	WQGTLFPYT	D6
	서열번호 27	WQGFHPRT	E6

표 3

[0067]

CDR	서열번호	Sequence	Identified In
V _H CDR1	서열번호 28	GYSITSDYA	C4
	서열번호 29	GFTFNTNA	C7, C14
	서열번호 30	GYTFTNYT	C16
	서열번호 31	GYTFNTYA	C24
	서열번호 32	GFTFSNYG	D3
	서열번호 33	GFTFNTYA	C15
V _H CDR2	서열번호 34	ISYSVGT	C4
	서열번호 35	IRSKSNNYAT	C7, C15
	서열번호 36	IRSKSDNYAT	C14
	서열번호 37	INPSSDYT	C16
	서열번호 38	IRSKSNNYTT	C24
	서열번호 39	INSNGGTT	D3
V _H CDR3	서열번호 40	ARKGEYGFAY	C4
	서열번호 41	VYGRSYGGLSY	C7
	서열번호 42	VYGRSYGGLGY	C14
	서열번호 43	VRQVTTAVGGFAY	C15
	서열번호 44	ARRIFYNGRTYAAMDY	C16
	서열번호 45	VGQILYYYVGSPAWFAY	C24
	서열번호 46	ARDRDAMDY	D3
V _L CDR1	서열번호 47	KSVSTSGYSY	C4, C14, C24
	서열번호 48	KSVSSSGYSY	C7, C15, C16
	서열번호 49	QSI VNSHGNTY	D3
V _L CDR2	서열번호 50	LAS	C4, C7, C14, C15, C16, C24
	서열번호 51	KVS	D3
V _L CDR3	서열번호 52	QHSRELPLT	C4, C7, C14, C15, C16
	서열번호 53	QHSREL PWT	C24
	서열번호 54	FQGSHPWT	D3

표 4

[0068]

CDR	서열번호	Sequence	Identified In
V _H CDR1	서열번호 55	GFTFSNYG	B4
	서열번호 56	GINIKDYY	B23
V _H CDR2	서열번호 57	ISSGGSYT	B4
	서열번호 58	IDPGNGDA	B23
V _H CDR3	서열번호 59	ARHEGGGNPYFDY	B4
	서열번호 60	NEIAY	B23
V _L CDR1	서열번호 61	QSLVHSNGNTY	B4
	서열번호 62	QSLDSDGKTY	B23
V _L CDR2	서열번호 63	KVS	B4
	서열번호 64	LVS	B23
V _L CDR3	서열번호 65	SQNTLVPWT	B4
	서열번호 66	WQGFHPFT	B23

표 5

[0069]

항체		서열번호	서열
B4	V _H	서열번호 67	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYGMSWVRQTPEKRLIEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSLSRSEDAMYYCARHEGGGNPYFDYWGQGTTLTVSS
	V _L	서열번호 68	DVLMQTPLSLPVSIGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLPKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYFCNQNTLPWTFGGGTGLEIK
B23	V _H	서열번호 69	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGINIKDYIMHWKQRPQDLEWIGWIDPGNGDAEYAPKFQ GKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDATVYYCNEIAYWGQGTLLTVSA
	V _L	서열번호 70	DIVMTQSPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVDP RFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCWQGTTHFPFTFGSGGTGLEIK
C4	V _H	서열번호 71	DVKLQESGGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWI RQFPNGKLEWMGYISYVSGTRYNP SLKSRISITRDTSKNQFFLLKSVTNETATYFCARKGEYGFAYWGQGTLLTVSA
	V _L	서열번호 72	DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQKPGQPPKLLIYLVSKLDSGVDP FSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK
C7	V _H	서열번호 73	QVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTNANWVRQAPGKLEWVARIRSKSNNTYTYADS VKDRFTISRDDSQSLLYLQMNNLKTEDTAMYYCVYGRSYGGLSYWGQGTLLTVSA
	V _L	서열번호 74	DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYSYMHYQKPGQPPKLLIYLVSKLDSGVDP FSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK
C14	V _H	서열번호 75	EVKLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTNANWVRQAPGKLEWVARIRSKSDNYATYYADS VKDRFTISRDDSPSMLLYLQMNNLKTEDTAMYYCVYGRSYGGLSYWGQGTLLTVSA
	V _L	서열번호 76	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYVHWYQKPGQPPKLLIYLVSKLDSGVDP FSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK
C15	V _H	서열번호 77	EVKLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKSNNTYTYADS VKDRFTISRDDSQSLLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRQVTTAVGGFAYWGQGTLLTVSE
	V _L	서열번호 78	DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYSYMHYQKPGQPPKLLIYLVSKLDSGVDP FSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELR
C16	V _H	서열번호 79	EVQLQQSGAELARPGASVQMSCKAFGYTFTNYTMHWVRQRPQGLEWIGFIPNSSDYTNYNQKFK DKATLSADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRIFYNGRTYAAMDYWGQGTSTVTVSS
	V _L	서열번호 80	DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYSYMHYQKPGQPPKLLIYLVSKLDSGVDP FSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK
C24	V _H	서열번호 81	EVKLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGYTFNTYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKSNNTTYTYADS VKDRFTISRDDSQSLLYLQINNKLKTEDTAMYYCVGQILYYYVGPFAWFAYWGQGTLLTVSA
	V _L	서열번호 82	DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQKPGQPPKLLIFLVSKLDSGVDP FSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGGGTGLEIK
D2	V _H	서열번호 83	DVKLQESGGLVKPSQSLSLTCTSVTGYSITSGYYWNWI RQFPNGKLEWMGYIRYDGSNNYNP SLKNRISITRDTSKNQFFLLKNSVTEDTASYCARRDRSSYFDYWGQGTALTSS
	V _L	서열번호 84	DIVMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQKPGNAPRLIISDTSLETGVPSRFSGS GSGKDYTLISITLQTEDVATYYCQYWSAPPTFGGGTKLEIK
D3	V _H	서열번호 85	EVQLEESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYGMSWVRQTPDKRLIELVATINSNGGTTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSLSKSEDSAMYYCARDRDAMDYWGQGTSTVTVSS
	V _L	서열번호 86	DVLMQTPLSLPVSIGDQASISCRSSQSLVNSHGNTYLEWYLPKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDP FSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQGSHPWTFGGGTGLEIK
D6	V _H	서열번호 87	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVKQSHGKSLEWIGYIYPYNGDTGYNQKFK SKATLTVDNSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCVRSGDYWGQGTTLTVSS
	V _L	서열번호 88	DVLMQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVDP RFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCWQGTLPFPYTFGGGTGLEIK
E6	V _H	서열번호 89	QIQLAQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYAADFK GRFAFSLETSASTAFLQINNKNEDTATYFCARGYYDYWGQGTTLTVSS
	V _L	서열번호 90	DVLMQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVDP RFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCWQGTTHFPRTFGGGTKLEIK

[0070]

상기 서열 정렬 분석의 결과는 표 2 내지 4에 기재된 본 발명의 CDR 서열이 종래 공개된 CDR V_L 및 V_H 서열(미국 특허 US8198034B2)과 중첩되지 않는 것으로 나타났다. 이는 본 발명의 항체 서열이 하이브리도마 양성 세포에 대한 엄격한 다중 스크리닝으로부터 기인했기 때문인 것으로 판단되며, 이로써 본 발명의 항체는 현저히 낮은 K_D 값을 가질 것으로 기대된다.

[0072]

실시예 2-2. 단일 클론 항체의 항원 결합 특이성 확인

[0073] 본 발명에서 제조된 단일 클론 항체를 다이렉트 ELISA, 및 웨스턴 블랏팅 분석으로 SNAP25_{FL} 및 SNAP25₁₉₇에 대한 반응성을 시험하였다. 먼저, 다이렉트 ELISA는 GST-SNAP25_{FL}, 또는 GST-SNAP25₁₉₇ 코팅된 마이크로플레이트에서 정제된 IgG (50 ng per well)로 수행하였다. HRP 반응은 5분간 수행하였고, HRP 활성은 Bio-Tek SynergyNeo2를 사용하여 A450에서 측정하였다. 상기 측정값에서 IgG 없이 측정된 A450값을 제하여 A450 측정값을 산출하였고, SNAP25_{FL} 측정값에 대한 SNAP25₁₉₇ 측정값의 비율(Ratio_{197/206})을 하기 표 6에 기재하였다. Ratio_{197/206} 측정 결과는 BLI 분석에 의해 얻어진 결과와 일치하여, A15, B4, 및 B23과 같은 이중 특이적 IgG의 경우 1.0에 근접하였고, C7, C14, C16, 및 C24와 같은 SNAP25₁₉₇ 특이적 IgG의 경우 950 이상이었으며, SNAP25_{FL} 특이적 IgG의 경우에는 0.02 내지 0.03으로 나타났다.

표 6

[0074]

IgGs	A ₄₅₀ with SNAP25 _{FL}	A ₄₅₀ with SNAP25 ₁₉₇	Ratio _{197/206}
A15	1.383	1.445	1.04
B4	2.163	1.797	0.83
B23	1.901	1.754	0.92
C4	0.001	0.919	919
C7	0.001	1.199	1,037
C14	0.001	0.953	953
C16	0.001	0.996	996
C24	0.001	0.973	973
D3	0.125	1.616	12.93
D2	1.448	0.048	0.03
D6	1.878	0.031	0.02
E6	1.808	0.039	0.02

[0076] 웨스턴 블랏팅 분석은 일차 항체의 공급원인 하이브리도마 배양액 상층액(1: 100 희석)으로 수행하였다. GST-SNAP25_{FL}, 또는 GST-SNAP25₁₉₇ 0.5 μ g을 변성 겔상에서 용해시키고 PVDF 멤브레인으로 전이시켜 항원으로 사용하였다. 단일 클론 항체는 ELISA 시험에서와 동일한 감도로 변성된 SNAP25 항원에 반응하였다. 상기 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 레인 1은 SNAP25_{FL}, 레인 2는 GST-SNAP25₁₉₇ 이다. 상기 결과로부터, 본 발명의 ① SNAP25_{FL}, ② SNAP25₁₉₇, 또는 ③ SNAP25_{FL}, 및 SNAP25₁₉₇에 결합 특이성을 가지는 상이한 3종류의 항체들이 모두 SNAP25에 대해 높은 친화력과 특이성을 가지고 있으며, 변성 또는 천연의 표적 항원과 효율적으로 반응한다는 것을 알 수 있었다.

[0078] 실시예 3. 보툴리눔 독소 활성 결정 방법의 개발

[0079] 실시예 3-1. N2-42F 세포 배양, 및 BoNT/A 독소 처리의 최적화

[0080] 상기 실시예 1과 2로부터 BoNT/A에 매우 민감한 신경 세포와 SNAP25에 특이적인 단일 클론 항체와 같은 중요한 재료를 획득함으로써, 독소화 매질, 감작제, BoNT/A 처리 시간, 및 검출 항체쌍을 포함하여 보툴리눔 독소 세포 어세이의 모든 단계에 대해 최적화가 가능하였다.

[0082] 실시예 3-1-1. 독소화 시간에 대한 최적화

[0083] 먼저, BoNT/A 처리 시간(독소화 시간)을 최적화하였다. 도 6A(프로토콜 A)는 SiMa에 최적화된 표준 CBPA 절차이다. 프로토콜 A에 따른 BoNT/A 감수성을 조사하기 위해, 12웰 배양 플레이트에서 N2-42F 세포를 웰당 5.6×10^5 세포 밀도로 파종하고, 다음 날 배지를 GT1b(Ganglioside GT1b trisodium salt, Enzo ALX-302-011-M005)가 제거된 1x 독소화 배지로 교체하였다. 이를 후, 배지에 GT1b(25 μ g/ml)를 첨가하고, 다시 하루 뒤 배양 배지를 BoNT/A를 함유하는 1x 배지로 교환하고, 추가로 2일간 배양하였다. 도 6B(프로토콜 B)는 본 발명에서 개발된

CBPA 절차를 나타낸 것이다. 구체적으로, N2-42F 세포를 12웰 배양 플레이트에서 웰당 5.6×10^5 세포 밀도로 파종하고, 다음 날 배지를 25 pM BoNT/A를 함유하는 1x 독소화 배지로 교체하였다. 세포 용해는 각 웰마다 200 μ l의 1x SDS 완충액을 첨가하여 수행하였고, 12% SDS-PAGE 겔로 단백질을 분리하여 다클론 항-SNAP25 IgGs(Sigma S9684, 1: 8,000 희석액)와 염소 항-토끼 IgG Fc-HRP(AbFrontier LF-SA8002, 1: 8,000 희석)를 사용하여 웨스턴 블랏팅으로 SNAP25_{FL}과 SNAP25₁₉₇을 검출하였다. SNAP25 분열의 정도는 Image Lab 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 정량화하였다.

[0084] 상기와 같이, 본 발명에서는 N2-42F 세포에 대한 최적의 독소화 시간을 확립하기 위해, GT1b가 제거된 1x 독소화 배지, 또는 BoNT/A를 함유한 1x 독소화 배지에서 세포 배양 시간을 연장시킴으로써 프로토콜 A를 변형시켰다. 이러한 변화는 SNAP25 절단의 정도를 향상시키지 않았고, 또한 독소화 배지에서 4일 이상 배양된 N2-42F 세포는 현미경 하에서 매우 유해한 것으로 보였다(데이터는 나타내지 않았다). 이 관찰에 기초하여, GT1b 및 BoNT/A 모두가 보충된 1x 독소화 배지에서 배양 시간이 단축된 새로운 프로토콜 B를 확립하였다. 세포 파종으로부터 3일 후(d4)에 N2-42F 세포에서의 SNAP25 절단 범위를 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. 도 6C에 도시한 바와 같이, d4에서 SNAP25의 20% 미만이 절단된 것으로 나타났고, 시간이 지남에 따라 절단율이 유의하게 증가하였다. 그러나 현미경으로 관찰한 세포의 상태가 d7에서 유해성이 염려됨에 따라, d6을 최종 N2-42 세포 용해 및 ELISA 분석의 날로 결정하였다.

[0086] 실시예 3-1-2. 독소화 배지에 대한 최적화

[0087] 삼투압과 온도는 BoCellTM의 BoNT/A 감도에 영향을 주는 것으로 알려져 있고(US Patent US9526345B2), NG108-15 세포의 BoNT/A 감도는 신경 분화 배지를 최적화함으로써 상당히 개선되었다(J Biomol Screen. 2016 Jan;21(1):65-73). BoNT/A 민감도는 세포 표면의 2 개의 독립적인 수용체 폴리시알로글리코시드(polysialoganglioside; PSG) 수용체와 단백질 수용체 SV2를 통한 BoNT/A 섭취의 정도를 반영하기 때문에(J Neurochem. 2009 Jun;109(6):1584-95), 세포의 BoNT/A 감수성은 배양 배지, 또는 BoNT/A 반응 시 온도와 관련이 있다.

[0088] 따라서, 독소화 배지에 대한 최적화를 위해 N2-42F 세포를 1x N2, 1x B27, 및 1x GT1b가 첨가된 RPMI1640, NeurobasalTM, 또는 MEM의 3 가지 상이한 배양 배지에서 BoNT/A 감도를 시험하였다. BoNT/A는 상기 프로토콜 B에 따라 0.93 내지 25 pM의 농도로 처리하였다.

[0089] 실험 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, N2-42F 세포의 BoNT/A 민감성은 RPMI1640 배지를 사용한 경우에 가장 높게 나타났다. NeurobasalTM 또는 MEM 배지를 사용한 경우에는 BoNT/A 민감도는 RPMI1640보다 25% 내지 50% 더 낮았다. 배지들의 성분에서, KCl 함량은 일반적으로 모든 배지에서 5.33 mM이지만, NaCl 농도는 RPMI1640에서 103 mM, MEM에서 117 mM, 및 NeurobasalTM 배지에서 52 mM로 상이하다. 그러나 이러한 차이에도 불구하고 대부분의 척추동물 세포에 대한 배양 배지의 삼투압은 260 내지 320 mOsm/kg의 좁은 범위로 유지되는 것으로 알려져 있으므로(ATCC Culture Cell Guide), RPMI1640에서 N2-24F 세포의 BoNT/A 민감도는 삼투압 이외의 다른 요인에 의한 것으로 생각된다.

[0090] 또한 RPMI1640 배지를 사용했을 때, 약 48%의 내인성 SNAP25가 8.33 pM BoNT/A에 의해 절단되었는데, 이는 약 10 U/ml 역가와 동등한 것이다. 96웰 플레이트의 배양 부피가 0.1 ml 이므로, EC50은 마이크로 플레이트에서 1 웰당 1 BoNT/A의 생체 역가로 평가 될 수 있다. 따라서 Protocol B에 따라 N2-42F 세포로 측정된 BoNT/A 민감도는 마우스 LD50 생물 검정으로 결정된 BoNT/A의 생체 역가를 대체하기에 충분할 것으로 판단된다.

[0092] 실시예 3-1-3. 증감제에 대한 최적화

[0093] BoNT/A 민감도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 아르기닌, 또는 ATP(Fields and Stevens, 2000), 크레아틴(Andres et al., 2005), 리포산(Grasso et al., 2014) 등 신경세포의 생존 또는 분화에 대해 영향을 미치는 화합물 증감제에 대한 최적화를 수행하였다. 이를 위해 N2-42F 세포에 0.03 내지 5.5 pM의 BoNT/A를 처리하고, SNAP25에 특이적인 단일 클론 항체를 이용하여 샌드위치 ELISA 프로토콜 B로 분석을 수행한 결과를 도 8에 나타내었다. 실험 결과, 1x 독소화 배지에 1 mM 크레아틴, 또는 5 mM 아르기닌을 첨가하면 BoNT/A 감도가 현저히 향상되어 EC50 값을 2.51 pM에서 각각 2.13 pM과 2.03 pM으로 낮추는 것으로 나타났다. 대조적으로, ATP 및 리포

산은 25 pM BoNT/A 농도에서도 N2-42F 세포의 SNAP25이 분열되지 않는 매우 효과적인 억제제로서 작용하였다.

[0095] 상기 독소화 배지에 대한 최적화 연구에서, RPMI1640 배지에서 Neurobasal™, 또는 MEM 배지보다 N2-24F 세포의 BoNT/A 민감도가 높게 나타난 것은 삼투압 이외의 다른 요인에 의한 것으로 생각되었다. 배지 조성 중 아르기닌의 경우, RPMI1640에서 1.15 mM, MEM에서 0.6 mM, Neurobasal™에서 0.4 mM 포함되어 있다. 따라서 아르기닌 0 내지 10 mM이 포함된 2x 독소화 배지에서 BoNT/A에 대한 세포의 민감도를 시험하였다. 도 8B에 도시한 바와 같이, BoNT/A 감도는 아르기닌 농도가 5 mM까지 증가함에 따라 점진적으로 증가되었다. 10 mM 아르기닌(EC50 = 2.34 pM)이 첨가된 경우에 BoNT/A 감수성은 대조군(EC50 = 2.94 pM)보다 여전히 높았지만, 5 mM 아르기닌(EC50 = 1.65 pM)보다 낮았다. 상기 결과로부터 CBPA의 최적화된 표준 프로토콜은 5 mM 아르기닌을 함유하는 독소화 배지를 사용하는 것으로 결정하였다.

[0097] 2002년 Schengrund와 그의 동료들은 Neuro-2a 세포에서 BoNT/A에 의한 SNAP25 절단이 25 µg/ml 이상의 GT1b를 필요로 한다는 실험적 증거를 제시하였다(J Biol Chem. 2002 Sep 6;277(36):32815-9). N2-42F 세포는 Neuro-2a에서 유래되었으므로, BoNT/A 활성에 대한 GT1b의 영향을 웨스턴 블랏팅으로 25 내지 75 µg/ml GT1b(1~3x GT1b)를 함유한 배지를 사용하여 조사하였다. 상기 결과를 도 9에 나타내었다. 실험 결과, GT1b가 첨가되지 않은 경우에 8.3 pM의 BoNT/A는 SNAP25 분열을 약 18% 유도하였고, 1x 내지 3x GT1b의 첨가는 SNAP25 절단의 10 내지 18% 증가시켰다(도 9A). GT1b 농도의 최적화를 위해, N2-42F 세포의 BoNT/A 민감성을 25 pM BoNT/A, 및 1x 내지 5x GT1b 농도를 포함하는 2x 독소화 배지에서 시험하였다. 웨스턴 블랏팅 분석으로 측정했을 때, SNAP25 절단은 1x 내지 2x GT1b의 첨가에 의해 유의하게 향상되었지만, 3x GT1b 이상에서는 SNAP25 절단은 65 내지 70%로 2x의 63%보다 약간 증가하였다(도 9B). 또한 샌드위치 ELISA의 감도를 고려하여, N2-42F 세포를 프로토콜 B에 따라 2x 독소화 배지에서 0.93 pM BoNT/A로 처리하였다. 실험 결과, N2-42F 세포를 GT1b가 없는 독소화 배지에서 BoNT/A로 처리하면 샌드위치 ELISA에서 비교적 낮은 A450 값이 얻어졌으나, 독소화 배지에 GT1b를 첨가하면 A450 값이 현저하게 증가하였다(도 9C). 상기 결과로부터 N2-42F 세포를 사용하여 BoNT/A 활성을 측정할 때 독소화 배지의 GT1b의 최적 농도는 50 µg/ml(2x)으로 결정하였다.

[0099] 신경세포 배양액 내의 N2(N2 supplement, Thermo Fisher Scientific 17502048)/B27(B27™ Serum free supplement, Thermo Fisher Scientific 17504-044)도 BoNT/A 민감성에 미치는 효과를 시험하였다. B27은 모든 트랜스-레티놀(0.1 mg/L)을 함유하고 있으며, 신경 전구 세포가 운동 신경세포로 분화되는 것을 돕는다고 알려져 있다(J Cell Biochem. 2008 Oct 15;105(3):633-40). N2는 인슐린을 포함한 B27 성분의 하위 집합을 포함하고 있으며 인간 배아 줄기 세포의 분화, 및 신경 전구 세포의 증식과 생존을 촉진하는 것으로 알려져 있다(J Cell Biochem. 2008 Oct 15;105(3):633-40). 프로토콜 B에 따라 1x GT1b, 8.3 pM BoNT/A, 및 0 내지 5x의 N2/B27 농도가 첨가된 RPMI1640에서 N2-42F 세포의 BoNT/A 민감성을 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. 도 10A에 도시된 바와 같이, 총 SNAP25(SNAP25_{FL} + SNAP25₁₉₇)의 세포 내 수준은 N2/B27 농도에 비례하여 증가하는 반면, SNAP25₁₉₇의 수준은 4x 내지 5x N2/B27 존재 하에서 3x 보다 감소하였다. 최근의 연구에 따르면 N2와 B27은 글루코스가 고갈된 후 당화를 제한하여 세포를 사멸로부터 보호한다(Front Mol Neurosci. 2017 Sep 29;10:305). 도 10A의 결과도 저농도의 글루코오스를 함유하는 무혈형 RPMI1640 배지에서 세포 증식 및 생존을 촉진시키는 기능의 일부로서 N2/B27 농도 증가에 따라 SNAP25 합성이 함께 증가되었을 것으로 판단된다.

[0100] 또한 3x GT1b, 및 5 mM 아르기닌이 첨가된 RPMI1640 배지를 사용하여, N2/B27이 BoNT/A 활성에 미치는 영향을 추가로 조사하였다(도 10B). 8.3 pM BoNT/A로 처리된 N2-42F 세포에서의 SNAP25 절단 정도는 SNAP25의 전체 세포 내 수준의 현저한 증가에도 불구하고 13%에서 1x의 경우 56%, 2x의 경우 69%로 증가하였다. 상기 결과로부터 N2-42F 세포를 사용하여 BoNT/A 활성을 측정할 때 독소화 배지의 N2/B27의 최적 농도는 2x로 결정하였다.

[0102] 실시예 3-2. 샌드위치 ELISA 방법의 최적화

[0104] 실시예 3-2-1. 완충액에 대한 최적화

[0105] 샌드위치 ELISA 조건의 최적화를 위해, ELISA에서 상이한 11 종류의 세포 용해액(lysis buffer)을 비교하고, 선택된 최적 조건을 표 7과 표 8에 기재하였다.

표 7

[0106]

Parameters	Conditions tested	Optimal condition
Plate coating matrix	3 matrices	Poly-D-lysine
Cell density	2 densities	5.5×10^4 cells per well
Intoxication medium/sensitizer	3 culture media/ 6 sensitizers	RPMI1640, 2 mM L-alanyl-L-glutamine, 0.1 mM NEAA, 2x N2, 2x B27, GT1b(50 μ g/ml), 5 mM arginine
Intoxication time	3 time points	96 hr
BoNT/A dose	0.03 pM-1 nM	0.03 - 8.33 pM
Capture/detection antibodies	11 combinations	B4(300 ng/50 ml) + C16-HRP(200 ng/50 ml)
Lysis buffers	11 buffers	20 mM Hepes-NaOH, pH 7.5, 0.2 M NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA
Lysate incubation	3 temperatures/ 3 time points	4 hr at 4°C
Blocking buffers	46 buffers	1% polyvinyl alcohol(Mw 145,000), 3% skim milk in 1x PBS
Incubation of detection antibody	4 temperatures/ 4 time points	1 hr at RT

표 8

[0107]

Parameters	Condition tested	Optimal
Lysis buffers	50 mM Tris-HCl, pH 8.0,150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 2 mM EGTA, 0.01-0.1% SDS, ± 5 mM EDTA	20 mM Hepes-NaOH, pH 7.5,
	20 or 50 mM Hepes-NaOH, pH 7.5, 0-0.4 M NaCl,1 or 2 % Triton X-100, 0-0.1% SDS,	150 mM NaCl, 1% Triton X-100,
	0-1.5 mM MgCl ₂ , 0-5 mM EDTA,1-2 mM EGTA	5 mM EDTA,
	50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40	2 mM EGTA
Coating buffers	0.5% APTES	0.1 M carbonate buffer, pH 9.6
	0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.0	
	0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2	
	0.1 M sodium citrate buffer, pH 2.8	
	0.1 M carbonate buffer, pH 9.6	
Washing buffers	1x PBS/0.05% Tween-20(1x PBST), ±0.2 M NaCl	1x PBST
Blocking buffers	0.2-3% Ac-BSA, 3-5% skim in 1x PBS	3% skim, 1% PVA(Mw 145,000) in 1x PBS
	1% goat serum in 1x PBS	
	2-3% skim, 0.05-1% PVA(Mw 47,000 or 145,000) in 1x PBS	
	5% skim or 0.1-0.5% Ac-BSA, with 10 or 100% SuperBlock™(PBS) ^a	
	2-5% ECL ^b or ECL Prime™ Blocking agent ^c ± 0-5% skim or 0.2% Ac-BSA	
	Western BLoT blocking buffer(protein-free) ^d	
^a SuperBlock™(PBS)(Thermo Fisher Scientific 37518)		
^b ECL Prime™ blocking agent(GE Healthcare UK limited RPN418V)		
^c ECL(GE Healthcare UK limited RPN2125V)		
^d Western BLoT blocking buffer(protein free)(Takara T7132A)		

[0109] 실시예 3-2-2. 포획 항체 처리에 대한 최적화

[0110] 실시예 2의 항체 중 SNAP25_{FL}와 SNAP25₁₉₇를 모두 검출 가능한 A15, B4, 및 B23의 포획 항체로서의 기능을 비교하였다. 세포 용해물은 1x 독소화 배지에서 0 내지 25 pM의 BoNT/A로 처리한 N2-42F 세포로부터 제조하였고, 웰당 400 ng의 상기 항체로 코팅된 마이크로 플레이트에 세포 용해물을 첨가하고, 4 °C에서 4시간 인큐베이션한 후, 제시된 항체에 의해 포획된 총 SNAP25 중 SNAP25₁₉₇의 양을 검출하고, C16 IgG-HRP 접합체를 사용하여 정량화하였다. 시험은 모든 검사 그룹이 양성 ELISA 신호를 낼 때까지 HRP 반응을 30분간 수행하였다. 실험 결과, 도 11A에 도시한 바와 같이, A15, B4 및 B23 IgG에 대해 추정된 EC50 값은 각각 15 pM, 0.7 pM 및 5.5 pM이었다. 이 결과는 SNAP25_{FL} 및 SNAP25₁₉₇에 대한 동역학 값과 일치하였다.

[0111] 상기 결과에서 B4 IgG의 결과가 가장 좋음에 따라, 프로토콜 B의 방법으로 0, 0.03, 0.1, 0.31, 0.93, 1.39, 2.78, 또는 5.55 pM의 BoNT/A를 함유하는 2x 독소화 배지에서 배양된 N2-42F 세포로부터 제조된 세포용해물로 최적 B4 IgG 양을 조사하였다. 샌드위치 ELISA에 코팅하는 B4 IgG 양은 웰당 100 내지 400 ng으로 수행하였다. SNAP25 포획 및 검출은 상기와 동일하게 진행하되, HRP 반응은 15분간 처리하였다. 실험 결과, 도 11B에 도시한 바와 같이, EC50 값은 B4 IgG 양이 100 ng에서 300 ng으로 증가함에 따라 꾸준히 낮아졌다. 400 ng B4 IgG의 EC50 값은 통계적으로 유의하지 않았다. 상기 결과로부터, 샌드위치 ELISA에서 사용하는 포획 항체의 최적 조건은 300 ng의 B4 IgG인 것으로 결정하였다.

[0113] 실시예 3-2-3. 검출 항체 처리에 대한 최적화

[0114] 검출 항체의 최적화를 위해, 프로토콜 A의 방법으로 1x 독소화 배지에서 8.33 또는 25 pM BoNT/A로 처리한 SiMa 세포로부터 제조한 세포용해물을 SNAP25₁₉₇ 항체로 포획시키고, 포획된 SNAP25₁₉₇을 C16 IgG-HRP 접합체를 사용하여 검출하고 정량화하였다. 도 12A에 도시된 바와 같이, SNAP25₁₉₇에 대한 ELISA 신호는 마이크로 플레이트가 4 °C에서 4시간 동안 항은 처리될 때 가장 높고, 37°C에서 1시간 동안 항은 처리될 때 가장 약한 것으로 나타났다. N2-42F 세포의 세포용해물로 실험한 경우에도 유사한 유사한 결과가 얻어졌으며, ELISA 신호는 4시간 이상 항은 처리에 의해 현저하게 변화되지 않았다. 상기 결과로부터, 샌드위치 ELISA에서 사용하는 세포용해물의 최적 반응 조건은 4°C에서 4시간 동안 항은 처리하는 것으로 결정하였다.

[0115] 또한 검출 항체에 대한 최적 반응 조건은 다이렉트 ELISA로 조사하였다. 구체적으로, 마이크로 플레이트는 표준 CBPA에서 0.05% 내지 50%의 내인성 SNAP25 절단을 나타내는 재조합 GST-SNAP25₁₉₇을 10 내지 1 ng으로 코팅하였다. 이후 웰당 200 ng의 C16 IgG-HRP 접합체를 첨가하고, 마이크로 플레이트를 지시된 조건하에서 항은 배양하였다. 조건 시험 중, 상온에서 1시간 동안 Cg16 IgG-HRP 접합체를 항은 배양한 결과, 검사된 GST-SNAP25₁₉₇의 모든 범위에서 가장 높은 ELISA 신호가 산출되었지만, 다른 조건에서도 ELISA 신호의 허용 가능한 수준이 생성되었다. 따라서 상온에서 수행되는 후속 HRP 반응을 고려하여, 샌드위치 ELISA에서 사용하는 C16-HRP 접합체 최적 반응 조건은 실온에서 1시간 동안 항은 처리하는 것으로 결정하였다.

[0117] 실시예 3-2-4. C16 IgG-HRP 접합체 검출에 대한 최적화

[0118] HRP 활성은 통상적으로 사용되는 TMB 키트(1-StepTM Ultra TMB-ELISA, Thermo Fisher Scientific 34028)를 사용하여 측정하였다. TMB 기판을 사용할 경우의 단점은 EC50 값이 HRP 반응 시간에 영향을 받는다는 것이므로, 대안적인 검출 방법으로서 샌드위치 ELISA에서 형광 측정값으로 평가하였다. 제공된 HRP 반응 기질을 제외하고, 비색 및 형광 측정은 샌드위치 ELISA를 통해 본질적으로 동일한 방식으로 병렬로 수행되었다. 실험 결과, 형광 측정법과 비색계 측정은 각각 0.66 pM과 0.78 pM의 EC50을 생성하였고(도 13), 두 EC50 값 모두 HRP 반응 시간에 의해 동등하게 영향을 미쳤다. 결론적으로, 두 측정 모두 ELISA에서 C16 IgG-HRP 접합체의 활성을 검출하기에 정확하고 민감한 것으로 판단된다.

[0120] 실시예 3-3. CBPA의 검증

[0122] 실시예 3-3-1. CBPA의 최적화된 타임 라인 확인

[0123] 도 14는 본 발명의 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 샌드위치 ELISA 방법의 모식도이다. 도 14에 도시된 바와 같이, 본 발명의 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 샌드위치 ELISA 방법은 단 3일의 근무일이면 분석이 가능하다. 보다 구체적으로, 세포를 파종하는 데 하루, 다음 날 BoNT/A(0.1~10 U/ml, 또는 4 pM 미만)이 포함된 배양 배지로 교체하는 데 하루, 세포 파종 6일째에 세포를 용해하고 샌드위치 ELISA 분석하는데 하루가 필요하다. 또한 첫번째 하루와 두번째 하루의 작업에 필요한 시간은 1 내지 2 시간이므로, 본 발명의 보툴리눔 독소 활성을 결정하는 샌드위치 ELISA 방법은 시간적으로 매우 효율적이다. 또한 본 발명의 샌드위치 ELISA는 포획 항체와 검출 항체를 모두 단일 클론 항체를 사용하므로, 다클론 항체를 사용한 것보다 항체 관리가 매우 용이하며, 이로 부터 CBPA의 신뢰성을 더욱 공고히 할 수 있다.

[0125] 실시예 3-3-2. CBPA의 정확성과 선형성 확인

[0126] 표준 프로토콜 B의 방법으로 총 18회의 CBPA를 3명의 연구자가 수행하였다.

[0127] N2-42F 세포는 3x GT1b가 포함되지 않은(도 15A), 또는 포함된(도 15B, 및 도 15C) 2x 독소화 배지에서 다양한 농도(0, 0.03, 0.1, 0.2, 0.31, 0.62, 0.93, 2.78, 5.55, 또는 8.33 pM)의 BoNT/A로 처리하였고, HRP 반응은 5 분(도 15A, 및 도 15B), 또는 9분(도 15C)간 수행하여, Gen5 소프트웨어를 이용하여 EC50을 측정하였다. 선형 회귀 분석은 0.1 내지 0.93 pM BoNT/A 처리한 N2-42F 세포에서 얻어진 A450 값으로 수행하여, 검출 한계(DL)와 정량 한계(QL)를 산출하였다. 상기 결과를 도 15에 나타내었다.

[0128] 실험결과, 첫 번째 그룹(도 15A)에서는 1.39 pM의 EC50과 1.5 fM의 검출 한계(3.4 mU 상대 효능/ml), 및 4.6 fM의 정량 한계가 산출되었다(Clin Biochem Rev. 2008 Aug;29 Suppl 1: S49-52). 1.39 pM BoNT/A는 분석당 ~0.3 U 상대 효능과 동일하므로, 첫 번째 그룹의 결과는 본 발명의 CBPA가 BoNT/A의 생체 역가 측정에 있어서 마우스 LD50 분석을 대신할 만큼 충분히 민감하다는 것을 의미한다. 두 번째 그룹과 세 번째 그룹을 분석할 때, 3x GT1b를 포함하거나, HRP 반응 시간을 연장함으로써 약간 감소된 EC50 값이 얻어졌다. 상기 결과는 독소화 배지에서 GT1b 농도를 변화시키거나, HRP 반응 시간을 조절하여 CBPA의 정량 및 검출 한계를 조정할 수 있다는 것을 나타낸다. 또한 상기 0.03~0.93 pM BoNT/A로 처리된 N2-42F 세포의 선형 회귀 분석 결과를 보면, 모든 그룹에서 BoNT/A와 ELISA 신호의 상대 효능 사이에 우수한 선형 상관 관계를 나타낸다. 이는 CBPA가 매우 민감할 뿐만 아니라, 6.8 mU 내지 0.2 U 사이의 BoNT/A의 상대적 효능을 측정하는데 있어서 매우 정확하다는 것을 시사한다.

[0130] 실시예 3-3-3. BoNT/A 시료의 생체 역가 측정

[0131] BoNT/A(BOTULAX®, 휴젤㈜, 대한민국)의 역가는 마우스 LD50으로 결정하였다. CBPA의 생체 효능을 측정하기 위해서 제조 로트(lot)가 상이한 두 BoNT/A(HUB 18009 및 HUB 18011, 200 U per vial)를 각각 1x 독소화 배지(도 16A), 탈이온수(도 16B), 또는 pH 6.0의 5 mM 아르기닌 용액(도 16C)에 용해하여 실온에서 10분간 인큐베이션 한 후, 1x 독소화 배지에 용해된 BoNT/A를 0.015, 0.05, 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15 또는 50 U/ml로 순차적으로 희석하였다. 탈이온수와 아르기닌 용액에 용해된 BoNT/A는 최적화된 2x 독소화 배지로 0.23, 0.48, 0.70, 0.98, 1.41, 2.11, 4.20, 6.32, 또는 12.6 U/ml의 농도로 순차적으로 희석하였다. 상기 시료들을 표준 프로토콜 B의 방법으로 분석하되, HRP 반응은 5분간 수행하였고, Gen5 소프트웨어를 이용하여 EC50을 측정하였다. 상기 결과를 도 16에 나타내었다. 실험 결과, 1x 독소화 배지, 탈이온수, 아르기닌 용액에 용해한 두 로트 BoNT/A의 EC50 값은 각각 10.6 ± 0.12 와 10.3 ± 0.52 U/ml(1x 독소화 배지), 4.6 ± 0.04 와 4.6 ± 0.08 U/ml(탈이온수), 및 4.5 ± 0.11 와 4.4 ± 0.22 U/ml(아르기닌 용액)이었다. 상기 결과는 본 발명의 CBPA가 BoNT/A의 생체 역가를 측정하기에 충분히 민감하고 정확하며, 그 감도 (웰당 0.4~0.5 U)가 마우스 생체 검정과 같거나 더 우수하다는 것을 나타낸다.

[0133] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다.

따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0135]

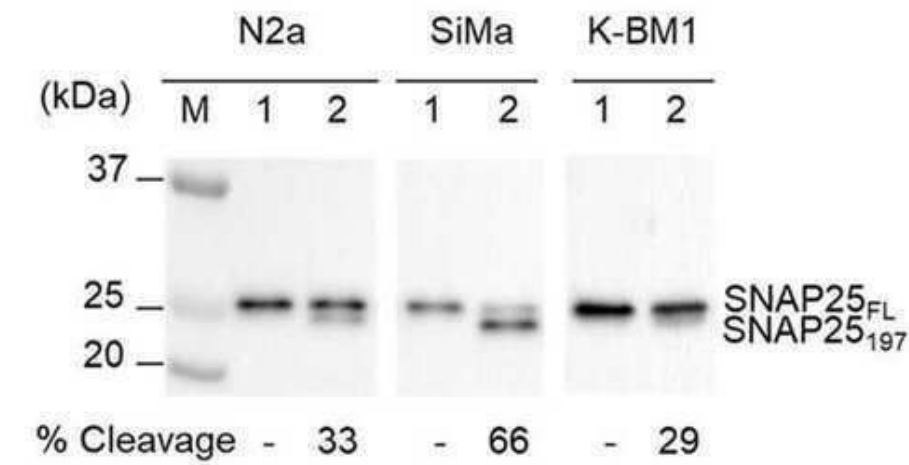
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13712BP

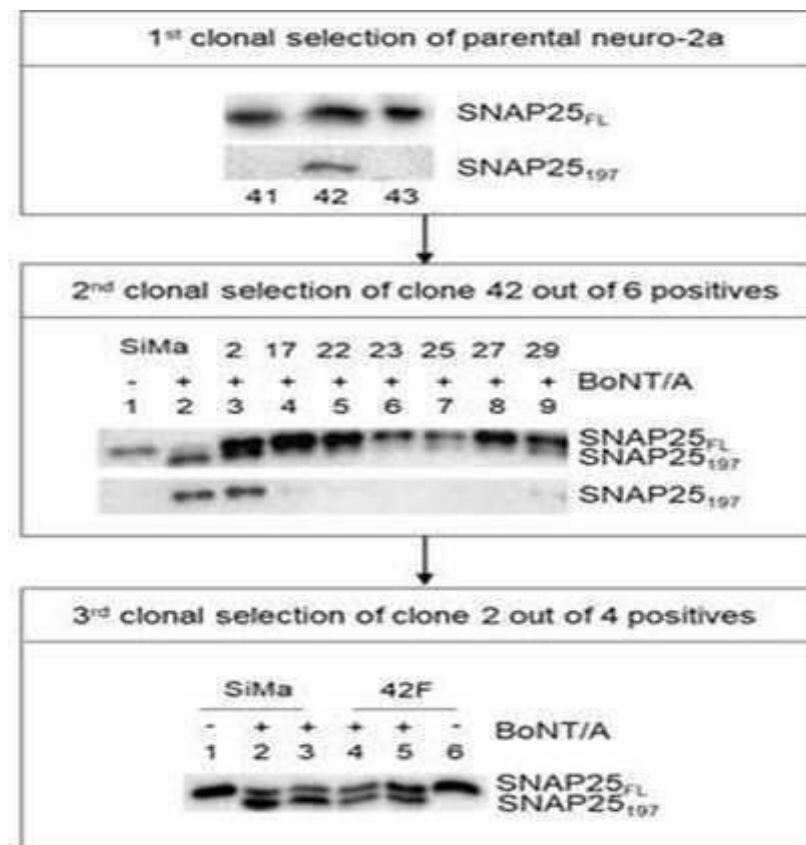
수탁일자 : 20181113

도면

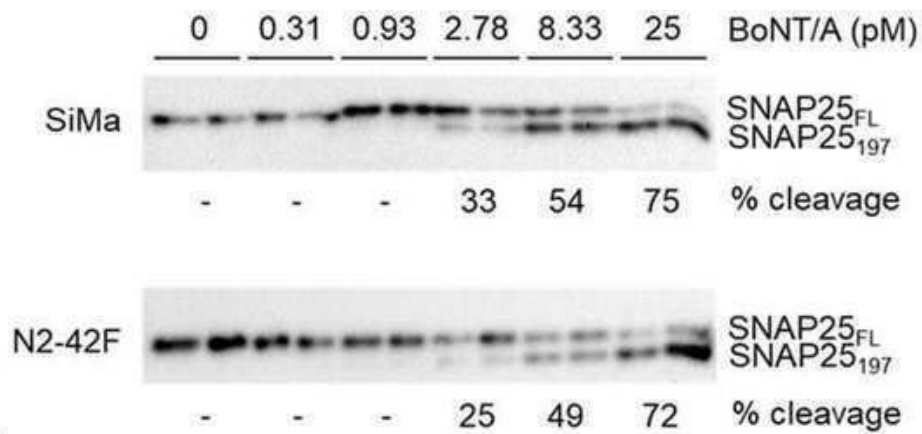
도면1



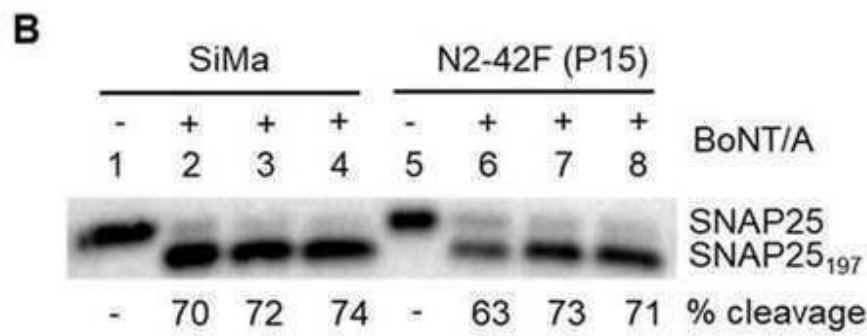
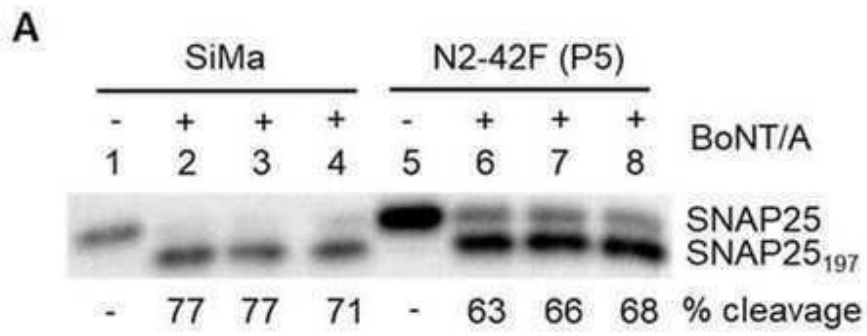
도면2



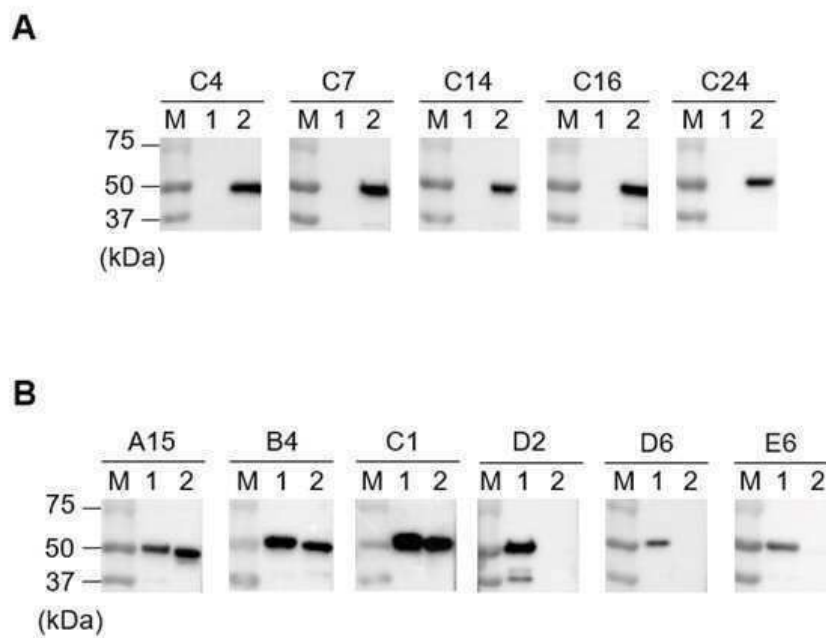
도면3



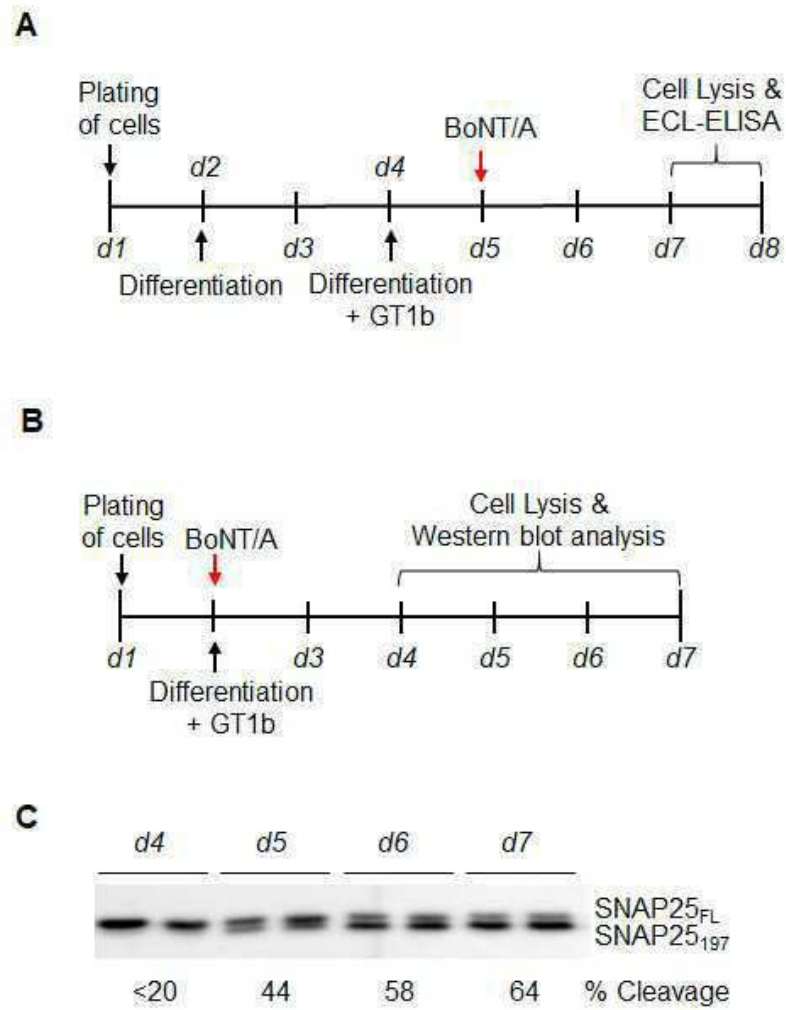
도면4



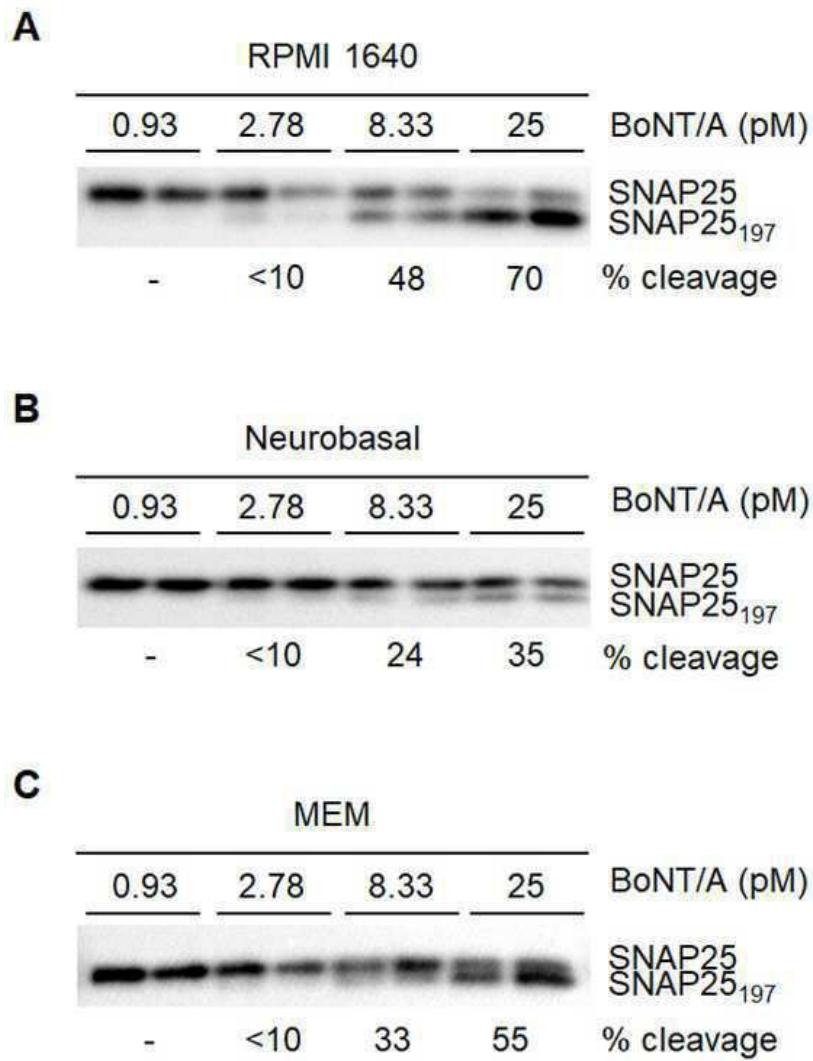
도면5



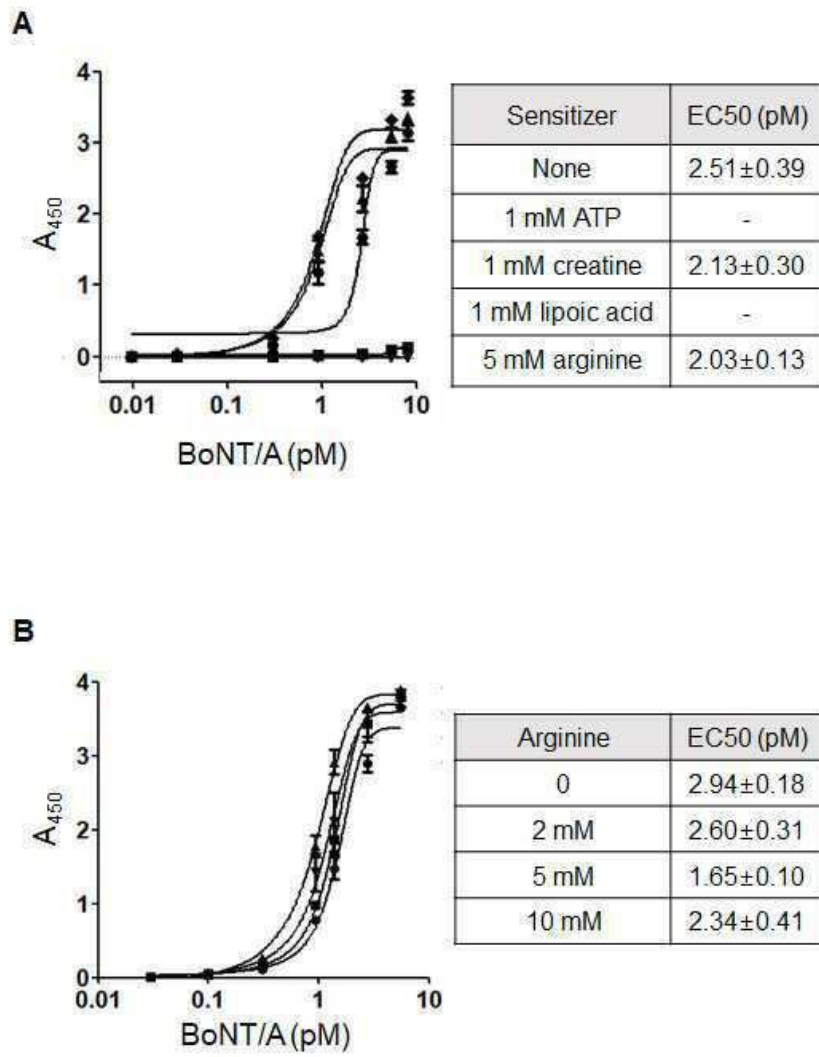
도면6



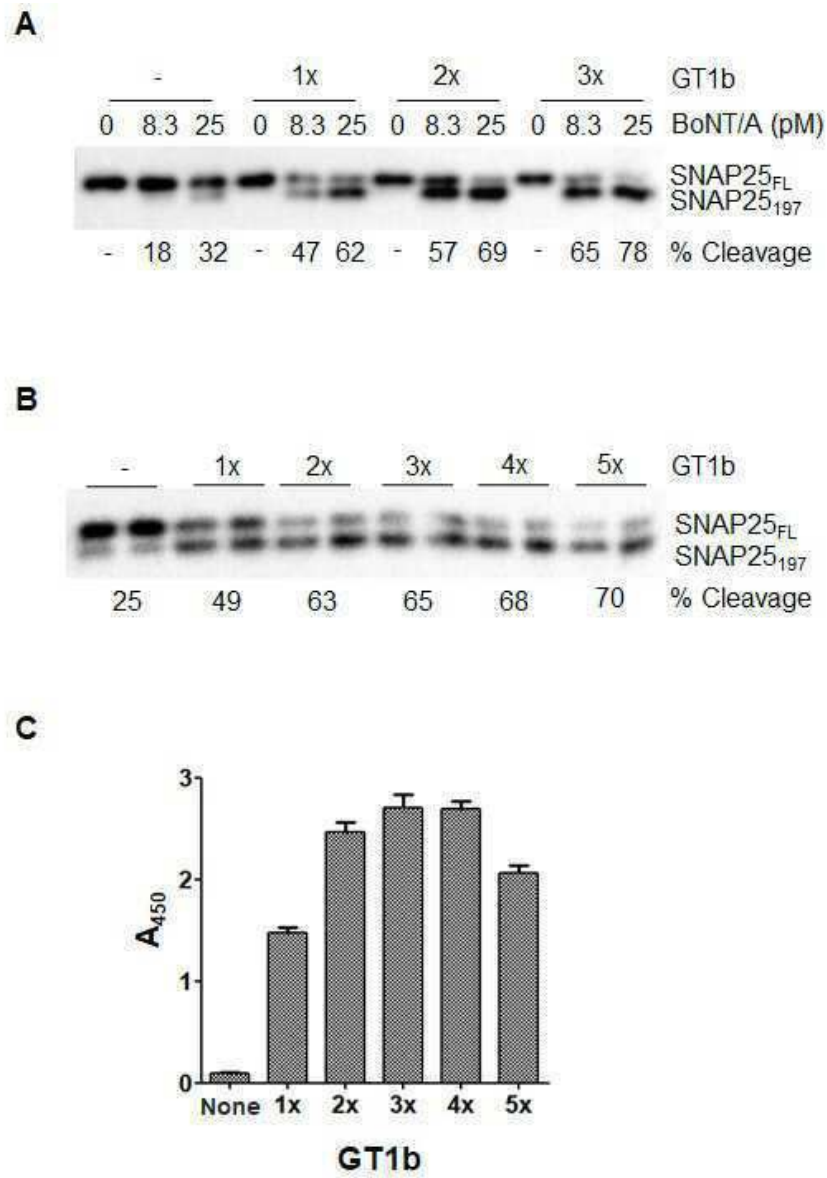
도면7



도면8

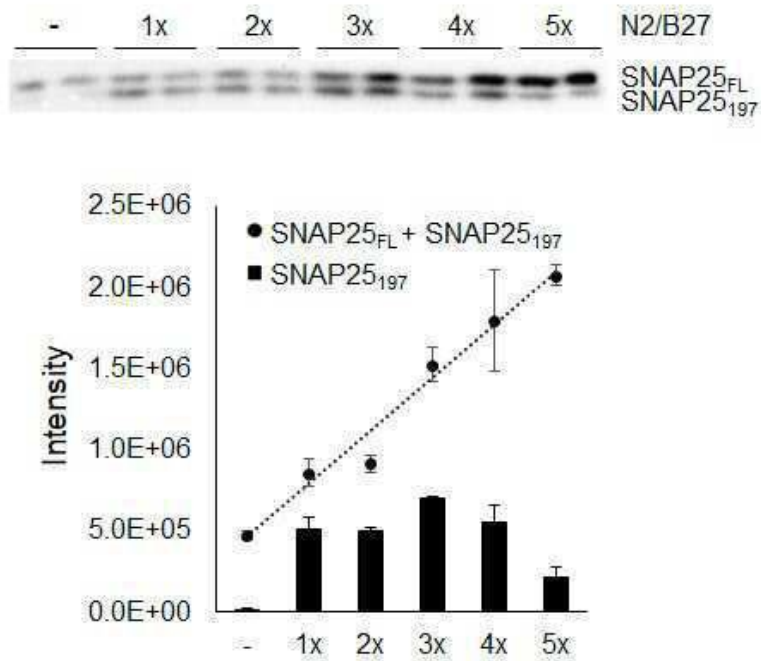


도면9

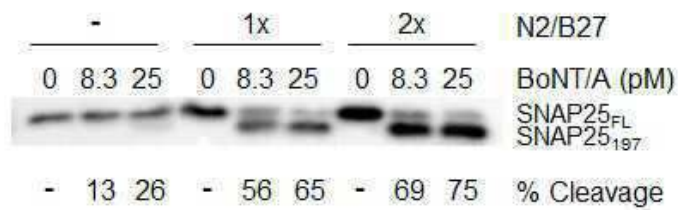


도면10

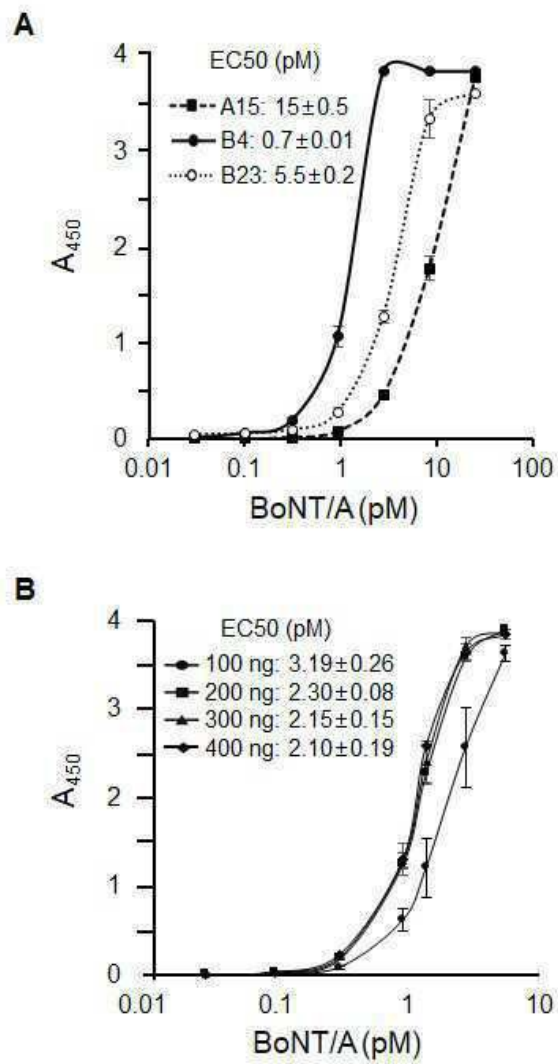
A



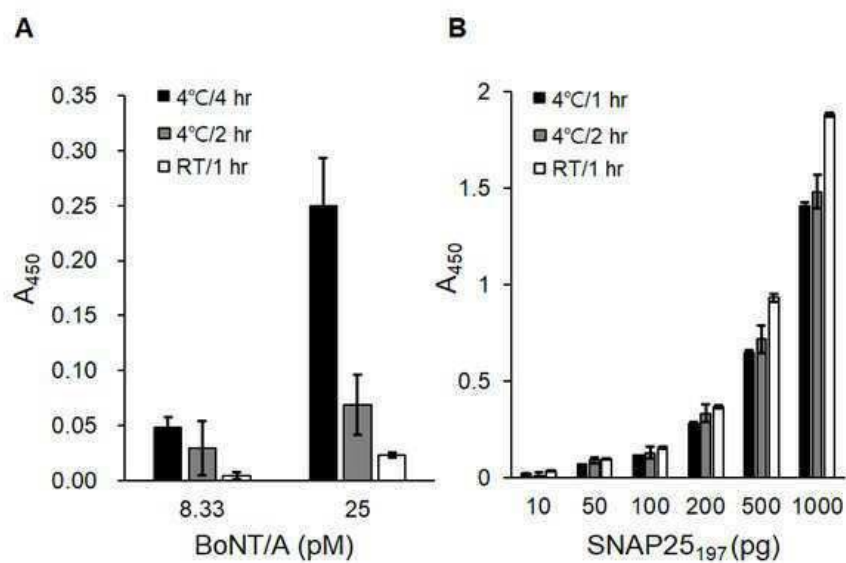
B



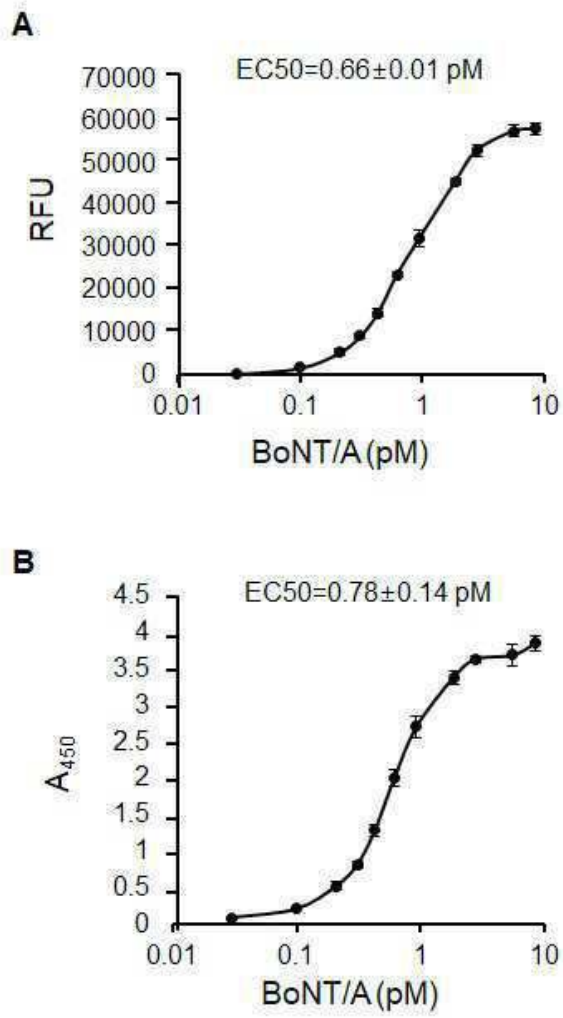
도면11



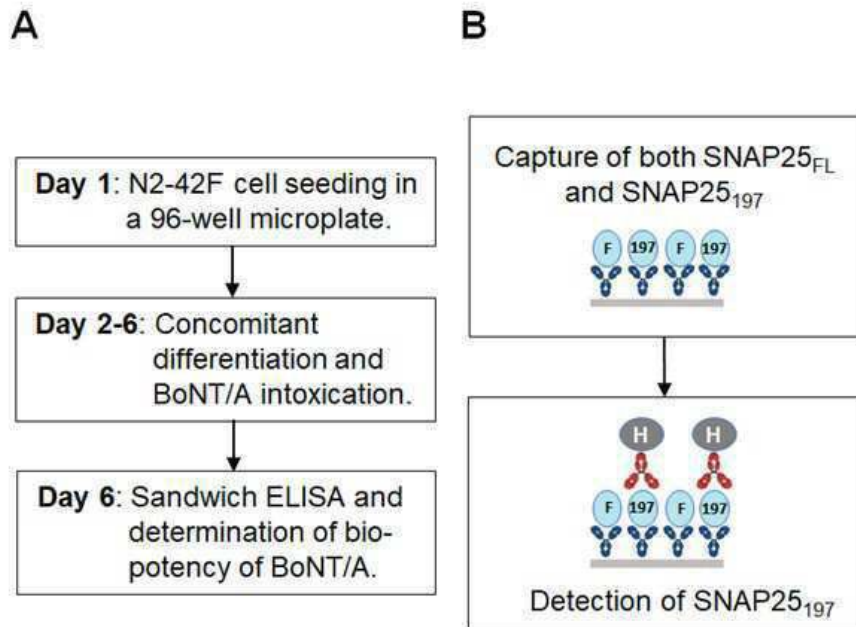
도면12



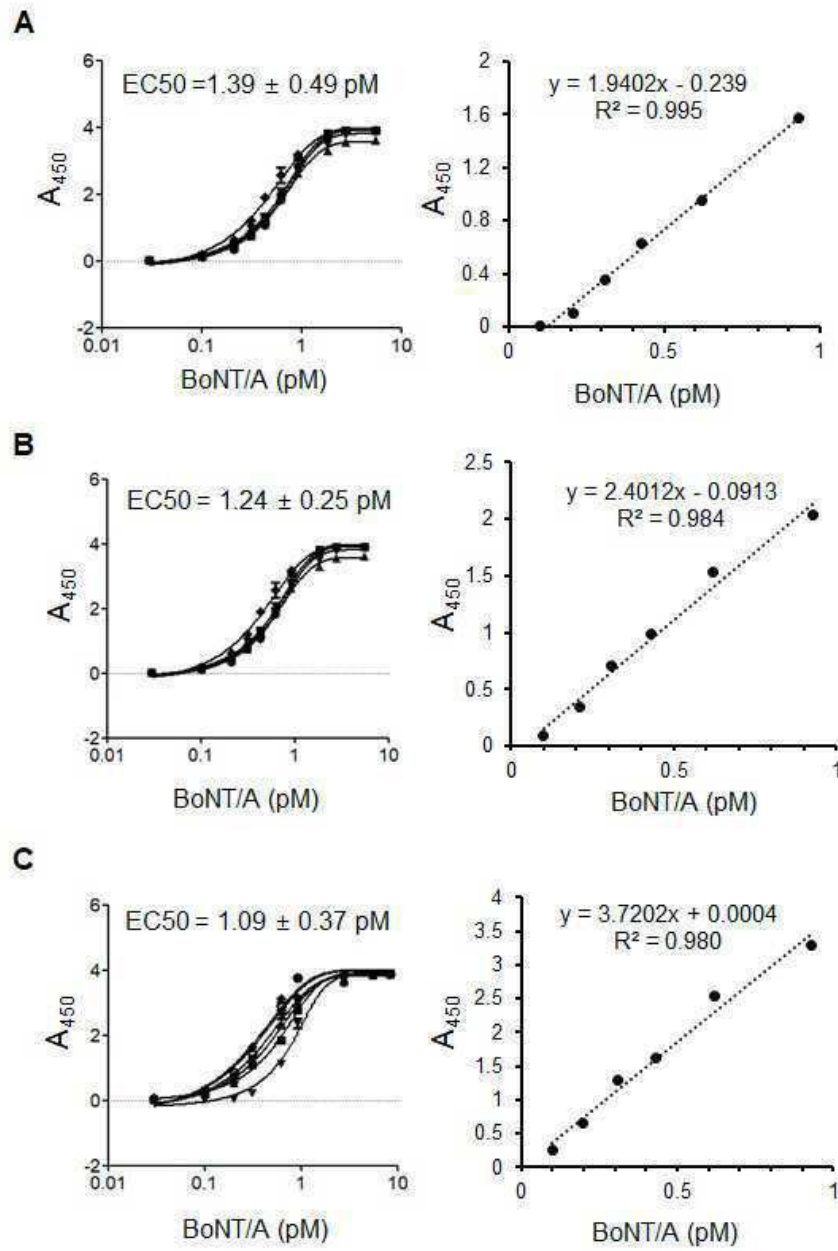
도면13



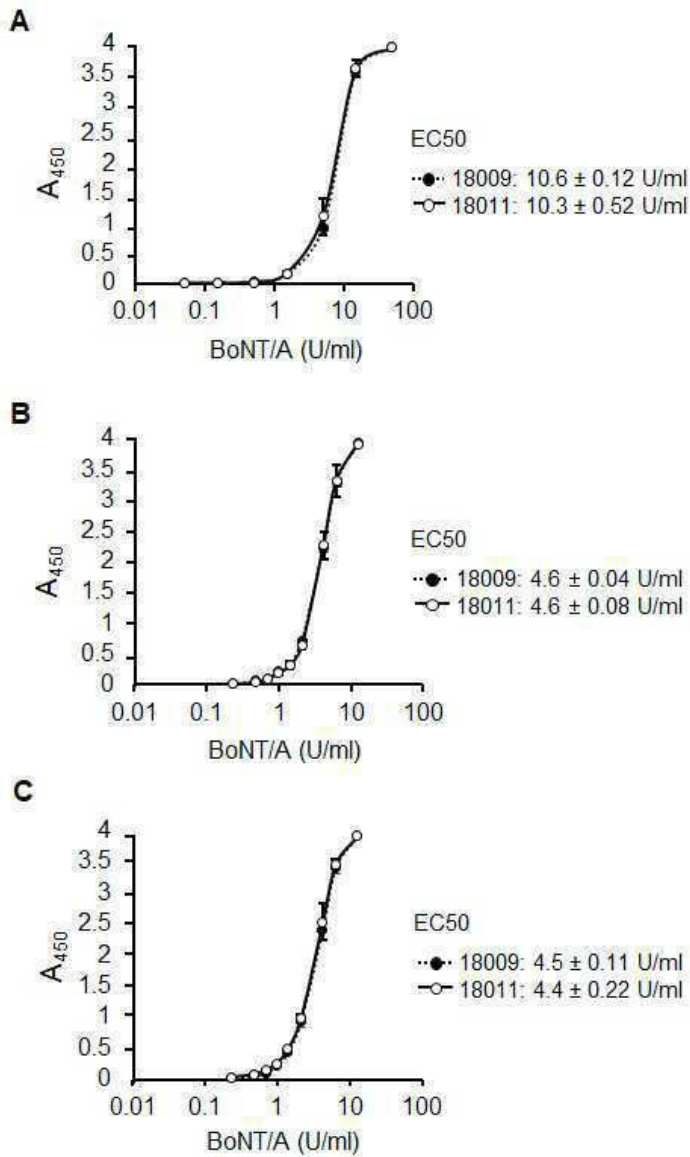
도면14



도면15



도면16



서열목록

- <110> AbBio CO., LTD.
- <120> A cell-based method for determining an activity of botulinum toxin
- <130> PDPB187219
- <160> 90
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> clostridium botulinum
- <400> 1

Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu

1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> clostridium botulinum

<400> 2

Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu

1 5 10

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> clostridium botulinum

<400> 3

Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Gln

1 5 10 15

Leu Val Glu Glu

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> clostridium botulinum

<400> 4

Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp Gln

1 5 10 15

Ile Asn Lys Asp

20

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> clostridium botulinum

<400> 5

Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg

1 5 10 15
 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> clostridium botulinum
 <400> 6

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

1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> clostridium botulinum
 <400> 7

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

1 5 10 15
 <210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> clostridium botulinum
 <400> 8

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

1 5 10 15
 Asn Gln

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> clostridium botulinum
 <400> 9

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

1 5 10
 <210> 10
 <211> 13

<212> PRT
 <213> clostridium botulinum
 <400> 10
 Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Pro Ala Thr Lys
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 11
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr
 1 5
 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 12
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn
 1 5
 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 13
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 1 5
 <210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 14

Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn

1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 15

Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 16

Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro

1 5

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 17

Ala Arg Asp Arg Asp Ser Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 18

Val Arg Ser Gly Asp Tyr

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 19

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Tyr

1 5

<210>

20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 20

Asp His Ile Asn Asn Trp

1 5

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 21

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asn Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 22

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1	5	10
<210>	23	
<211>	3	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antibody CDR of clostridium botulinum	
<400>	23	
Asp Thr Thr		
1		
<210>	24	
<211>	3	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antibody CDR of clostridium botulinum	
<400>	24	
Leu Val Ser		
1		
<210>	25	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antibody CDR of clostridium botulinum	
<400>	25	
Gln Gln Tyr Trp Ser Ala Pro Pro Thr		
1	5	
<210>	26	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antibody CDR of clostridium botulinum	
<400>	26	
Trp Gln Gly Thr Leu Phe Pro Tyr Thr		
1	5	
<210>	27	

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 27
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr

1 5
 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 28
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala

1 5
 <210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 29
 Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn Ala

1 5
 <210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 30
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Thr

1 5
 <210> 31
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 31

Gly Tyr Thr Phe Asn Thr Tyr Ala

1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 32

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly

1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 33

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 34

Ile Ser Tyr Ser Val Gly Thr

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 35

Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 36

Ile Arg Ser Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 37

Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Thr

1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 38

Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Thr Thr

1 5 10

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 39

Ile Asn Ser Asn Gly Gly Thr Thr

1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 40

Ala Arg Lys Gly Glu Tyr Gly Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 41

Val Tyr Gly Arg Ser Tyr Gly Gly Leu Ser Tyr

1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 42

Val Tyr Gly Arg Ser Tyr Gly Gly Leu Gly Tyr

1 5 10

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 43

Val Arg Gln Val Thr Thr Ala Val Gly Gly Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 44

Ala Arg Arg Ile Phe Tyr Asn Gly Arg Thr Tyr Ala Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 45

Val Gly Gln Ile Leu Tyr Tyr Tyr Val Gly Ser Pro Ala Trp Phe Ala

1 5 10 15

Tyr

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 46

Ala Arg Asp Arg Asp Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 47
 Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr
 1 5 10
 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 48
 Lys Ser Val Ser Ser Ser Gly Tyr Ser Tyr
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 49
 Gln Ser Ile Val Asn Ser His Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 50
 Leu Ala Ser
 1
 <210> 51
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 51
Lys Val Ser
1
<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
<400> 52
Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
1 5
<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
<400> 53
Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Trp Thr
1 5
<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
<400> 54
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
1 5
<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
<400> 55
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly

1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400>

> 56

Gly Ile Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 57

Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 58

Ile Asp Pro Gly Asn Gly Asp Ala

1 5

<210> 59

<211>

> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR of clostridium botulinum

<400> 59

Ala Arg His Glu Gly Gly Gly Asn Pro Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 60
 Asn Glu Ile Ala Tyr
 1 5
 <210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 61
 Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 62
 Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 63
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 63
 Lys Val Ser
 1
 <210>
 > 64

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 64
 Leu Val Ser
 1
 <210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400> 65
 Ser Gln Asn Thr Leu Val Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody CDR of clostridium botulinum
 <400>
 > 66
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 67
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antibody of clostridium botulinum
 <400> 67
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Glu Gly Gly Gly Asn Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 68

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 68

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn
85 90 95
Thr Leu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 69

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Asp Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Glu Ile Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

100 105 110

<210> 70

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 70

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95
Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 71

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400

> 71

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

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80
Leu Leu Leu Lys Ser Val Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Lys Gly Glu Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 72

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 72

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

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95
Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 73

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 73

Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly

1	5	10	15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn			
20	25	30	
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp			

50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95
 Tyr Cys Val Tyr Gly Arg Ser Tyr Gly Gly Leu Ser Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 74

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 74

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95
 Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 75

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 75

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Pro Ser Met

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Tyr Gly Arg Ser Tyr Gly Gly Leu Gly Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 76

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 76

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 77

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 77

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Gln Val Thr Thr Ala Val Gly Gly Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Glu
 115 120

<210> 78

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 78

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

1 5 10 15

Gln Arg Thr Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg

100 105 110

<210> 79

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 79

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

1 5 10 15

Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Arg Ile Phe Tyr Asn Gly Arg Thr Tyr Ala Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 80

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 80

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 81

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> antibody of clostridium botulinum

<400> 81

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

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Gly Gln Ile Leu Tyr Tyr Tyr Val Gly Ser Pro Ala Trp
 100 105 110
 Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120 125

<210> 82

<211

> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 82

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

65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

 85 90 95
Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105 110

<210> 83

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle \langle 223 \rangle$

> antibody of clostridium botulinum

<400> 83

Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly
			20					25					30		
Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Met	Gly	Tyr	Ile	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
	50					55					60				

Lys	Asn	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe
65					70					75					80
Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Arg	Asp	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110	
Thr	Ala	Leu	Thr	Val	Ser	Ser									

115

<210> 84

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 84

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

1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Ser Asp Thr Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Ala Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 85

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 85

Glu Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val

35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Asp Arg Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 86

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 86

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asn Ser
20 25 30

His Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

85 90 95
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 87

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 87

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Arg Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 88

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 88

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Leu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 89

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 89

Gln Ile Gln Leu Ala Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 90

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody of clostridium botulinum

<400> 90

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

1 5 10 15

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