



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201839134 A

(43)公開日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：107123545

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 21 日

(51)Int. Cl.：

C12N9/50 (2006.01)

C07K14/33 (2006.01)

C12P21/06 (2006.01)

A61K38/16 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/11/21

世界智慧財產權組織

PCT/EP2012/073283

(71)申請人：英商益普生生物創新公司 (英國) IPSEN BIOINNOVATION LIMITED (GB)

英國

(72)發明人：拉梅爾 安德烈亞 RUMMEL, ANDREAS (DE)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：22 共 135 頁

(54)名稱

製造經蛋白分解處理之多肽之方法

METHODS FOR THE MANUFACTURE OF PROTEOLYTICALLY PROCESSED POLYPEPTIDES

(57)摘要

本發明關於具蛋白分解活性之多肽及彼之多種用途。

The present invention relates to proteolytically active polypeptides and various uses thereof.

指定代表圖：

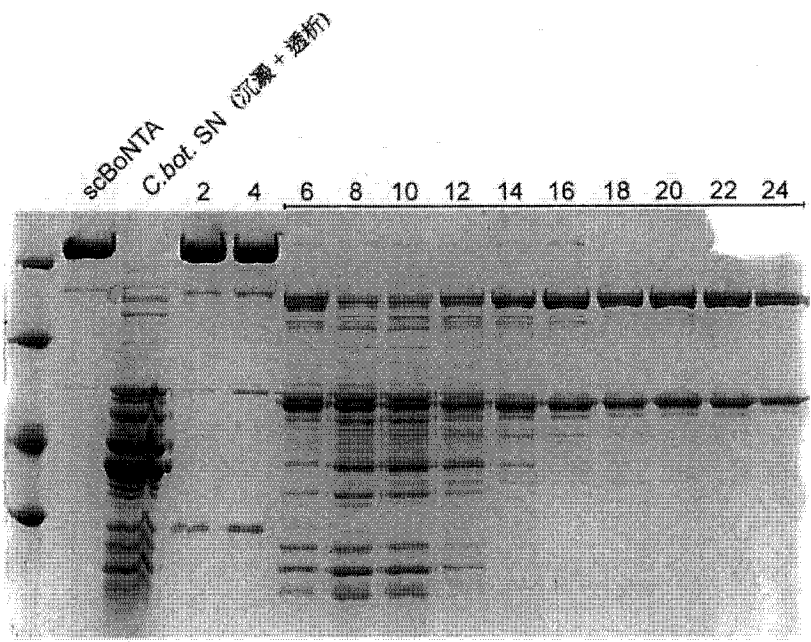


圖 1

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

製造經蛋白分解處理之多肽之方法

METHODS FOR THE MANUFACTURE OF PROTEOLYTICALLY
PROCESSED POLYPEPTIDES

【技術領域】

[0001] 本發明關於具蛋白分解活性之多肽及彼於篩選及製造方法之多種用途。

【先前技術】

[0002] 肉毒芽胞梭菌 (*Clostridium botulinum*) 及破傷風芽胞梭菌 (*Clostridium tetani*) 皆產生高度強效之神經毒素，分別為肉毒神經毒素 (BoNT) 及破傷風神經毒素 (TeNT)。這些芽胞梭菌之神經毒素 (CNT) 與神經元細胞專一性結合，擾亂神經傳遞物質的釋放。肉毒芽胞梭菌 (*Clostridium botulinum*) 分泌七種以 A 至 G 命名之不同抗原性之肉毒神經毒素 (BoNT) 血清型。所有血清型以及由破傷風芽胞梭菌 (*Clostridium tetani*) 分泌之相關破傷風神經毒素 (TeNT)，皆為阻斷突觸胞吐作用之 Zn^{2+} -內蛋白酶，彼等切割與控制細胞膜融合之 SNARE 複合體形成有關之蛋白。CNT 造成在肉毒症及破傷風中可見之弛緩性肌肉痲痺。此外，CNT 活性也顯示會影響腺體分

泌。這些 CNT 在肌肉及腺體活性之生理作用，日益用於多種治療及美容應用。肉毒神經毒素血清型 A (BoNT/A) 於 1989 年在美國被核准用於治療人類的斜視、臉痙攣及其他異常。市面上可購得肉毒神經毒素 A 之蛋白製劑，例如商品名 BOTOX (Allergan Inc.) 及商品名 DYSPORT (Ipsen Ltd)。在治療應用上，該包含神經毒素與其他細菌蛋白之複合物被直接注射至待治療之肌肉。在生理性 pH 之下，毒素會自該蛋白複合物釋放 (Eisele *et al.* 2011, *Toxicon* 57(4):555-65.)，然後發生所欲之藥理作用。一種經改善之不含複合蛋白之 BoNT/A 製劑業已上市，商品名為 XEOMIN 或 Bocouture (Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt/Germany)。BoNT 之作用僅為暫時性，所以經常需要重複投予 BoNT 以維持治療效應。

[0003] 各種 CNT 剛開始皆被合成為不活化之單鏈多肽。以 BoNT 為例，該神經毒素多肽具有約 150 kDa 之分子量。此單鏈多肽之轉譯後處理涉及在稱為圈環 (loop) 之暴露區域 (見表 1) 之限制性蛋白分解及形成鄰近之雙硫鍵。活性雙鏈神經毒素，係由蛋白水解該單鏈前體多肽所產生之二個切割產物組成：約 50 kDa 之 N 端輕鏈及約 100 kDa 之重鏈，二者由雙硫鍵連接。CNT 的結構由三個結構域組成，即酶催化性輕鏈、包含轉位結構域 (N 端半體) 及受體結合結構域 (C 端半體) 之重鏈 (參照 Krieglstein 1990, *Eur J Biochem* 188:39; Krieglstein 1991,

Eur J Biochem 202:41; Krieglstein 1994, J Protein Chem 13:49; Lacy et al., 1998, Nat. Struct.Biol.5(10):898-902)。根據存在單鏈上介於形成該酶催化性結構域之胺基酸殘基，與形成該轉位結構域之胺基酸殘基之間的切割位點數量，內肽酶活性可產生二個大型切割產物（即輕鏈和重鏈），還有代表前述之在神經毒素之單鏈中橋接輕鏈及重鏈之圈環區域之特徵性短肽（參照下表 1）。

[0004] 自醱酵溶液純化 CNT 是一項特別的挑戰，因為其中包含的神經毒素為未經處理多肽、部分處理多肽及完全處理多肽之混合物，彼等全都具有非常類似之生化及物理特性。當內蛋白分解活性水解該輕鏈與該圈環之間的肽鍵，然而該圈環與該重鏈 N 端之間的肽鍵仍為完整時，通常產製部分處理之神經毒素。另外，當該內蛋白分解活性自該重鏈釋放該圈環肽，但該圈環肽與該輕鏈之 C 端之間的肽鍵尚未被水解時，也會產生部分處理之神經毒素。根據醱酵條件及神經毒素之種類，不含圈環肽之完全處理多肽可受到 5% 至 90% 之部分處理或未處理多肽的嚴重污染。然而在一些情況中，神經毒素主要為未經處理，在治療使用之前需要經內肽酶處理以變成具有生物活性。

[0005] 現有技術描述多種利用異源性蛋白酶處理芽胞梭菌神經毒素，以減少未經處理或部分處理之前體蛋白的量之方法。最廣為使用來活化芽胞梭菌神經毒素之蛋白酶係胰蛋白酶，雖然可有用地活化芽胞梭菌神經毒素血清型 B（BoNT/B）及 E（BoNT/E）（DasGupta & Sugiyama

1972, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*48:108-112; Kozaki *et al.*, 1974, *Infect.Immun.*10:750-756), 但其會產生二次產物 (想必藉由靠近 BoNT/A 之重鏈次單位之 C 端的蛋白分解作用), 因此破壞毒素與其細胞受體之結合 (Shone *et al.*, 1985, *Eur.J. Bioch.*151:75-82)。理論上, 自天然宿主 (例如產製 BoNT/A 之肉毒芽胞梭菌) 分離之內源性蛋白酶應可產製更專一之切割產物。因此, 許多研究嘗試自天然宿主細胞分離參與芽胞梭菌神經毒素之蛋白分解活化之內源性蛋白酶。Dekleva 與 DasGupta (Dekleva & DasGupta, 1989, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*162:767-772) 自產製 BoNT/A 之肉毒芽胞梭菌培養液, 純化能蛋白分解切割 BoNT/A 成為重鏈及輕鏈次單位之組分。相同作者稍後之研究, 進一步特徵化自肉毒芽胞梭菌分離之內源性蛋白酶 (Dekleva & DasGupta, 1990, *J. Bact.*172:2498-2503), 顯示一種由 15.5 kDa 多肽與 48 kDa 多肽組成之 62kDa 之蛋白。然而, 觀察 CNT 在限制性暴露於 Dekleva 與 DasGupta 之 62kDa 蛋白之後的大型斷裂, 該經分離之蛋白酶可能不是在芽胞梭菌細胞培養及感染期間負責活化 CNT 之尚未經識別之蛋白分解酶。事實上, 其他學者最近指出梭菌蛋白酶 (Clostripain), 也被稱為梭菌肽酶 B (Mitchel & Harrington, 1968, *JBC* 243:4683-4692), 可能參與 CNT 之特定活化 (Sebaihia *et al.*, 2007, *Genome Res.*17(7):1082-1092; WO2009/014854)。有趣的是, 此酶之結構及受質專一性讓人想起溶組織芽胞梭菌

(*Clostridium histolyticum*) 所分泌之 α 梭菌蛋白酶的該些特性 (Dargatz et al.1993), 彼之同系物 (具有 74% 胺基酸一致性) 存在於肉毒芽胞梭菌 (*C.botulinum*) 中 (CBO1920)。溶組織芽胞梭菌 α 梭菌蛋白酶是一種對精胺鹽基鍵具有嚴格專一性之半胱胺酸內肽酶。其被合成為非活化之前原酶, 經歷自催化切割以產生 15.4 及 43 kDa 多肽, 二者相連以形成異二聚體活性酶 (Dargatz et al.1993)。溶組織芽胞梭菌 α 梭菌蛋白酶與肉毒芽胞梭菌 62 kDa 蛋白酶皆需要還原劑及鈣以達完全活性, 且容易受到相同的蛋白酶抑制劑抑制。這些資料強烈指出, α 梭菌蛋白酶之肉毒芽胞梭菌同系物 (CBO1920) 是負責蛋白分解切割肉毒芽胞梭菌之神經毒素的內源性蛋白酶。編碼梭菌蛋白酶 (CPE0846) 之基因亦存在於產氣莢膜芽胞梭菌 (*C.perfringens*) 中, 研究發現該基因受到二成分系統 VirR/VirS 之正調節 (Shimizu et al.2002b)。

[0006] 然而直到今日, 仍缺乏進一步結論性的實驗證據, 該領域仍然沒有能夠有效轉換單鏈前體 CNT, 成為真正成熟切割產物 (即雙鏈神經毒素) 之蛋白酶。本發明解決上述一或多個問題。

[0007] 用於減少未經處理及／或部分處理之神經毒素肽, 藉以改善神經毒素製劑之品質的手段和方法係高度所欲但尚不可得。因此, 本發明之潛在技術問題可被視為藉由符合前述需求提供用於改善神經毒素多肽之製造之手段和方法。該技術問題係藉由以下申請專利範圍及本文中

所述之實施態樣解決。

【發明內容】

[0008] 因此，本發明之一態樣關於一種具蛋白分解活性之多肽，其包含與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列。在另一態樣中，本發明關於一種具蛋白分解活性之多肽，其係由與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列組成。在另一態樣中，本發明關於一種具蛋白分解活性之多肽，其係由如 SEQ ID NO:1 所示之多肽序列組成。

[0009] 此處所使用之用語「具蛋白分解活性之多肽」，係指本發明之多肽的酶催化功能，且表示本發明之多肽可水解肽鍵。在一態樣中，「具蛋白分解活性之多肽」係指能夠水解包含選自 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者之胺基酸序列的多肽之多肽。此處所使用之用語「不具蛋白分解活性之多肽」，係指本發明之多肽的酶催化功能，且表示本發明之多肽無法水解肽鍵。

[0010] 藉由測定多肽之蛋白分解活性，技藝人士可決定根據此處所述之序列定義之多肽，是否為本發明之多肽。一種用於檢測蛋白分解活性之試驗或測定系統包含：使包含與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列之多肽，與測試底物接觸。測試底物通常是已知可被本發明之多肽切割之多肽。較佳地，該測試底物係 CNT，諸如 BoNT 或彼之片段。該測試底物可為例如未經

切割／未經處理之 BoNT（在此處稱為「scBoNT」）且可以是例如血清型 A、B、C1、D、E、F 或 G（例如，「scBoNT/A」、「scBoNT/B」等），或者該測試底物可為破傷風神經毒素。或者，該測試底物可為芽胞梭菌神經毒素之片段，該片段包含選自 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者之胺基酸序列。該片段可為具有 50 個或更多胺基酸殘基之多肽，或具有最多 49 個胺基酸殘基之肽。在本說明書中，用語「多肽」係指具有 50 個或更多胺基酸殘基之分子，而用語「肽」係指具有 2 至 49 個胺基酸殘基之分子。在一態樣中，該測試底物係稱為 LH_N 之可溶性神經毒素片段，其包含輕鏈多肽、暴露圈環肽區域及重鏈多肽之 N 端半體（即轉位結構域 H_N）。在另一態樣中，該測試底物係，或包含選自 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者之肽（參照表 1）。在另一態樣中，該測試底物係嵌合性神經毒素，其包含源自二或多種血清型之胺基酸殘基。

[0011] 用於測定蛋白分解活性之分析，通常包含測定該測試底物轉換成彼之切割產物之程度的步驟。在多肽與測試底物接觸之後，觀察到產生一或多個切割產物，或觀察到切割產物之量增加，表示該多肽具有蛋白分解活性。該測定步驟可能涉及比較底物與切割產物。該比較可能涉及測定底物之量及／或一或多種切割產物之量，且亦可能涉及計算底物與切割產物之比率。此外，用於測定蛋白分解活性之分析可能包含比較試樣與參考試樣之步驟，其中該參考試樣通常包含（a）多肽，其包含與 SEQ ID

NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列，且已知具有蛋白分解活性，及 (b) 測試底物，其已知可被 (a) 之多肽切割。在一態樣中，用於測定蛋白分解活性之分析包含，藉由電泳或管柱層析及 (可任選的) 光譜分析，分離底物與切割產物。很方便的是，以一或多種標記標示測試底物，以更輕易地檢測測試底物之減少及/或產物之增加。此處所使用之用語「標記」係指可檢測之標誌，包括例如放射性標記、抗體、螢光標記。測試底物及/或切割產物之量可藉由例如放射顯影術或光譜法測定，包括基於至少二種標記之間的能量共振轉移之方法。或者，可使用免疫學方法例如西方墨點或 ELISA 來檢測。用於測定本發明之多肽的蛋白分解活性之較佳方法，係描述於下列用於說明本發明之實施方式中。在本發明特別較佳之實施態樣中，在 37°C 下、120 分鐘內使用選自 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 或 PBS (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4) 之緩衝液，若超過 20%、較佳地超過 95% 之測試底物被轉換成切割產物例如輕鏈及重鏈，則多肽具有蛋白分解活性。若測試底物不是全長神經毒素，而是例如該全長神經毒素之片段或該神經毒素之衍生物，仍適用該相同條件。很明顯的，此時切割產物將有所不同。不過，技藝人士仍可定量該對應之切割產物。在另一態樣中，該分析通常使用 100 ng 之具蛋白分解活性之多肽及相對於底物 1:100 之莫耳比。在又一態樣中，可間隔採集試樣以了解不同時間之酶催化活性。此分析可藉由使用例

如多種量之具蛋白分解活性之多肽加以改良。

[0012] SEQ ID NO:2 顯示衍生自肉毒芽胞梭菌株 ATCC 3502 之不具蛋白分解活性之多肽的多肽序列，GenBank 寄存編號「CAL82988.1」，其具有 581 殘基之胺基酸長度。SEQ ID NO:1 顯示 SEQ ID NO:2 之具蛋白分解活性之衍生物，其缺乏 SEQ ID NO:2 之胺基酸殘基 1 至 248。

[0013] 用語「包含與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列之多肽」係指一種多肽，其與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 之序列一致性。此外，該用語係指一種多肽，其包含與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列。該多肽可具有額外之胺基酸，例如在 SEQ ID NO:1 所示之序列的內部位置或 N 或 C 端，或在與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 一致性之胺基酸序列的內部位置或 N 或 C 端，其中甲硫胺酸可能存在於該多肽之 N 端。此外，該用語係指一種多肽，其缺乏例如在 SEQ ID NO:1 所示之序列的內部位置或 N 或 C 端之一或多個胺基酸殘基或在與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 一致性之序列的內部位置或 N 或 C 端之一或多個胺基酸殘基。

[0014] 此處所使用之用語「序列一致性」係指，測定參考胺基酸序列與詢問序列之間的一致性，其中該等序列係經排比以獲得最高等級之匹配，且該一致性可利用電腦程式編碼之公開技術或方法計算，例如 BLASTP、

BLASTN、FASTA (Altschul 1990, J Mol Biol 215: 403)。一致性之百分比數值在一態樣中係針對整個胺基酸序列計算。在另一態樣中，序列一致性係針對最高 50aa 殘基、最高 100aa 殘基、最高 150aa 殘基、最高 250aa、300aa、350aa、400aa、450aa、500aa 或 550aa 殘基之序列長度計算。在另一態樣中，序列一致性係針對至少 50aa 殘基、至少 100aa 殘基、至少 150aa 殘基或至少 250aa 殘基計算。在較佳之實施態樣中，序列一致性係針對 SEQ ID NO:1 或 2 的整體長度測定，即分別針對 333aa 或 581aa 的長度。根據多種演算法之程式系列可被技藝人士取得，以用來比較不同序列。在此情況下，尼德曼和文施 (Needleman and Wunsch) 演算法或史密斯和華特曼 (Smith and Waterman) 演算法產生特別可靠之結果。為了進行序列比對及計算此處列舉之序列一致性數值，針對整體序列區域使用根據 Clustal W 演算法之商用程式 DNASTAR Lasergene MegAlign (7.1.0 版)，設定如下：成對排比參數：缺口罰分：10.00，缺口長度罰分：0.10，蛋白重量矩陣：Gonnet 250 (除非另行說明，否則總是被用來作為序列排比之標準設定)。

[0015] 此處所使用之用語「至少 50% 之序列一致性」，係指至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或 100%。

[0016] 本發明之具蛋白分解活性之多肽可與如 SEQ

ID NO:1 所示之參考多肽序列具有相同數量之胺基酸。本發明亦包含具有額外或較少胺基酸殘基之多肽。在一態樣中，本發明之具蛋白分解活性之多肽係（或包含）SEQ ID NO:1 或 2 之截短突變物，或與 SEQ ID NO:1 或 2 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽之截短突變物。SEQ ID NO:2 之截短突變物可能缺乏例如胺基酸位置 249 之 N 端的一或多個胺基酸殘基。截短突變物可為具有蛋白分解活性之 N 端或 C 端截短突變物及／或內部截短突變物。在一態樣中，SEQ ID NO:2 之該截短突變物缺乏 SEQ ID NO:2 之胺基酸位置 1 至 248。在另一態樣中，SEQ ID NO:2 之截短突變物係 C 端截短突變物。在一態樣中，該截短突變物缺乏最多 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、50、100、150 或最多 170 個連續胺基酸殘基。在另一態樣中，本發明之具蛋白分解活性之多肽具有至少 200aa 殘基、至少 250aa 殘基、至少 300aa 殘基、或至少 333aa 殘基之胺基酸長度。在另一態樣中，本發明之具蛋白分解活性之多肽具有最多 333aa 殘基、最多 350aa 殘基、最多 573 殘基、最多 581aa 殘基、最多 592aa 殘基、最多 600aa 殘基、或最多 617aa 殘基。

[0017] 在另一態樣中，本發明之具蛋白分解活性之多肽包含：在 SEQ ID NO:1（或與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列）之多肽鏈的 N 或 C 端及／或內部位置包含額外胺基酸殘基之多肽。這些額外的胺基酸殘基可包含最多 5、最多 10 或甚至最多 200、

300 或最多 400 個連續胺基酸殘基。在一態樣中，該額外之胺基酸殘基作為蛋白分解活性之抑制劑。在另一態樣中，該額外之胺基酸殘基可藉由蛋白酶移除。在另一態樣中，排除抑制本發明之多肽之蛋白分解活性之額外殘基。該額外之胺基酸殘基可能側接一或多個蛋白酶切割位點。在另一態樣中，該額外之胺基酸序列作為可檢測標籤及／或允許與固體支持結合。

[0018] 在另一態樣中，SEQ ID NO:1（或與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列）之多肽鏈係藉由交換一或多個胺基酸殘基修飾。此處所使用之用語「交換」係指以不同的胺基酸取代一胺基酸。例如，在多肽序列之內最多 1aa、2aa、3aa、4aa、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、15aa、20aa 或最多 50aa 可能被取代。交換可能涉及保守性或非保守性胺基酸改變，以期例如增加或減少本發明之多肽的底物結合或蛋白分解活性。

[0019] 在一態樣中，本發明之具蛋白分解活性之多肽包含能水解底物成為二或多個天然切割產物之多肽。在另一態樣中，本發明之多肽水解底物成為二或多個與該天然切割產物不同之切割產物。此處所使用之用語「天然切割產物」或「天然產物」係指，當與野生型細胞培養中自相同底物產製之產物比較時，具有一致胺基酸序列之源自該底物之產物。在一態樣中，該切割產物係肉毒神經毒素或破傷風神經毒素之雙鏈神經毒素，在另一態樣中，該雙鏈神經毒素係自肉毒芽胞梭菌血清型 A、B、C1、D、E、

F 或 G 分離之神經毒素。在又一態樣中，該雙鏈神經毒素係天然雙鏈神經毒素。

[0020] 表 1 顯示 TeNT 及 BoNT/A-G 之前體、天然雙鏈神經毒素，並識別包含被本發明之多肽切割之胺基酸序列之暴露圈環。

毒素	暴露圈環	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

[0021] 應了解的是，上述及下列用語之定義及解釋比照適用於本說明書中所述之所有態樣，除非另行說明。

[0022] 本發明之具蛋白分解活性之多肽適用於多種應用。一種商業重要應用係彼之於產製治療性神經毒素之用途，例如該些自肉毒芽胞梭菌分離者。目前，用於製備商用肉毒神經毒素製劑之肉毒芽胞梭菌細胞培養，受到大量經部分處理及／或未經處理之神經毒素的污染，二者皆不良地損害（即減少）該等醫藥組成物之特定活性。在例如溶解肉毒芽胞梭菌之後使用本發明之具蛋白分解活性之多肽，將有可能處理包含未經處理及／或部分處理之神經毒素之組成物，且因此將該些污染物轉換成完全處理之神經毒素。因此，可提供具有增加神經毒素特定活性之商業製品，其中細菌蛋白之總量可被減少，進一步減少病患形成抗體之風險。

[0023] 在另一態樣中，本發明關於一種包含編碼本發明之多肽之核酸序列及可任意選擇地調節元件之核酸分子。此處所使用之用語「調節元件」係指基因表現（包括轉錄及轉譯）之調節元件，且包括例如 tata 盒、啟動子、增強子、核糖體結合位點、Shine-Dalgarno 序列、IRES 區、聚腺苷酸化信號、末端加蓋結構及類似者。該調節元件可包含一或多種異源性調節元件或一或多種同源性調節元件。「同源性調節元件」係本發明之核酸分子所自其衍生之野生型細胞之調節元件，其與該野生型細胞中該核酸分子或該多肽之基因表現的調節有關。本發明亦包含包含

異源性調節元件之核酸分子。用語「異源性調節元件」係與該野生型細胞中該核酸分子或該多肽之基因表現的調節無關之調節元件。也包含誘導性表現之調節元件，例如誘導性啟動子。該核酸分子可為例如 hnRNA、mRNA、RNA、DNA、PNA、LNA 及／或經修飾之核酸分子。該核酸分子可為環狀、線性、嵌入基因組或附加型核酸。也包含編碼融合蛋白之連環體，該融合蛋白包含本發明之 3、4、5、6、7、8、9 或 10 個多肽。另外，該核酸分子可包含編碼用於細胞內運輸之信號序列之序列，例如用於運輸進入細胞內區室或用於運輸通過細胞膜之信號。

[0024] 在另一態樣中，本發明關於包含如本發明之核酸分子之核酸分子的載體。載體可適用於活體外及／或活體內表現本發明之多肽。該載體可為暫時及／或穩定基因表現之載體。在一實施態樣中，該載體另包含調節元件及／或選擇標誌。該載體在一實施態樣中係病毒來源，在另一實施態樣中係噬菌體來源，在又一實施態樣中係細菌來源。

[0025] 在另一態樣中，本發明關於包含本發明之核酸分子或載體之細胞。此處所使用之用語「細胞」包含適用於表現該核酸分子或該載體及特別是本發明之多肽之原核及／或真核細胞。該細胞可為不表現本發明之多肽或彼之同系物之宿主細胞。此處所使用之用語「同系物」係指一種多肽，其包含與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列。然而，本發明亦包含表現本發明

之多肽或彼之同系物之細胞，特別是野生型細胞。在特定態樣中，本發明之細胞係選自肉毒芽胞梭菌（*C. botulinum*）、酪酸芽胞梭菌（*C. butyricum*）、巴拉提尼芽胞梭菌（*C. baratii*）及破傷風芽胞梭菌（*C. tetani*）。在較佳之態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌血清型 A、B 或 F。在另一態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌 Hall 株（ATCC 3502）。在另一態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌之 BoNT/A 生產株 ATCC 19397，又稱為 NCTC 4587 及 NCTC 7272。在另一態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌之 BoNT/A 生產株 NCTC 2916。在另一態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌之 BoNT/A2 生產株 Kyoto-F 及 Mauritius / NCTC 9837。在另一態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌之 BoNT/A3 生產株 A254 Loch Maree / NCTC 2012。在另一態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌之 BoNT/A4 及 B 生產株 CDC657。在另一態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌之 BoNT/A5 及 B3'生產株 H04402 065。在另一態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌之 BoNT/B1 生產株 Okra / NCTC 7273。在另一態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌之 BoNT/B 及 F 生產株 CDC4013 / NCTC 12265。在另一態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌之 BoNT/F1 生產株 Langeland / NCTC 10281。在另一態樣中，該細胞係產芽胞梭菌（*Clostridium sporogenes*）、產氣莢膜芽胞梭菌（*Clostridium perfringens*）、丙酮丁醇梭菌（*Clostridium acetobutylicum*）、臘狀桿菌（*B. cereus*）、蘇力菌（*B.*

thuringiensis)、蕈狀芽孢桿菌 (*B. mycoidis*)、嗜熱溶蛋白芽孢桿菌 (*B. thermoproteolyticus*)、炭疽桿菌 (*B. anthracis*)、巨桿菌 (*B. megaterium*)、枯草桿菌 (*B. subtilis*)、大腸桿菌 (*E. coli*) 或酵母菌細胞。在一態樣中，本發明之多肽係於細胞內經修飾（即糖基化、磷酸化、經蛋白酶處理等）。修飾亦包括添加非蛋白性輔因子包括金屬離子。包含如上所述之不具蛋白分解活性、任何中間多肽產物以及此處揭示之最終具蛋白分解活性之多肽之細胞係包含於本發明中。本發明亦包含的是，包含本發明之多肽之表現誘導子之細胞。該表現誘導子可為核酸分子或多肽或化學實體，包括具有增加本發明之具蛋白分解活性之多肽於細胞培養或彼之溶解物中之量或活性的作用之小化學實體。該表現誘導子可例如增加編碼本發明之多肽之核酸分子的轉錄或轉譯。或者，該表現誘導子可為能活化該不具蛋白分解活性之多肽 SEQ ID NO:2（或包含與 SEQ ID NO:2 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列之多肽）的化合物。在一態樣中，該細胞包含誘導子，其係能移除該多肽之 N 端的抑制性胺基酸殘基之具蛋白分解活性之多肽。該誘導子可藉由例如該領域之技藝人士所知之重組方法表現。或者，該誘導子可自細胞分離，例如芽胞梭菌細胞。

[0026] 本發明亦關於本發明之核酸分子於製造本發明之具蛋白分解活性之多肽之用途。

[0027] 在相關態樣中，本發明關於一種製造具蛋白

分解活性之多肽之方法，該方法包括下列步驟：（a）化學合成或自核苷酸序列轉譯多肽，該多肽包含與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列；及（b）純化步驟（a）之多肽。

[0028] 用語「化學合成」係指藉由化學手段合成多肽。該等方法係回顧於例如 Nilsson et al., Ann.Rev. Biophys.Biomol.Struct.2005.34:91-118。用語「純化多肽」係指自包含本發明之多肽之混合物移除除了該多肽以外之化合物。該用語亦表示自包含除了本發明之多肽以外之化合物的混合物移除該多肽。在特定態樣中，該用語表示自彼之不具蛋白分解活性之前體分離該具蛋白分解活性之多肽。

[0029] 核酸可在細胞或無細胞系統中被轉譯。多種無細胞轉譯系統為該領域之技藝人士可用。本發明包含例如在無細胞蛋白轉譯系統中轉譯，包含兔網狀紅血球溶解物、小麥胚芽溶解物、大腸桿菌溶解物或其他細胞溶解物，例如產自肉毒芽胞梭菌之溶解物等。本發明亦包含自本發明之核苷酸序列或本發明之載體轉譯本發明之多肽。轉錄可能藉由一或多種異源性調節元件或同源性調節元件調節或控制。本發明之此態樣亦包含於野生型細胞中轉譯，即自天然分離之細胞，例如肉毒芽胞梭菌（*C. botulinum*）、酪酸芽胞梭菌（*C. butyricum*）、巴拉提尼芽胞梭菌（*C. baratii*）及破傷風芽胞梭菌（*C. tetani*）之任何已知分離株。在特定態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌

(*C. botulinum*) Hall 株 (ATCC 3502)。多種標準手段和方法可被該領域之技藝人士所用，以將核酸分子或載體帶入細胞中並且在細胞中將本發明之多肽表現為重組蛋白。另外，技藝人士知曉許多自細胞或細胞溶解物或自無細胞表現系統分離多肽之標準技術（例如 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）。任何這些手段和方法都可使用於本發明之方法中。

[0030] 本發明之第一多肽可自編碼該具蛋白分解活性之多肽之核酸分子轉譯。SEQ ID NO:26 係該核酸分子之一例。或者，該核酸分子可編碼一不具蛋白分解活性之前體多肽，但該前體多肽可被轉換成本發明之具蛋白分解活性之多肽。SEQ ID NO:27 係該核酸分子之一例。該不具蛋白分解活性之前體亦稱為「不活化之 BoNT 水解酶」，簡稱 iBH。此不具蛋白分解活性多肽可在例如轉譯期間或轉譯後活化，或藉由例如使該不具蛋白分解活性多肽與能移除該不具蛋白分解活性多肽之 N 端的不活化胺基酸殘基之蛋白酶接觸。不具蛋白分解活性多肽之一實例係由 SEQ ID NO:2 所表示之多肽。另一實例係包含與 SEQ ID NO:2 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列之多

肽。在一態樣中，用語「N 端之不活化胺基酸殘基」關於該多肽之前 248aa 殘基。在另一態樣中，此用語係指該多肽之最多 10aa、50aa、100aa、150aa、200aa、250aa 殘基之片段。任何該等多肽皆可用於本發明之方法以製造具蛋白分解活性之多肽。在一態樣中，能自此多肽之 N 端移除不活化胺基酸殘基之蛋白酶係自例如肉毒芽胞梭菌、酪酸芽胞梭菌、巴拉提尼芽胞梭菌及破傷風芽胞梭菌分離。在另一態樣中，能移除該不活化胺基酸之蛋白酶係藉由提供該細胞之經分餾溶解物或不經分餾溶解物提供。不活化之胺基酸殘基可藉由使該不具蛋白分解活性之多肽與該溶解物接觸且培養直到該不具蛋白分解活性之多肽被轉變成為具蛋白分解活性之多肽加以移除。

[0031] 在本發明之方法的另一態樣中，該多肽係於細胞中轉譯。該細胞可能是原核或真核細胞。在一態樣中，該細胞係選自大腸桿菌、枯草桿菌或酵母菌；大腸桿菌係高度較佳之宿主細胞。本發明亦包含在野生型細胞（即自天然分離之細胞）中轉譯本發明之多肽，例如肉毒芽胞梭菌、酪酸芽胞梭菌、巴拉提尼芽胞梭菌及破傷風芽胞梭菌之任何已知分離株。在特定態樣中，該細胞係肉毒芽胞梭菌（*C. botulinum*）Hall 株（ATCC 3502）。在另一特定態樣中，該細胞係如上述之本發明之細胞。

[0032] 由本發明之方法獲得之轉譯產物可藉由多種手段純化，該等手段皆為該領域之技藝人士所知（例如 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)。典型之純化本發明之多肽之方法可能涉及離心細胞溶解物、硫酸銨沉澱蛋白、重懸蛋白、離心經重懸之蛋白、離子交換層析、分子排阻層析、疏水性交互作用層析及類似者。該等步驟之許多不同順序之組合可被用於純化本發明之多肽。純化本發明之多肽之較佳方法係描述於說明本發明之實施方式中。

[0033] 在一態樣中，該純化步驟包含使本發明之多肽與固體支持結合。用語「固體支持」係指包含例如矽石、交聯葡聚糖、交聯聚丙醯胺或交聯洋菜糖及類似者之基材。亦包括特別是多肽、玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚乙二醇（PEG）、葡聚糖、耐綸、澱粉酶、天然及經改質之纖維素、聚丙醯胺、輝長岩及磁鐵礦。在本發明之一態樣中，固體支持係選自下列之多醣基材：瓊脂糖、葡聚糖凝膠、洋菜糖、葡聚糖纖維素、微晶纖維素及藻酸鹽珠。在另一態樣中，該固體支持可由玻璃珠及／或多肽基體組成。

[0034] 在一態樣中，固體支持係與本發明之抗體連接。用語「連接」在一態樣中係指穩定連接或穩定相連。在另一態樣中，連接包括例如間接或直接、非可逆或可逆、物理化學、靜電及／或共價鍵交互作用。在一態樣

中，該抗體係直接或經由連接子分子與該固體支持共價連接。該抗體可經由連接子與該固體支持連接，包括小分子化合物及肽（或多肽）連接子分子。該固體支持可具有幾乎任何可能的結構構型或安排，只要該經耦合之抗體能與彼之抗原結合。因此，該基材或固體支持可為球狀（如珠）或圓柱狀（如試管內側表面或棒桿之外側表面）。或者，該表面可為不規則或平面，例如薄板或測試條。

[0035] 與固體支持連接之該抗體可被用於例如本發明之製造方法或診斷方法中。在一態樣中，該製造方法可包含親和性層析之步驟，其中該親和性層析係基於與固體支持連接之抗體。在一實施態樣中，該抗體係與本發明之具蛋白分解活性之多肽專一性結合之抗體。在另一實施態樣中，該抗體係與本發明之不具蛋白分解活性之多肽專一性結合之抗體。

[0036] 在另一態樣中，製造本發明之具蛋白分解活性之多肽之方法包含自包含額外成分之混合物純化本發明之多肽。純化可根據例如極性、電荷及大小。因此，該方法在一態樣中可能包含一或多種選自下列之分離步驟：正相 HPLC、逆相 HPLC、親水性交互作用層析（HILIC）、疏水性交互作用層析（HIC）、離子交換層析（IEC）（包括陰離子交換層析及陽離子交換層析）、分子排阻層析（SEC）、凝膠滲透層析（GPC）。

[0037] 在另一態樣中，該純化包含下列步驟：（a）藉由陰離子交換層析分離；（b）藉由分子排阻層析分

離；（c）藉由疏水性交互作用層析分離；及（d）藉由分子排阻層析分離。

[0038] 自層析管柱收集之一或多種組分可藉由例如沉澱或超過濾濃縮。

[0039] 在一態樣中，本發明關於包含本發明之具蛋白分解活性之多肽之組成物。使用此處揭示之方法，有可能製造本發明之具蛋白分解活性之多肽，其實質上不含不具蛋白分解活性之多肽。換言之，本發明之方法提供具蛋白分解活性之多肽及包含無本發明之多肽的不活化前體蛋白實質污染之組成物。組成物被視為不包含實質污染或實質上不含不具蛋白分解活性之前體多肽，若使用西方墨點檢測方法，低於 5% 之不具蛋白分解活性之前體可被檢測，其中該 5% 係指不具蛋白分解活性之前體相對於具蛋白分解活性與不具活性之多肽總量之量。在另一態樣中，該組成物係實質上純的，且包含至少 50% 之本發明之具蛋白分解活性之多肽，其中該 50% 係指具蛋白分解活性前體相對於該組成物所包含之蛋白總量之量。在另一態樣中，該實質上純的組成物包含至少 75%、80%、90% 或至少 98% 具蛋白分解活性之多肽。

[0040] 在另一態樣中，本發明亦關於可自上述及實施方式中所說明之製造具蛋白分解活性之多肽之方法獲得之多肽。該具蛋白分解活性之多肽在一態樣中係具有 SEQ ID NO:1 之多肽序列之具蛋白分解活性之多肽。在另一態樣中，具蛋白分解活性之多肽係與 SEQ ID NO:1 之序列具

有至少 50% 序列一致性之多肽。在又一態樣中，具蛋白分解活性之多肽係包含與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列之多肽。此處所使用之用語「可獲得之多肽」在一態樣中係指自本發明之核酸轉譯之多肽。該多肽接著可進行轉譯後修飾，例如醃基化、烷基化、醃胺化、胺基酸添加、胺基酸刪除、糖基化、氧化、S-麩胱甘肽化、磷酸化、硫酸化、蛋白分解處理及類似者。另外，該多肽可能與金屬離子結合，例如 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ag^+ 、 Cs^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 。較佳地，該金屬離子係 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Co^{2+} 。

[0041] 本發明在一態樣中亦關於與本發明之多肽專一性結合之抗體。此處所使用之用語「抗體」包含單株抗體、多株抗體、單鏈抗體、人抗體、人化抗體、靈長動物化抗體、嵌合抗體、雙特異性抗體、合成性抗體、經化學或酶改質之衍生物、任何該等抗體之片段或由天然存在及／或化學修飾之核酸組成之適體。該等抗體之片段包括 F(ab')_2 、 F(ab) 、 Fv 或 scFv 片段或任何該等片段之經化學或酶修飾之衍生物。

[0042] 在一態樣中，本發明之抗體將與本發明之具蛋白分解活性之多肽或彼之不具蛋白分解活性之前體專一性結合。在一態樣中，對本發明之具蛋白分解活性之多肽具專一性之抗體與此處所述之不具蛋白分解活性之多肽交叉反應。在另一態樣中，該抗體能區別本發明之具蛋白分解活性之多肽與彼之不具活性之前體。在另一態樣中，該

抗體專一性之表位係位於該不具蛋白分解活性之多肽之胺基酸區域，但不存在於具蛋白分解活性之多肽。例如，該表位可為由多肽之胺基酸殘基 1 至 248 所組成之多肽區域之表位，該多肽包含與 SEQ ID NO:2 之序列具有至少 50 % 序列一致性之多肽序列。

[0043] 在另一態樣中，該表位係由位於多肽之胺基酸 249 之 N 端的胺基酸殘基所形成，該多肽包含與 SEQ ID NO:2 之序列具有至少 50 % 序列一致性之多肽序列。在另一態樣中，該表位係藉由蛋白分解處理自此處所述之不具蛋白分解活性之多肽移除。

[0044] 在另一態樣中，本發明之抗體專一性之表位係位於多肽 N 端之表位，該多肽包含與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50 % 序列一致性之多肽序列。在本發明之此態樣中所使用之用語「N 端」，係指包含該多肽序列之 N 端 50 個胺基酸殘基之多肽區域，較佳地該多肽序列之 N 端 25 個胺基酸殘基。在特定態樣中，該用語係指 N 端 14 個胺基酸殘基。此處所使用之用語「表位」關於由本發明之抗體所識別之抗原決定簇。在一態樣中，該表位係線性表位，在另一態樣中，該表位係構形表位。在特定態樣中，該抗原決定簇係由具有本發明之具蛋白分解活性之多肽之 N 端的胺基酸序列之肽組成，其中該肽可具有 7 至 14 個胺基酸長度，較佳地 8、9、10、11、12、13 或 14 個胺基酸殘基。

[0045] 用語「專一性結合」或「專一性結合至」在

一態樣中，係指本發明之抗體不與本發明之多肽上之其他表位或其他一般多肽顯著程度地交叉反應。表位專一性係本發明之抗體的一項重要特徵。抗體對於具蛋白分解活性與不具蛋白分解活性之多肽之專一性，在一態樣中將為至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%。專一性結合可藉由多種廣為周知之技術測定，包括例如競爭試驗。另一項重要特徵為抗體之敏感性。在本發明之一態樣中，敏感性將為使試樣所包含之至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95% 之表位被結合。敏感性可藉由廣為周知之技術測定。該領域之技藝人士將可藉由例行實驗決定各項測定之操作及理想測試條件。結合測定之習用技術包括放射性免疫測定、ELISA、平衡透析、恆溫微量熱計量、BIAcore® 測定（表面電漿共振，SPR）或其他表面吸附方法。BIAcore® SPR 系統測量抗體-抗原交互作用。SPR 反應表現出當分析物結合或解離時，在檢測器表面之質量濃度的改變。根據 SPR，即時 BIAcore® 測量值直接監測即時發生之交互作用，見 BIAapplications Handbook, version AB (reprinted 1998), BIAcore® code No:BR-1001-86; BIAtechnology Handbook, version AB (reprinted 1998), BIAcore® code No:BR-1001-84。結合特性（例如本發明之抗體的敏感性）原則上可藉由利用存在於感測器表面之固定抗原（配體）之結合分析測定。受測抗體（分析物）將以流動相（即溶液）提供。在一些情況中，抗原經由與另一稱為捕捉分子之固定分子結

合，而間接連接至該表面。當抗體以離散型脈衝注射流過具有固定抗原之表面時，基本上可次分出三相：（i）抗體與抗原在試樣注射期間結合；（ii）試樣注射期間之平衡或穩定狀態，其中抗體結合之速率與自該抗體-抗原複合物解離之速率平衡；（iii）在緩衝液流動期間抗體自表面解離。將了解的是，該分析可替代性地藉由固定所欲測試之抗體及使用包含抗原之溶液作為流動相實施。結合及解離相提供分析物-配體交互作用之動力學的資料（ k_a 及 k_d ，複合物形成及解離之速率， $k_d/k_a=K_D$ ）。平衡相提供分析物-配體交互作用之親和性的資料（ K_D ）。在本發明之一態樣中，本發明之抗體具有低於 $0.5\ \mu\text{M}$ 、在另一態樣中低於 $0.05\ \mu\text{M}$ 且在又一態樣中低於 $0.02\ \mu\text{M}$ 之 K_D 。

[0046] 本發明所提及之抗體可藉由使用例如 Harlow and Lane, 1988 (Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988) 中所述之方法製造。單株抗體可藉由最初於 Kohler & Milstein, 1975 (Kohler & Milstein 1975, Nature 256: 495) 及 Galfre & Milstein, 1981 (Galfre & Milstein 1981, Meth Enzymol 73:3) 中所述之技術製備。該技術包含融合小鼠骨髓瘤細胞與衍生經免疫接種哺乳動物的脾細胞。抗體可進一步藉由該領域中廣為周知之技術改善。例如，在 BIACORE®系統使用之表面電漿共振可被用於增加與本發明之多肽內之前述表位結合之噬菌體抗體之效率（見 Schier et al., 1996, Human Antibodies Hybridomas 7:97;

Malmborg et al., 1995, J. Immunol Methods 183:7)。

[0047] 在本發明之一態樣中，該抗體係藉由使用包含前述表位或由前述表位組成之肽產製。該肽可例如合成性產製，或藉由重組表現產製。或者，本發明之抗體可藉由使用天然存在之本發明之具蛋白分解活性或不具蛋白分解活性之多肽產製。在後者中，應了解的是所形成之抗體將進一步測試其對本發明之多肽之專一性。在本發明之其他態樣中，本發明之單株抗體係藉由使用本發明之多肽產製，其中本發明之多肽可藉由清潔劑處理以使該表位為免疫可用。然而，將了解的是，若該抗體將以構型表位為目標，則不應採取該清潔劑處理。在另一態樣中，免疫刺激劑例如鑰孔狀帽貝血藍素（KLH）也可應用於該方法中，特別是當使用合成性肽時。

[0048] 本發明之抗體可被用於例如親和性層析、免疫沉澱及免疫定位本發明之多肽，以及用於監測該多肽於樣本或重組有機體中之存在。另外，本發明之抗體可被用於檢測方法或診斷方法中。在特定態樣中，本發明之抗體係用於西方墨點法或 ELISA 中。此外，本發明之抗體可被用於治療應用。特別是，該抗體可被用於抑制本發明之具蛋白分解活性之多肽之活性。因此，本發明之抗體也具有如下所述之許多治療應用。

[0049] 本發明亦關於本發明之具蛋白分解活性之多肽於蛋白分解處理多肽之方法中之用途。在一態樣中，本發明關於一種製造經蛋白分解處理之多肽之方法，該方法

包含使下列 (a) 與 (b) 接觸之步驟：(a) 第一多肽，該第一多肽係本發明之多肽，(b) 第二多肽，該第二多肽係易被該第一多肽蛋白分解，其中該接觸導致蛋白分解處理該第二多肽成為至少二個切割產物。

[0050] 本發明亦關於使用來自產酶溶桿菌 (*Lysobacter enzymogenes*) (ATCC 29487) 之 Lys-C 及／或 Lys-N 及／或精胺鹽基內肽酶 (內蛋白酶 Arg-C, LeR) (Wright DS, Graham LD, Jennings PA. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Dec 22;1443(3):369-74)。另外，本發明亦包含使用纖維蛋白溶酶及／或 omptin (OmpT) (一種切割 (Arg/Lys) - (Arg/Lys) 模體之膜結合絲胺酸蛋白酶) (K. Sugimura and T. Nishihara. *J. Bacteriol.* 170 (1988), pp. 5625-5632) 於蛋白分解處理 CNT 例如 BoNT/A 之方法中。在一態樣中，本發明關於一種製造經蛋白分解處理之多肽之方法，該方法包含使下列 (a) 與 (b) 接觸之步驟：(a) 第一多肽，該第一多肽係 Lys-C 或 Lys-N，(b) 第二多肽，該第二多肽係易被該第一多肽蛋白分解，其中該接觸導致蛋白分解處理該第二多肽成為至少二個切割產物，且其中該第二多肽係 BoNT/A 單鏈。用語「Lys-C」係指專一性切割離胺酸 C 端之肽鍵之源自產酶溶桿菌之 33 kDa 絲胺酸內蛋白酶 Lys-C (離胺鹽基內肽酶，LeK, Genbank 編號 Q7M135) 或彼之具有至少 50% 序列一致性之同系物。在一實施態樣中，彼之與 Lys-C 具有至少 50% 序列一致性之同系物維持 Lys-C 之功

能性（即蛋白分解活性）。因此，在一實施態樣中，該同系物能水解單鏈肉毒神經毒素（例如血清型 A（BoNT/A））以產生雙鏈肉毒神經毒素（例如血清型 A（BoNT/A））。在一實施態樣中，用語「Lys-C」亦包含功能性相等蛋白酶，例如該些和 Lys-C 辨識相同切割序列且水解 Lys 之羧基側之蛋白酶。用語「Lys-N」係指自多葉奇果菌（*Grifola frondosa*）及糙皮側耳（*Pleurotus ostreatus*）分離之金屬內肽酶 Lys-N（Nonaka T et al., 1997, J Biol Chem.272:30032-30039; Nonaka T et al., 1998, J Biochem.1998 124:157-162; Hori T et al., 2001, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.57:361-368）。該用語亦包含該蛋白酶之具有至少 60% 序列一致性之同系物。

[0051] 此方法可被用於例如製造經蛋白分解處理之多神經毒素（CNT）或肉毒神經毒素（BoNT）。本發明所使用之用語「BoNT」係指肉毒神經毒素且係指自肉毒芽胞梭菌（*C. botulinum*）獲得之神經毒素，諸如血清型 A、B、C1、D、E、F 或 G 之 BoNT。用語「CNT」及「BoNT」也包含重組神經毒素及包含一或多種修飾（包括化學修飾或基因修飾）之經修飾之神經毒素。用語「基因修飾」係指刪除、取代或添加一或多種胺基酸殘基。使用本發明之方法，即有可能獲得受到顯著較少未經處理或部分處理之神經毒素污染之神經毒素組成物，因為該些污染物被有效地處理成為雙鏈神經毒素。在一態樣中，該雙鏈神經毒素係天然雙鏈神經毒素，其中該輕鏈之 C 端與該

重鏈之 N 端係與自野生型芽胞梭菌分離之該對應之經完全處理之雙鏈神經毒素一致。

[0052] 此處所使用之用語「接觸」係指使至少二種不同的化合物物理接近（physical proximity）以允許該等化合物之物理及／或化學交互作用發生。根據本發明之方法，該二種不同的化合物在一態樣中係溶液所包含之第一及第二多肽。接觸係於允許該第一及第二多肽足以發生交互作用之條件及時間下進行。此處所使用之用語「經蛋白分解處理之多肽」在一態樣中係指多肽，彼之多肽鏈之一或多個肽鏈已經水解或切割。在另一態樣中，該用語係指已被內蛋白酶或內肽酶蛋白分解切割之多肽。在另一態樣中，該用語係指已被切割至少 50% 之程度的多肽。在另一態樣中，該經蛋白分解處理之多肽係第二多肽。在另一態樣中，至少 60%、70%、80%、90% 或 95% 係經蛋白分解處理。

[0053] 此處所使用之用語「第一多肽」係指本發明之多肽，即具蛋白分解活性之多肽，又稱為「活性 BoNT 水解酶」。由於該活性 BoNT 水解酶可自肉毒芽胞梭菌之上清液獲得，其最初被命名為天然 BoNT 水解酶，簡稱「nBH」。然而，用語「第一多肽」及「nBH」亦指可得自其他來源之 BoNT 水解酶。此處所使用之用語「第二多肽」係指該第一多肽之底物。用語「易被蛋白分解」係指第二多肽之特徵或條件，且用於此處係指第二多肽可被該第一多肽蛋白分解切割。換言之，用語「易被蛋白分解」

係指第二多肽包含允許其作為第一多肽之底物之蛋白酶辨識及切割位點。該「第二多肽」係第一多肽之底物且經蛋白分解處理為二或多個切割產物（較佳地僅二肽，即經由雙硫鍵連接之 L 鏈或彼之片段及 H 鏈或彼之片段）。使用如上述之分析，技藝人士可根據本發明之定義測試給定多肽是否為第一多肽之底物，即「第二多肽」。用語「至少二個切割產物」包括例如最多二、三、四、五及最多六個切割產物。

[0054] 此方法可被用於例如製備包含芽胞梭菌神經毒素之醫藥組成物或用於產製質譜法中所使用之多肽片段。第一多肽及第二多肽可於經蛋白分解處理之多肽之製造方法中的不同步驟接觸。在一態樣中，使第一多肽與第二多肽接觸之步驟係於細胞內。在此實施態樣之特定態樣中，該第一及第二多肽係於該細胞中表現。

[0055] 在另一態樣中，該接觸步驟係於細胞溶解物或經純化之細胞溶解物中。此態樣包含添加第一多肽至溶解物或經純化之溶解物中。第一多肽可在自細胞溶解物純化第二多肽期間之不同步驟添加。例如，第一多肽可在下列步驟之前或之後添加：蛋白沉澱、離子交換層析、疏水交互作用層析及／或分子排阻層析。另外，亦包含添加第一多肽至醫藥組成物。在此態樣中，本發明之多肽被用於例如蛋白分解切割第二多肽，以例如活化包含於該醫藥組成物中作為治療劑之第二多肽。同樣設想到的是投予第一多肽至個體，以蛋白分解處理該個體體內之第二多肽。投

予亦包括共投第一及第二多肽。此方法亦包含在足以切割該第二多肽之條件及時間下培養之步驟。在一態樣中，該條件可包含添加選自 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 或 PBS (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4) 之緩衝液。較佳之緩衝液條件包括 100 mM Tris-HCl, pH 8.0。「足以切割之時間」可利用上述分析測定。在一態樣中，該「足以切割之時間」視經蛋白分解處理之多肽或包含彼之組成物所應具有之切割程度而定。在一態樣中，該方法包含培養第一及第二多肽至少 30 分鐘、60 分鐘、120 分鐘或至少 240 分鐘之步驟。在另一態樣中，第一及第二多肽係培養最多 30 分鐘、60 分鐘、120 分鐘、240 分鐘、480 分鐘或最多 600 分鐘。在另一態樣中，該方法包含於 4°C 或 37°C 培養第一及第二多肽之步驟。在另一態樣中，該方法包含培養最多 1 小時、最多 2 小時、4 小時、6 小時、10 小時或最多 16 小時之步驟。

[0056] 在一態樣中，該第二多肽之多肽鏈包含選自 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者之序列。在更特定之態樣中，該第二多肽之多肽鏈包含選自 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者之序列，且其中第二多肽在 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者之該序列內的鹼性胺基酸殘基 C 端被切割。該序列代表本發明之具蛋白分解活性之多肽之已知底物的胺基酸序列。如此處所示，該底物在序列所包含之鹼性胺基酸殘基的 C 端被切割，比較表 1 中欄 LC 及 H_N。在較佳之態樣中，該第二多肽包含選自 SEQ ID NO:4 至 10 之序列

（例如血清型 BoNT/A1，SEQ ID NO:4）。在另一較佳態樣中，該第二多肽係 BoNT/A 或彼之衍生物，包括例如 SEQ ID NO:3 之多肽或彼之衍生物。在本發明之此態樣及其他態樣中所使用之用語「衍生物」，包含胺基酸突變例如添加、取代、刪除或截短一或多個胺基酸殘基。

[0057] 在一態樣中，第二多肽包含 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者或 SEQ ID NO:3 之衍生物，其中該衍生物具有一或多點突變及／或一或多個額外之胺基酸殘基。在另一態樣中，該衍生物具有最多 1、最多 2、最多 3、最多 4、最多 5、最多 6、最多 7、最多 8、最多 9、最多 10、最多 15 個點突變。藉由使用如此處所述之測定蛋白酶活性之活性分析，技藝人士可測定給定衍生物是否經本發明之具蛋白分解活性之多肽處理。在另一態樣中，該衍生物包含改變鹼性胺基酸成為非鹼性胺基酸殘基之點突變。在另一態樣中，衍生物與 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者具有至少 50% 之序列一致性。在另一態樣中，該衍生物或包含該衍生物之多肽係第一多肽之底物且可被第一多肽蛋白分解切割。典型實例係 SEQ ID NO:3 之衍生物，其包含例如一或多個在輕鏈或重鏈中之點突變。

[0058] 在另一態樣中，該第二多肽包含（a）與 SEQ ID NO:3 之序列具有至少 30% 序列一致性之多肽序列 [（ATCC 3502 之 BoNT/A，Genbank 編號 AAA23262）]；或（b）選自破傷風神經毒素、凝血級聯因子 X 或凝血酶原（因子 II）之蛋白、胰消化酶（如胰蛋白酶、胰凝乳

酶)、胃蛋白酶、木瓜酶之多肽序列。至少 30% 係指至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99%。在特定態樣中，與 SEQ ID NO:3 之序列具有至少 50% 序列一致性之該第二多肽序列之序列一致性，係根據 SEQ ID NO:3 之胺基酸位置 420 至約 466 決定，在另一態樣中，該序列一致性係根據 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者決定。換言之，該態樣係指包含多肽序列之第二多肽，該多肽序列與 SEQ ID NO:3 之胺基酸位置 420 至 466 之間的多肽序列具有例如至少 30% 之序列一致性或與 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者之多肽序列具有至少 30% 之序列一致性。根據此定義之多肽可得自例如肉毒芽胞梭菌 (*C. botulinum*)、破傷風芽胞梭菌 (*C. tetani*) 或產芽胞芽胞梭菌 (*C. sporogenes*)。該第二多肽可為例如天然存在之神經毒素 (例如 BoNT/A、B、C1、D、E、F 或 G) 或彼等之包含一或多個胺基酸突變 (例如添加、取代、刪除或截短一或多個胺基酸殘基) 之衍生物。包含例如缺乏例如天然神經毒素 Hc 結構域或彼之部分之衍生物或具有其他取代神經毒素 Hc 結構域之胺基酸殘基之衍生物以及具有 BoNT 之額外輕鏈或與輕鏈 N 端融合之另一蛋白貨物分子之衍生物。

[0059] 在另一態樣中，第二多肽可包含在 N 或 C 端或內部位置之額外胺基酸殘基。該額外之胺基酸殘基可能側接一或多個蛋白酶切割位點。在另一態樣中，該額外之胺基酸序列作為可檢測標籤及／或允許與固體支持結合。

實例為 his 標籤或 GST 標籤。另一實例為包含 Strep 標籤之胺基酸序列 VPPTPGSAWSHPQFEK，較佳地被加至 C 端。

[0060] 在特定態樣中，該第二多肽係包含如 GenBank 編號 CBZ04958.1、YP_002805603.1、ZP_02994746.1、YP_001788403.1、YP_001782718.1、ZP_02616437.1、ZP_02614241.1、YP_001392361.1、YP_001255575.1 所示之多肽序列之多肽或彼之具有至少 50% 序列一致性之同系物。

[0061] 在另一態樣中，該第二多肽之生物活性係由蛋白分解切割調節。技藝人士已知的是，許多多肽之功能可藉由蛋白分解處理加以調節。此處所使用之「調節」係指增加或減少、活化或未經活化。例如，許多芽胞梭菌神經毒素之生物活性係藉由蛋白分解處理單鏈神經毒素成為雙鏈神經毒素加以增加或引發，其中該雙鏈神經毒素由多肽輕鏈及重鏈組成，彼等經由雙硫鍵共價連接。神經毒素之生物活性包含至少三種不同活性：第一活性為位於該神經毒素之輕鏈中之「蛋白分解活性」，且負責水解涉及調節細胞膜融合之一或多種多肽之肽鍵。第二活性係位於經處理之神經毒素之重鏈 N 端之「轉位活性」，其涉及運輸輕鏈通過溶酶體膜及進入細胞質。第三活性係位於經處理之神經毒素之重鏈 C 端之「受體結合活性」，其涉及神經毒素與標靶細胞之結合及標靶細胞對神經毒素之攝取。在較佳態樣中，此處所使用之用語生物活性係指蛋白分解活

性。在更佳之態樣中，該用語係指增加蛋白分解活性。

[0062] 芽胞梭菌神經毒素之生物活性可藉由多種檢測測量，所有檢測皆為該領域之技藝人士所知。這些檢測允許測定上述之一或多種活性。例如，小鼠 LD₅₀ 檢測或如 Pearce et al., 1994 (Pearce LB, Borodic GE, First ER, MacCallum RD(1994), Toxicol Appl Pharmacol 128:69-77) 及 Habermann et al., 1980 (Habermann E, Dreyer F, Bigalke H. (1980), Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.311:33-40) 所述之活體外小鼠膈神經半橫膈 (MPN) 測試允許測定給定神經毒素製劑對於活生物體或經分離之神經肌肉組織之毒性效應。為了建立 LD₅₀ 檢測中之毒性效應，神經毒素必須具有上述三種活性中之各種生物活性。另外，還有許多其他檢測可測定例如神經毒素或該神經毒素之輕鏈是否具有蛋白分解活性。該等檢測係基於例如使 BoNT/A 與 SNAP-25 接觸。或者，可使用代表 SNAP-25 之切割位點之肽，其中該肽可經標示以方便檢測。在較佳之態樣中，生物活性係藉由使用如上述之 MPN 測試檢測。

[0063] 在另一態樣中，該第一多肽係藉由蛋白分解處理不活化之前體多肽加以活化，該不活化之前體多肽包含與 SEQ ID NO:2 之序列具有至少 60% 序列一致性之多肽序列。此態樣基於具有 SEQ ID NO:2 之多肽序列之多肽係不具蛋白分解活性之觀察，然而彼之 N 端截短物具有蛋白分解活性。本發明亦包含使用此處所述之方法中之不具

蛋白分解活性之多肽。此處所述之不具蛋白分解活性之多肽可藉由例如移除 N 端片段或移除包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸殘基 1 至 248 之整個 N 端加以活化。在一態樣中，N 端係藉由蛋白酶移除，在另一態樣中，N 端係藉由 SEQ ID NO:2 之自體蛋白水解移除。60% 序列一致性係指與全長 NT02CB1447 之序列排比。

[0064] 在另一態樣中，本發明之製造經蛋白分解處理之多肽之方法，包含純化該經蛋白分解處理之第二多肽或彼之至少一或二種或多種切割產物之步驟。肉毒芽胞梭菌表現之 BoNT/A 之純化基本上可如現有技術（DasGupta 1984, *Toxicon* 22, 415; Sathyamoorthy 1985, *J Biol Chemistry* 260, 10461）所述之方式進行。特別是，神經毒素之純化可包含一或多種沉澱及萃取步驟、一或多種濃縮步驟及其他不同的層析步驟。重組單鏈 BoNT/A 及彼之純化係描述於現有技術（Rummel et al., 2004, *Mol Microbiol.* 51:631-43）。

[0065] 在較佳之實施態樣中，芽胞梭菌株係例如產製 BoNT/A 或彼之衍生物之肉毒芽胞梭菌。在醱酵方面，可使用由 DasGupta B. R. et al. in *Toxicon*, vol. 22, No.3, p. 414 to 424, 1984 所述之方法。因此，0.5% 之酵母菌萃取物及 0.6% 之高壓滅菌酵母菌糊料係添加至 2% 之 N-Z 胺 A 型培養基，利用 4N NaOH 調整 pH 至 7.2，以此方式製備之培養基之後將經高壓滅菌。在此培養基中加入另經高壓滅菌之葡萄糖（每體積重量 20%），以達培養基中

最終葡萄糖濃度 0.5%。培養可在例如 37°C 下不攪拌進行，其中醱酵在例如 96 小時後終止。在本發明之範圍內，除了前述之批式醱酵，也可進行半批式醱酵、重複批式醱酵或連續醱酵。

[0066] 在實際醱酵及分離醱酵培養基與細胞之後，該醱酵培養基可進行第一次沉澱以移除大型蛋白。沉澱較佳為酸沉澱。該酸沉澱之反應條件係該領域之技藝人士所知。通常可使用 1.5 M H_2SO_4 ，以酸化上清液至 pH 3.5。離心通常以 2400 x g 在 4°C 下進行 20 分鐘。離心獲得之團塊可以水清洗，較佳地重複清洗。接著，團塊可利用 0.1 M 檸檬酸-檸檬酸鈉緩衝液 pH 5.5 萃取例如 1 小時。接著，可進行其他離心步驟，例如以 9800 x g 在 4°C 下離心 20 分鐘。如此獲得之團塊接著可選擇性地再次如上述萃取。萃取上清液及重複萃取之二次上清液接著可經硫酸魚精蛋白沉澱。沉澱可於例如 8°C 下持續隔夜。接著，該沉澱物可於例如 4°C 下以 12,000 x g 離心 20 分鐘。離心上清液可經沉澱（例如硫酸銨沉澱）處理，藉以移除其他較大蛋白。在硫酸銨沉澱步驟之後可增加另一離心步驟，接著所獲得之團塊可經重新溶解及可選擇性地經透析處理。較佳地經再次透析及離心之萃取物，可經連續層析步驟處理以達純化神經毒素之目的。各種層析步驟係用於移除污染物，例如硫酸魚精蛋白、剩餘 DNA、較小蛋白及中型蛋白之部分，以及肉毒神經毒素蛋白複合物之血球凝集素。就此目的而言，一或多種層析步驟可被用於較佳之

實施態樣中。可任意選擇地，例如最後層析步驟之流析液可經過濾以減少細菌。可任意選擇地，流析液在過濾前可經稀釋並添加適當佐劑。在其他步驟期間，另一滅菌過濾步驟可在添加佐劑之後進行。在一態樣中，過濾係於反應容器中進行，該容器接著可進行冷凍乾燥步驟。

[0067] 本發明亦關於可藉由本發明之製造經蛋白分解處理之多肽之方法獲得之組成物。在一態樣中，該組成物包含經處理及未經處理之第二多肽之混合物，其中該混合物可包含低於 5%、4%、3%、2% 或低於 1% 之未經處理之第二多肽。在該組成物之態樣中，該第二多肽係 BoNT 或彼之衍生物。該 BoNT 可為例如選自 BoNT 血清型 A、B、C、D、E、F 及 G，包括彼等之衍生物。該組成物可為例如液體或固體組成物，且可包含一或多種載劑、佐劑及／或賦形劑。

[0068] 在另一態樣中，本發明亦關於製造藥物（即醫藥組成物）之方法，該方法包含前述方法之步驟及調製經純化之雙鏈神經毒素作為藥物之其他步驟。在一態樣中，該藥物包含經處理及未經處理之第二多肽之混合物，其中該混合物可包含低於 5% 之未經處理之第二多肽。在較佳之實施態樣中，該混合物包含低於 4%、3%、2% 或低於 1% 之未經處理之第二多肽。

[0069] 本發明亦關於此處揭示之化合物之多種醫學用途：

在一態樣中，本發明關於根據本發明之具蛋白分解活

性之多肽用於作為藥物或醫藥組成物。

在另一態樣中，本發明關於根據本發明之組成物用於作為藥物或醫藥組成物。

在又一態樣中，本發明關於根據本發明之抗體用於作為藥物或醫藥組成物。

在仍一態樣中，本發明關於根據本發明之抑制劑用於作為藥物或醫藥組成物。

特別是，本發明關於包含本發明之多肽、本發明之抗體、本發明之組成物或本發明之抑制劑之醫藥組成物。

[0070] 此處所使用之用語「組成物」係指任何經調製為固體、液體、氣霧劑（或氣體）形式等之組成物。該組成物包含例如本發明之治療活性化合物與可任意選擇之適當助劑化合物例如稀釋劑或載劑或其他成分。在一態樣中，該治療活性化合物係本發明之具蛋白分解活性之多肽。在另一態樣中，該治療化合物係如此處上述之經蛋白分解處理之第二多肽，例如雙鏈神經毒素。在另一態樣中，該治療活性化合物係本發明之抗體。在另一態樣中，該治療活性化合物係本發明之具蛋白分解活性之多肽之抑制劑。

[0071] 在一實施態樣中，本發明提供固體或液體醫藥組成物，其包含：

（a）如此處所述之活性雙鏈 BoNT（例如 BoNT/A）蛋白，及

（b）安定劑。

[0072] 可用於本發明之組成物中的安定劑包括蛋白安定劑，諸如白蛋白特別是人血清白蛋白（HSA），及非蛋白安定劑。

[0073] 可用於本發明之組成物中的非蛋白安定劑包括表面活性劑，特別是非離子性表面活性劑。非離子性表面活性劑之實例包括聚山梨醇酯，諸如聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80，及團聯共聚物諸如泊洛沙姆（poloxamer）（即聚乙烯與丙二醇之共聚物）。

[0074] 在特定實施態樣中，該組成物不包含作為安定劑之蛋白。

[0075] 根據本發明之特定實施態樣，該醫藥組成物係液體醫藥組成物，其包含：

（a）如此處所述之活性雙鏈 BoNT 蛋白（例如 BoNT/A）；

（b）為表面活性劑之非蛋白安定劑；及

（c）水；

其中該液體醫藥組成物不包含蛋白安定劑。

[0076] 在一實施態樣中，該活性雙鏈 BoNT 蛋白係以 1 至 100 ng/ml 之濃度存在於該（如上述之）組成物中。在一實施態樣中，該活性雙鏈 BoNT 蛋白係以 5 至 50 ng/ml 之濃度存在於該（如上述之）組成物中，例如約 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 ng/ml。在較佳之實施態樣中，該活性雙鏈 BoNT 蛋白係以約 20 ng/ml 之濃度存在。

[0077] 在一實施態樣中，該（如上述之）表面活性劑係聚山梨醇酯，諸如平均聚合程度為 20 至 100 個單體單元之聚山梨醇酯，可能為例如聚山梨醇酯 80。在較佳之實施態樣中，該聚山梨醇酯係蔬菜來源。該表面活性劑之濃度較佳係低於 1% v/v，例如以聚山梨醇酯 80 為例約 0.005% 至 0.02% v/v。

[0078] 本發明之醫藥組成物亦可包含結晶劑。

[0079] 所謂結晶劑係指尤其是維持凍乾肉毒桿菌神經毒素複合物（A、B、C、D、E、F 或 G 型）或高純度肉毒桿菌神經毒素（A、B、C、D、E、F 或 G 型）之機械強度餅狀結構之劑。當包含於固體調製劑中時，結晶劑亦具有膨脹效果。結晶劑特別包含氯化鈉。結晶劑之濃度可為例如 0.1 至 0.5 M，較佳地 0.1 至 0.4 M，特別是約 0.15 至 0.3 M。

[0080] 本發明之醫藥組成物亦可包含緩衝劑以維持介於 5.5 至 7.5 或介於 6.0 至 7.0 之 pH 值。該緩衝劑可為任何能維持該適當 pH 之緩衝劑。舉例來說，用於本發明之組成物的緩衝劑可選自琥珀酸鹽、磷酸氫二鈉／檸檬酸及胺基酸如組胺酸。緩衝劑之濃度可為例如 1 至 50 mM，較佳地 5 至 20 mM，較佳約 10 mM。

[0081] 本發明之醫藥組成物亦可包含雙醣。

[0082] 用於本發明之組成物中的雙醣可選自蔗糖、海藻糖、甘露醇及乳糖。在特定實施態樣中，該雙醣係蔗糖。雙醣之濃度可為例如 5 至 50 mM，較佳地 5 至 25

mM，更佳地 10 至 20 mM，最佳約 11.7 mM。

[0083] 在特定實施態樣中，該醫藥組成物係液體醫藥組成物，其包含：

(a) 如此處所述之活性雙鏈 BoNT 蛋白（例如 BoNT/A）；

(b) 為表面活性劑之非蛋白安定劑；

(c) 氯化鈉；

(d) 維持 pH 介於 5.5 至 7.5 之緩衝劑；

(e) 雙醣；及

(f) 無菌水，

其中該液體醫藥組成物不包含蛋白安定劑。

[0084] 根據特定實施態樣，本發明之呈液體形式之醫藥組成物係密封於小瓶或立即可用之裝置，如針筒，不含液體／氣體介面，且於 23 至 27°C 維持穩定至少三個月或至少六個月，於 2 至 8°C 維持穩定至少 12 個月。

[0085] 下表顯示包含活性雙鏈 BoNT（例如 BoNT/A）之六種例示性液體組成物。

	1	2	3	4	5	6
聚山梨醇酯 80	0.10 mg/mL	0.10 mg/mL	0.10 mg/mL	0.10 mg/mL	-	-
Poloxamer	-	-	-	-	0.04 mg/mL	0.04 mg/mL
蔗糖	4.0 mg/mL	-	4.0 mg/mL	-	4.0 mg/mL	-
甘露醇	-	4.0 mg/mL	-	4.0 mg/mL	-	4.0 mg/mL
氯化鈉	8.76 mg/mL	8.76 mg/mL	8.76 mg/mL	8.76 mg/mL	8.76 mg/mL	8.76 mg/mL
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
緩衝液	L-組胺酸/鹽酸	L-組胺酸/鹽酸	磷酸氫二鈉/無 水檸檬酸	磷酸氫二鈉/無 水檸檬酸	L-組胺酸/鹽酸	L-組胺酸/鹽酸
雙鏈 BoNT (例如 BoNT/A)	20 ng/mL	20 ng/mL	20 ng/mL	20 ng/mL	20 ng/mL	20 ng/mL
MilliQ 水	加足量至 1 mL	加足量至 1 mL	加足量至 1 mL	加足量至 1 mL	加足量至 1 mL	加足量至 1 mL

[0086] 在 12 周期間，六種調製劑的每月降解率可低於每月 5%，顯示這六種組成物的雙鏈 BoNT 蛋白酶功能在 25°C 下維持穩定至少 12 周。

[0087] 本發明之醫藥組成物可以冷凍乾燥、真空乾燥形式儲存於真空壓力容器中或儲存為穩定液體。在冷凍乾燥之前，活性雙鏈 BoNT 蛋白（例如 BoNT/A）可與醫藥上可接受之賦形劑、安定劑及／或載劑例如白蛋白組合。冷凍乾燥材料可經鹽水或水重構以產生包含該活性雙鏈 BoNT 蛋白（例如 BoNT/A）之待投予至病患之溶液或組成物。

[0088] 在此背景下，應區別本發明之助劑化合物與其他成分，所謂助劑化合物是指為了達到所欲目的投予組成物時不造成由本發明之化合物所誘發之效應之化合物，其他成分是指造成其他效應或調節本發明之化合物之效應

之化合物。適當之稀釋劑及／或載劑取決於所欲使用該組成物及其他成分之目的。該領域之技藝人士可決定該適當之稀釋劑及／或載劑無須贅言。

[0089] 載劑必須為可與調製劑之其他成分相容且不會對彼之接受者有害。所採用之醫藥載劑可包括固體、凝膠或液體。例示性固體載劑係乳糖、白土、蔗糖、滑石、明膠、洋菜膠、果膠、阿拉伯膠、硬脂酸鎂、硬脂酸及類似物。例示性液體載劑係磷酸緩衝鹽水溶液、糖漿、油、水、乳液、多種潤濕劑及類似物。同樣地，載劑或稀釋劑可包括該領域廣為周知之時間延遲性材料，例如單獨的甘油單硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯或與蠟組合。該適當載劑包含上述者及其他該領域廣為周知者，見例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania。

[0090] 稀釋劑係經選擇以不影響該組合之生物活性。該稀釋劑之實例係蒸餾水、生理食鹽水、林格氏（Ringer's）液、葡萄糖溶液及漢氏（Hanks's）溶液，此外，該醫藥組成物或調製劑物亦可包括其他載劑、佐劑或非毒性、非治療性、非免疫原性安定劑及類似者。

[0091] 在一態樣中，此處所使用之醫藥組成物包含藉由本發明之方法獲得之生物活性神經毒素及可任意選擇地一或多種醫藥上可接受之載劑。該活性神經毒素可以液體或冷凍乾燥形式存在。在一態樣中，該化合物可與甘油、蛋白安定劑（例如人血清白蛋白（HSA））或非蛋白

安定劑（例如聚乙烯吡咯烷酮或玻糖醛酸）一起存在。該醫藥組成物在一態樣中係經局部投予。習用之藥物投予係經肌肉內、皮下（靠近腺體）投予。然而，依據化合物之特性及作用模式，該醫藥組成物也可藉由其他途徑投予。雙鏈神經毒素多肽係該組成物之活性成分，在一態樣中係以根據習用程序藉由組合該藥物與標準醫藥載劑所製成之習用劑量形式投予。這些程序可能涉及混合、造粒及壓製或溶解該適當成分至該所欲之製劑。應了解的是，該醫藥上可接受之載劑或稀釋劑之形式及特徵，受到其所欲組合之活性成分之量、投予途徑及其他廣為周知之變數影響。

[0092] 治療有效劑量係指所欲使用於本發明之醫藥組成物中之神經毒素化合物之量，以預防、改善或治療伴隨本說明書中提及之疾病或病症之症狀。化合物之治療性療效及毒性可藉由在細胞培養或實驗動物中所進行之標準醫藥程序檢測，例如 ED_{50} （對 50% 之族群有治療效果之劑量）及 LD_{50} （對 50% 之族群致死之劑量）。治療與毒性效應之間的劑量比係治療指數，可由 LD_{50}/ED_{50} 之比表示。

[0093] 給藥方案將由主治醫師及其他臨床因素決定。如醫學領域所廣為周知，任何病患之劑量取決於許多因素，包括該病患之體型大小、身體表面積、年齡、所欲投予之特定化合物、性別、投予時間及途徑、整體健康及其他併投之藥物。進展可藉由定期檢查加以監測。此處所述之醫藥組成物及調製劑係經投予至少一次以治療或改善

或預防本說明書中列舉之疾病或病症。然而，該醫藥組成物可能經投予超過一次。

[0094] 在本發明之其他態樣中，前述組成物係藥物或美容組成物。在一態樣中，該包含生物活性神經毒素之藥物可被用於預防及／或治療下列疾病或病狀之至少一者：隨意肌強度、局部肌張力障礙（包括頭、頸肌張力障礙及良性自發性眼瞼痙攣、半邊顏面痙攣及局部痙攣）、胃腸疾患、多汗症及美容除皺，在其他態樣亦包含眼瞼痙攣、口下頷肌張力障礙、張口型、閉口型、磨牙、梅傑氏（Meige）症候群、舌肌肌張力障礙、眼瞼肌肉運動失調、張口型頸肌張力障礙、頸項前屈、頸項後屈、頸項側屈、斜頸、咽部肌張力障礙、喉部肌張力障礙、痙攣性發聲障礙／內收肌型、痙攣性發聲障礙／外展肌型、痙攣性呼吸困難、四肢肌張力障礙、手臂肌張力障礙、特定任務性肌張力障礙、書寫痙攣、音樂家指痙攣、高爾夫手痙攣、腿部肌張力障礙、大腿內收、大腿外展膝關節彎曲、膝關節伸直、踝關節彎曲、踝關節伸直、馬蹄內翻足、畸形足肌張力障礙、紋狀趾、腳趾彎曲、腳趾伸直、中軸肌張力障礙、比薩症候群、肚皮舞者肌張力障礙、節段性肌張力障礙、半身性肌張力障礙、全身性肌張力障礙、lubag 症候群中之肌張力障礙、皮質基底核退化中之肌張力障礙、lubag 症候群中之肌張力障礙、遲發性肌張力障礙、脊髓小腦性失調症中之肌張力障礙、帕金森氏症中之肌張力障礙、亨汀頓氏舞蹈症中之肌張力障礙、髓素異常

表象（Hallervorden Spatz disease）中之肌張力障礙、多巴誘發之運動困難／多巴誘發之肌張力障礙、遲發性運動困難／遲發性肌張力障礙、陣發性運動困難／肌張力障礙、運動性非運動性動作誘發之上顎肌陣攣、肌陣攣肌纖維顫動、僵硬、良性肌肉痙攣、遺傳性下巴顫抖、矛盾性下巴肌活動、半側咀嚼肌痙攣、肥厚性鰓肌病、嚼肌肥厚、脛骨前肌肥厚、眼球震顫、震動幻視核上性凝視麻痺、癲癇、持續性不全癲癇（*partialis continua*）、計畫痙攣性斜頸手術、外展肌聲帶麻痺、反抗性突變煩躁不安、上食道括約肌功能不全、聲帶肉芽腫、口吃性妥瑞氏症、中耳肌陣攣、保護性喉閉合、喉切除術術後、語言障礙、保護性垂瞼、眼瞼內翻、奧迪氏（Odi）括約肌功能異常、假性食道弛緩不能、非弛緩不能性食道運動障礙、陰道痙攣、術後制動震顫、膀胱功能失常、膀胱尿道括約肌失常、膀胱括約肌痙攣、半側臉痙攣、神經再生性運動困難、魚尾紋之美容使用、皺眉臉不對稱、頰肌皺縮、僵硬人症候群、破傷風性前列腺增生（*tetanus prostate hyperplasia*）、過胖、治療幼兒腦性麻痺斜視、混合麻痺性共同性斜視、在視網膜剝離手術之後、在白內障手術之後、在無晶體眼中肌炎性斜視、肌病性斜視、分離性垂直眼偏斜、作為斜視手術之輔助治療、內斜視、外斜視、弛緩不能、肛門裂、外分泌腺活性過高、Frey氏症候群、假哭性症候群、多汗症、腋窩掌足鼻漏、中風中之相對流涎過多、帕金森氏症中之相對流涎過多、肌萎縮性側索硬化

痙攣症狀中之相對流涎過多、腦炎及脊髓炎自體免疫疾病中之相對流涎過多、多發性硬化症、橫貫性脊髓炎、戴維克氏（Devic）症候群、病毒感染、細菌感染、寄生蟲感染、真菌感染、在遺傳性痙攣性截癱中風後症候群腦半球梗塞中、腦幹梗塞、脊椎梗塞、偏頭痛、中樞神經系統外傷、腦半球病灶、腦幹病灶、脊椎病灶、在中樞神經系統出血中、腦內出血、蜘蛛膜下腔出血、硬膜下出血、脊椎內出血、在癌中、腦半球性腫瘤、腦幹腫瘤、脊椎腫瘤、打鼾（WO 2000/033863）。細節及症狀見例如 Jost 2007, Drugs 67(5), 669 或 Dressler 2000 in Botulinum Toxin Therapy, Thieme Verlag, Stuttgart, New York。

[0095] 在本發明之另一態樣中，該組成物係可如上述之醫藥組成物調製之美容組成物。同樣的就美容組成物而言，設想本發明之化合物在一態樣中係以實質上純的形式使用。美容組成物在另一態樣中係經肌肉內施予。在本發明之甚至其他態樣中，包含神經毒素之美容組成物可經調製為抗皺溶液。

[0096] 在另一態樣中，該醫藥組成物包含本發明之抗體或抑制劑。由於本發明之多肽負責活化芽胞梭菌神經毒素，該抗體將可被用於減少芽胞梭菌感染時觀察到之毒性作用。因此，本發明之抗體在一態樣中可被用於治療芽胞梭菌感染，包括產氣莢膜芽胞梭菌（*Clostridium perfringens*）、難養芽胞梭菌（*Clostridium difficile*）、破傷風芽胞梭菌（*Clostridium tetani*）、肉毒芽胞梭菌

(*Clostridium botulinum*) 、 巴 拉 提 尼 芽 胞 梭 菌 (*Clostridium baratii*) 、 酪 酸 芽 胞 梭 菌 (*Clostridium butyricum*) 、 產 芽 胞 梭 菌 (*Clostridium sporogenes*) 、 丙 酮 丁 醇 梭 菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 、 溶 血 芽 胞 梭 菌 (*Clostridium haemolyticum*) 、 諾 維 氏 芽 胞 梭 菌 (*Clostridium novyi*) 及 水 腫 芽 胞 梭 菌 (*Clostridium oedematiens*) 。 另 外 ， 本 發 明 之 抗 體 在 另 一 態 樣 中 可 用 於 治 療 與 該 感 染 有 關 之 症 狀 。 另 外 ， 該 抗 體 可 用 於 治 療 與 病 狀 有 關 之 病 況 或 症 狀 ， 其 中 該 病 狀 係 選 自 肉 毒 桿 菌 症 、 破 傷 風 、 偽 膜 性 結 腸 炎 、 壞 疽 、 食 物 中 毒 及 類 似 者 。

[0097] 在 另 一 態 樣 中 ， 該 醫 藥 組 成 物 包 含 本 發 明 之 具 蛋 白 分 解 活 性 之 多 肽 。 該 醫 藥 組 成 物 在 一 態 樣 中 可 被 用 於 蛋 白 分 解 切 割 與 兼 同 凝 集 有 關 之 多 肽 ， 特 別 是 治 療 兼 同 凝 集 功 能 不 足 之 病 患 。 在 另 一 態 樣 中 ， 該 醫 藥 組 成 物 可 被 用 於 纖 維 蛋 白 溶 解 ， 特 別 是 治 療 心 肌 梗 塞 、 肺 栓 塞 、 深 層 靜 脈 血 栓 栓 塞 之 病 患 ， 即 用 於 移 除 血 栓 。 同 樣 設 想 到 的 是 使 用 醫 藥 組 成 物 治 療 中 風 。 另 外 ， 在 其 他 態 樣 中 ， 該 醫 藥 組 成 物 可 被 用 於 治 療 外 分 泌 胰 功 能 不 全 以 取 代 胰 蛋 白 酶 、 胰 凝 乳 酶 及 胃 蛋 白 酶 。 另 外 在 其 他 態 樣 中 ， 該 醫 藥 組 成 物 可 被 用 於 治 療 有 炎 症 反 應 之 病 患 、 用 於 治 療 癌 病 患 ， 特 別 是 用 於 蛋 白 水 解 切 割 表 面 暴 露 之 腫 瘤 抗 原 。 另 外 在 另 一 態 樣 中 ， 該 醫 藥 組 成 物 可 被 用 於 治 療 乳 頭 狀 瘤 。

[0098] 本 發 明 亦 關 於 一 種 篩 選 抑 制 劑 之 方 法 ， 該 方 法 包 含 下 列 步 驟 ： (a) 使 本 發 明 之 具 蛋 白 分 解 活 性 之 多

肽與已知底物及可任意選擇地假定抑制劑接觸；及（b）測定該假定抑制劑對底物轉換成切割產物之影響，其中切割產物之量減少表示該假定抑制劑之抑制作用。在一態樣中，該假定抑制劑係包含選自 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者之胺基酸序列之肽，其中該胺基酸序列之至少一個鹼性胺基酸係由非鹼性胺基酸取代。在其他態樣中，該肽包含一或多種化學修飾。在另一態樣中，該抑制劑係該肽之擬肽。在另一態樣中，該假定抑制劑係化學化合物微陣列之一部分，即有機化學化合物之集。在另一態樣中，該抑制劑係本發明之抗體。此方法可用於識別能抑制本發明之具蛋白分解活性之多肽之化合物。初步篩選可根據例如包含選自 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者之胺基酸序列之肽。能抑制本發明之多肽之肽可經修飾以增加抑制。修飾包括胺基酸取代或化學修飾。通常，此方法係藉由使本發明之多肽與已知底物在假定抑制劑存在及不存在下接觸（該方法之步驟（a））且藉由比較該假定抑制劑對於底物轉換為切割產物之影響進行。在假定抑制劑存在下轉換率減少，表示抑制效應。

[0099] 本發明亦關於一種對本發明之具蛋白分解活性之多肽之抑制劑，其中該抑制劑係（a）包含如 SEQ ID NO:4 至 25 之任一者所示之胺基酸序列之抑制劑，其中包含於其中之鹼性胺基酸係由非鹼性胺基酸取代；或（b）本發明之抗體。

[0100] 本說明書中引證之所有文獻以參照方式就彼

等之整體揭示內容及本說明書中特別提及之揭示內容併入此處。

條款

[0101]

1. 一種具蛋白分解活性之多肽，其包含與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列。

2. 一種核酸分子，其包含編碼條款 1 之多肽之核酸序列及可任意選擇地調節元件。

3. 一種載體，其包含如條款 2 所述之核酸分子。

4. 一種細胞，其包含如條款 2 所述之核酸分子或如條款 3 所述之載體。

5. 一種製造具蛋白分解活性之多肽之方法，其包含下列步驟：

(a.) 化學合成或自核苷酸序列轉譯多肽，該多肽包含與 SEQ ID NO:1 之序列具有至少 50% 序列一致性之多肽序列；及

(b.) 純化步驟 (a.) 之多肽。

6. 一種多肽，其可由條款 5 之方法獲得。

7. 一種抗體，其與如條款 1 或 6 所述之多肽專一性結合。

8. 一種如條款 7 所述之抗體於純化如條款 1 或 6 所述之多肽之方法中的用途。

9. 一種製造經蛋白分解處理之多肽之方法，其包含

使下述 (a) 與 (b) 接觸之步驟：

(a) 第一多肽，該第一多肽係選自如條款 1 或條款 6 所述之多肽、Lys-N、Lys-C、精胺鹼基內肽酶、纖維蛋白溶酶或 omptin，

(b) 第二多肽，該第二多肽係易被該第一多肽蛋白分解；

其中該接觸導致蛋白分解處理該第二多肽成為至少二個切割產物。

10. 如條款 9 之方法，其中該第二多肽包含與選自 SEQ ID NO:3 至 25 之任一者之多肽序列具有至少 50% 序列一致性之胺基酸序列；

較佳地其中該第一多肽蛋白分解切割該第二多肽於位置緊鄰 SEQ ID NO:3 至 25 之任一者之該序列內之鹼性胺基酸殘基（例如 His、Lys、Arg）的 C 端。

11. 如條款 9 或條款 10 所述之方法，其中該第二多肽係芽胞梭菌神經毒素（例如 BoNT/A）。

12. 如條款 11 之方法，其中該芽胞梭菌神經毒素係選自缺乏功能性結合結構域（H_{cc}）因此無法與天然芽胞梭菌神經毒素受體結合之芽胞梭菌神經毒素多肽（例如包含芽胞梭菌神經毒素之 LH_N 片段或由該片段組成之多肽）、具有與天然芽胞梭菌神經毒素受體結合之經修飾之芽胞梭菌神經毒素結合結構域（H_{cc}）之芽胞梭菌神經毒素多肽，或具有使該芽胞梭菌神經毒素與非天然芽胞梭菌神經毒素受體結合之非芽胞梭菌結合結構域之芽胞梭菌神

經毒素多肽（該多肽可選擇性地缺乏功能性結合結構域（H_{cc}）以最小化該芽胞梭菌神經毒素與天然芽胞梭菌神經毒素受體之結合）。

13. 如條款 12 之方法，其中該芽胞梭菌神經毒素之 L 鏈及 H 鏈成分係源自相同或不同的芽胞梭菌神經毒素血清型及／或亞型。

14. 如條款 9 至 13 項中任一項所述之方法，其中該第二多肽係藉由在大腸桿菌中重組表現製備之單鏈芽胞梭菌神經毒素。

15. 如條款 9 至 14 項中任一項所述之方法，其中該第二多肽係單鏈芽胞梭菌神經毒素，且其中該第一與第二多肽之間的接觸導致芽胞梭菌神經毒素雙鏈多肽，其包含與芽胞梭菌神經毒素 H 鏈成分藉由雙硫鍵共價連接之芽胞梭菌神經毒素 L 鏈成分。

16. 如條款 9 至 15 項中任一項所述之方法，其中該經蛋白分解處理之第二多肽係芽胞梭菌神經毒素雙鏈多肽，其中該 L 鏈之 C 端及該 H 鏈之 N 端，係與由野生型芽胞梭菌中之該相同單鏈芽胞梭菌神經毒素多肽所產製之對應雙鏈芽胞梭菌神經毒素的對應端一致。

17. 如條款 9 至 16 項中任一項所述之方法，其中該經蛋白分解處理之第二多肽係芽胞梭菌神經毒素雙鏈多肽，當其與由野生型芽胞梭菌中之該相同單鏈芽胞梭菌神經毒素多肽所產製之對應芽胞梭菌神經毒素雙鏈多肽比較時，其具有一致之胺基酸序列。

18. 一種如條款 9 至 17 項中任一項之方法之用途，其係用於評估產品品質或產製藥品。

19. 一種藉由如條款 9 至 18 項中任一項之方法獲得之組成物，其中該組成物包含經處理與未經處理之第二多肽之混合物，該混合物包含低於 5% 之未經處理之第二多肽。

20. 一種用於篩選抑制劑之方法，該方法包含下列步驟：

(a) 使如條款 1 或 6 所述之多肽與已知底物及可任意選擇地假定抑制劑接觸；及

(b) 測定該假定抑制劑對底物轉換成切割產物之影響，

其中切割產物之量減少表示該假定抑制劑之抑制作用。

21. 一種如條款 1 或 6 所述之具蛋白分解活性之多肽之抑制劑，其中該抑制劑係

(a.) 包含如 SEQ ID NO:4 至 25 中任一者所示之胺基酸序列之抑制劑，其中包含於其中之鹼性胺基酸係由非鹼性胺基酸取代；或

(b.) 如條款 7 之抗體。

22. 一種醫藥組成物，其包含如條款 1 或 6 所述之多肽、如條款 7 所述之抗體、如條款 19 所述之組成物或如條款 21 所述之抑制劑。

【圖式簡單說明】

[0102]

圖 1：自 HiPrep 16/10 Q FF 收集之組分的活性測試。

自 HiPrep 16/10 Q FF 流析收集之 5 μ l 組分，藉由於 37°C 下與 2 μ g scBoNTA（第 2 行）培養 1 小時然後以 10 % SDS-PAGE 以分析酶活性。第 1 行：低分子量標誌（LMW）：116 kDa、66 kDa、45 kDa、35 kDa。

圖 2：藉由 12.5% SDS-PAGE 分析自 SEC（HiLoad 16/60 Superdex 75）收集之組分中的 nBH 含量（分子量 ~37.3 kDa）。組分 9 至 11 主要包含 nBH。（第 1 行：LMW：116 kDa、66 kDa、45 kDa、35 kDa、25 kDa、18.4 kDa、14.4 kDa）

圖 3：以 12.5% SDS-PAGE 分析測定三個 nBH 純化批量之純度及蛋白濃度。

第 1 行，LMW（116 kDa，66 kDa，45 kDa，35 kDa，25 kDa，18.4 kDa，14.4 kDa）；第 2 行，nBH 批號 TE311206（192 ng/ μ l 成熟 NT02CB1446/CBO1444，Genbank 編號 CAL82987.1 之胺基酸 254 至 594，MW：38.6 kDa）；第 3 行，nBH 批號 TIK301009（130 ng/ μ l 成熟 NT02CB1447/CBO1445，SEQ ID NO:1，Genbank 編號 CAL82988.1 之胺基酸 249 至 581，MW：37.3 kDa）；第 4 行，nBH 批號 TIK280509（114 ng/ μ l 成熟 NT02CB1447/CBO1445，SEQ ID NO:1，Genbank 編號 CAL82988.1 之胺基酸 249 至 581，MW：37.3 kDa）。

圖 4：ESI-MS/MS 譜圖分析報告。

nBH 批號 TE311206 之 38.6 kDa 蛋白帶係經識別為 NT02CB1446/CBO1444，Mascot 得分 725，肽 MS/MS 序列涵蓋率為整個開放閱讀框（ORF）之 29.6%。沒有識別到源自 N 端 253 個胺基酸之肽（灰色框識別為 MS 肽；紅色方塊識別為在 MS/MS 衰變之後肽之胺基酸 y-/b-離子）。批號 TE311206 之 MS/MS 分析顯示根據形成 nBH 之 C 端胺基酸 254 至 594，序列涵蓋率為 52%。

圖 5：ESI-MS/MS 譜圖分析報告。

nBH 批號 TIK301009 之 37.3 kDa 蛋白帶係經識別為 NT02CB1447/CBO1445，Mascot 得分 555，肽 MS/MS 序列涵蓋率為整個開放閱讀框（ORF）之 28.4%。除了一肽以外，所有肽（灰色框識別為 MS 肽；紅色方塊識別為在 MS/MS 衰變之後肽之胺基酸 y-/b-離子）皆識別為源自 C 端 333 個胺基酸。批號 TIK301009 之 MS/MS 分析顯示根據形成 nBH 之 C 端胺基酸 249 至 581，序列涵蓋率為 49.5%。

圖 6：比較源自三個純化批量之 nBH 的濃度依賴性蛋白分解活性。

A 利用 12.5% SDS-PAGE 之活性測試分析源自批號 TIK301009、TIK280509 及 TE311206 之 nBH，使用濃縮 nBH 之下列稀釋液：1:10、1:30、1:100、1:300、1:1000。該測試係藉由於 37°C 下培養 1 μ g scBoNT/A 及 2 μ l dH₂O 與 1 μ l 之對應稀釋 nBH 60 分鐘進行。在 SDS-PAGE 分析

中，添加 3 μ l 之還原性 4x SDS Laemmli 緩衝液至終體積 10 μ l。150 kDa scBoNT/A 被切割成 100 kDa 重鏈及 50 kDa 輕鏈。

B 重鏈、輕鏈及 scBoNT/A 之蛋白帶之光學密度係經定量，將輕鏈及重鏈產物帶之總和除以 LC、HC 及 scBoNT/A 蛋白帶之總和。較高稀釋倍數之第一多肽減少切割率。三個不同批量之特定蛋白分解活性幾乎一致。

圖 7：nBH 對 scBoNT/A 野生型及包含修飾圈環之突變物的時間依賴性切割。

A 圈環序列修飾。在 scBoNTAS Throm 中，所有離胺酸殘基皆被移除，取而代之地插入凝血酶辨認區序列 LVPRGS，然而在 scBoNT Res 中，該圈環缺乏任何鹼性胺基酸。縮短圈環至 8 個小型殘基或具有大型側鏈之 5 個胺基酸分別產生 scBoNTAS(GGSG)₂ 及 scBoNTAS FQWYI。在 scBoNTAS CGS-C 中，整個圈環被刪除且形成半胱胺酸之雙硫鍵被甘胺酸及絲胺酸取代。

B scBoNT/A 野生型及突變物之時間依賴性切割之 SDS-PAGE 分析。

C scBoNTAS 野生型被 nBH 以時間依賴性方式在 120 分鐘內活化成為輕鏈及重鏈。缺乏離胺酸及插入單一精胺酸殘基延長該圈環之切割（scBoNTAS Throm）。缺乏任何鹼性殘基之圈環仍可被切割（scBoNTAS Res）。縮短圈環至 8 聚體肽、導入具有大型側鏈之 5 個胺基酸或刪除整個圈環產生不可切割之 scBoNT/A。

圖 8：以 nBH 消化 scBoNT/A 後 50 kDa 及 100 kDa 切割產物之 MS/MS 分析。

A 50 kDa 切割產物之分析，其被識別為 BoNT/A 之輕鏈，Mascot 得分 1460。最 C 端肽涵蓋胺基酸 G433 至 K438，其對應 BoNT/A LC 之生理性觀察 C 端。

B 100 kDa 切割產物之分析，其被識別為 BoNT/A 之重鏈，Mascot 得分 96。最 N 端肽涵蓋胺基酸 A449 至 K456，其對應 BoNT/A HC 之生理性觀察 N 端。

圖 9：A 以 12.5% SDS-PAGE 分析三次匯集之抗 nBH-IgY 的蛋白含量 (mg/ml)。B ELISA：Nunc Maxisorp F96 微滴定盤係以不同批量之 PBS 中之 nBH (500 ng/mL) 於 4°C 下隔夜包覆，接著以含有 0.1% Tween-20 及 2% 無脂脫脂奶粉之 PBS 封閉緩衝液封閉 1 小時。在清洗後，添加每次匯集之 IgY 稀釋液 (10 µg/ml 於封閉緩衝液中) 1 小時，接著利用經生物素標記之驢抗雞 IgY、鏈黴抗生物素蛋白-辣根過氧化酶 (二者皆為 Dianova, Hamburg, Germany) 及 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺 (Sigma) 檢測。

圖 10：A 重組表現及藉由 Talon IMAC 分離不具活性之 BH 1-581 (63 kDa)。10% SDS-PAGE 分析 Talon IMAC 組分 (LMW：116 kDa、66 kDa、45 kDa、35 kDa、25 kDa；SS34，清澈溶解物；TD，流出物；W，清洗組分；E1-E7，咪唑洗脫組分 1 至 7)。B 在 37°C 下培養 1 小時後沒有觀察到有 scBoNT/A 被重組 iBH (SEQ ID

NO:2; “E”; 63 kDa) 內蛋白分解成 LC (50 kDa) 及 HC (100 kDa) (第 6 行) (LMW: 116 kDa、66 kDa、45 kDa、35 kDa、25 kDa)。

圖 11：使用經純化之活性 BoNT 水解酶 (nBH) 獲得經蛋白分解處理之多肽。

A 200 μ g 之重組純化 scBoNT/A 係與 350 ng 之經純化之活性 BoNT 水解酶於 37°C 下培養 12 分鐘。要停止反應，藉由 SEC (管柱 Superdex 200 10/300 GL，緩衝液：50 mM NaP pH 7.5，150 mM NaCl，樣本體積 = 0.3 ml，流速 = 0.25 ml/分鐘) 移除 nBH，切割之量藉由 10% SDS-PAGE 分析。B 包含 ~40% 經處理之 BoNT/A 之組分 1 (1800 μ l) 係與 350 ng 經純化之活性 BoNT 水解酶於 37°C 下培養 15 分鐘，並藉由超過濾濃縮至 300 μ l。最後要停止反應，藉由 SEC (管柱 Superdex 200 10/300 GL，緩衝液：50 mM NaP pH 7.5，150 mM NaCl，樣本體積 = 0.3 ml，流速 = 0.25 ml/分鐘) 移除 nBH，切割之量藉由 10% SDS-PAGE 分析。C 包含 ~80% 經處理之 BoNT/A 之組分 1 及 2 (1800 μ l) 係經組合並與 120 ng 經純化之活性 BoNT 水解酶於 37°C 下培養 25 分鐘，並藉由超過濾濃縮至 300 μ l。最後要停止反應，藉由 SEC (管柱 Superdex 200 10/300 GL，緩衝液：50 mM NaP pH 7.5，150 mM NaCl，樣本體積 = 0.3 ml，流速 = 0.25 ml/分鐘) 移除 nBH，切割之量藉由 10% SDS-PAGE 分析。獲得 >95% 經處理之 BoNT/A (SEQ ID NO.3)。

圖 12：藉由 Lys-C 活化肉毒神經毒素（BoNT）。

圖 12A 顯示 BoNT/A1 藉由 Lys-C 活化以產生成熟雙鏈形式，其中重鏈係藉由單一雙硫鍵與輕鏈連接。SDS-PAGE 凝膠上之總蛋白經染色，在還原條件下電泳。第 1 行代表分子量標記。第 2 行代表在以 Lys-C 處理前之單鏈 BoNT/A1。第 3 至 10 行代表經 Lys-C 處理後之 BoNT/A1（在 37℃ 下分別以 12.5、6.25、3.12、1.56、0.72、0.39、0.20 及 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 之酶：底物比處理 2 小時）。

圖 12B 顯示 BoNT/A1 具有 90% 之純度，使用 Lys-C 達到 97% 活化。染色 SDS-PAGE 凝膠上之總蛋白。第 1 行代表在以 Lys-C 處理前之單鏈 BoNT/A1 非還原樣本。第 2 行係 BoNT/A1 在經 Lys-C 處理後、製備成儲存樣本之前之非還原樣本。第 3 及 4 行分別指 BoNT/A1 在無及有還原劑存在下，經內蛋白酶 Lys-C 處理之最終儲存樣本。第 5 行代表分子量標記。

圖 13：比較 Lys-C 蛋白酶與胰蛋白酶活化之肉毒神經毒素（BoNT）。

圖 13A 顯示總蛋白經染色之 SDS-PAGE。第 1 及 2 行代表在氧化（第 1 行）及還原（第 2 行）條件下之胰蛋白酶處理前的 BoNT/A1。第 3 至 12 行代表在氧化及還原條件下經胰蛋白酶處理（37℃，各種酶：底物比處理 2 小時）後之 BoNT/A1。第 13 行代表分子量標記。

圖 13B 顯示總蛋白經染色之 SDS-PAGE。第 1 行代表分子量標記。第 2 行代表在蛋白酶處理前之 BoNT/A1。第

3 行代表在以 Lys-C 處理後之 BoNT/A1。第 4 行代表在以胰蛋白酶處理後之 BoNT/A1。

圖 14：經 Lys-C 蛋白酶處理後之肉毒神經毒素 A1 切割產物的質譜分析。

單鏈 BoNT/A1 具有如圖所示之一級胺基酸序列。Lys-C 之蛋白分解活化切割輕鏈與重鏈區域之間的至少二個肽鍵；此產生成熟雙鏈形式。胺基酸 TKSLDKGYNK（在該圖以粗體、較大字型且畫底線表示）自該成熟形式被切除。

圖 15：分析經 Lys-C 蛋白酶處理後之肉毒神經毒素（BoNT）之功能性，與經胰蛋白酶切割之 BoNT 比較。

參考圖 15A，單鏈重組 BoNT/A1 係經 Lys-C 蛋白分解活化，接著進一步純化（藉由苯基瓊脂糖管柱層析）以分離成熟雙鏈 BoNT/A1 與 Lys-C。多種濃度之此經純化、經活化之 BoNT/A1 被添加至生長中之大鼠胚胎脊椎神經元（eSCN）原代培養，培養 24 小時。接著收集該經處理之 eSCN，進行西方墨點分析以測量 BoNT/A1 對 25kDa 細胞內突觸相關蛋白（SNAP25）之切割。相同實驗也利用天然 BoNT/A1 進行。比較經重組 Lys-C 活化之 BoNT/A1 及天然 BoNT/A1 切割細胞內 SNAP25 之相對效價。重組 Lys-C 活化之 BoNT/A1 以 11.94 ± 0.10 之 pEC50（1.2pM）切割 SNAP25。天然 BoNT/A1 以 12.09 ± 0.03 之 pEC50（0.49pM）切割 SNAP25。因此重組 Lys-C 活化之 BoNT/A1 與天然 BoNT/A1 具有類似高效價。

相較於 Lys-C 活化之 BoNT/A1，藉由胰蛋白酶活化之重組 BoNT/A1 顯示降低活性。參照圖 15B，單鏈重組 BoNT/A1 係藉由胰蛋白酶蛋白分解活化，接著（藉由苯基瓊脂糖管柱層析）進一步純化以分離成熟雙鏈 BoNT/A1 與胰蛋白酶。此經純化、經活化之 BoNT/A1 以和 Lys-C 活化材料相同之方式測試切割細胞內 eSCN SNAP25 之效價（相較於天然 BoNT/A1）。重組、胰蛋白酶活化之 BoNT/A1 以 10.23 ± 0.19 之 pEC50（59.3pM）切割 SNAP25。天然 BoNT/A1 以 11.56 ± 0.08 之 pEC50（2.8pM）切割 SNAP25。因此重組、胰蛋白酶活化之 BoNT/A1 之效價相較於天然 BoNT/A1 及重組、Lys-C 活化之 BoNT/A1 皆減少。

圖 16：胰蛋白酶切割除 A1 亞型以外之其他肉毒神經毒素 A 亞型的活化區域以外。

溶解於緩衝液（25mM Tris/HCl pH 8.0，125mM NaCl）中之單鏈重組 BoNT/A5（0.5mg/ml）係藉由胰蛋白酶（1:50 至 1:200 酶：底物比）於 37°C 下蛋白分解活化 5 至 30 分鐘，之後該反應藉由莫耳過量之大豆胰蛋白酶抑制劑抑制。圖 16A 顯示，BoNT/A5 的結構域間區域被切割，產製其中重鏈藉由單一雙硫鍵與輕鏈連接之雙鏈形式。胰蛋白酶還切割重鏈內之至少一個額外位點，產生截短重鏈。重鏈有清楚的運動位移，因為被截短。SDS-PAGE 中的總蛋白被染色。第 1 行代表分子量標記。第 2 及 3 行代表在氧化（第 2 行）及還原（第 3 行）條件下之

胰蛋白酶處理前的 BoNT/A5。第 4 至 9 行代表在氧化及還原條件下經胰蛋白酶處理（37℃，各種酶：底物比處理 5 分鐘）後之 BoNT/A5。第 10 行代表分子量標記。

參考圖 16B，BoNT/A1 之 C 端的胰蛋白酶切割位點之一級序列保留於其他 BoNT/A 亞型。

圖 17：以 Lys-C 蛋白酶處理肉毒神經毒素除了 A1 亞型以外之 A2 亞型。

溶解於緩衝液（25mM Tris/HCl pH 8.0，125mM NaCl）中之單鏈重組 BoNT/A2（0.3mg/ml）係藉由 Lys-C（1:750 酶：底物比）於 37℃ 下蛋白分解活化 2 小時，之後該反應藉由 0.4 μM 之專一性絲胺酸蛋白酶抑制劑 4-（2-胺基乙基）苯磺醯基）氟鹽酸鹽（AEBSF）（Lys-C 活化）抑制。SDS-PAGE 中的總蛋白被染色。第 1 行代表分子量標記。第 2 行代表在蛋白酶處理前之 BoNT/A2。第 3 及 4 行代表經 Lys-C 處理後之 BoNT/A2。BoNT/A2 藉由 Lys-C 活化以產生成熟雙鏈形式，其中重鏈係藉由單一雙硫鍵與輕鏈連接。

圖 18：以 Lys-C 蛋白酶處理肉毒神經毒素除了 A1 亞型以外之 A6 亞型。

溶解於緩衝液（50mM Tris/HCl pH 8.0，125mM NaCl）中之單鏈重組 BoNT/A6（0.5mg/ml）係藉由 Lys-C（0.4 μg/ml）於 4℃ 下蛋白分解活化 20 小時，接著進一步純化（苯基瓊脂糖管柱層析）以分離成熟雙鏈 BoNT/A1 與 Lys-C。SDS-PAGE 中的總蛋白被染色。第 1 行代表分

子量標記。第 2 行代表在 Lys-C 處理後之 BoNT/A6。第 2 行在還原條件下電泳。連接輕鏈與重鏈之雙硫鍵在這些條件下被還原，各鏈根據彼之分子量移動。如圖所示，BoNT/A6 被 Lys-C 活化以產生成熟雙鏈形式。

圖 19：形成橋接輕鏈與重鏈之 HN 部分之鏈間雙硫鍵的二個半胱胺酸殘基之胺基酸位置。

BoNT 之胺基酸序列廣為周知。該圖顯示 BoNT/A 亞型 A1 至 A6 各者中形成橋接輕鏈與重鏈之 HN 部分的鏈間雙硫鍵之二個半胱胺酸殘基之胺基酸位置（位置 430 及 454）。

圖 20：藉由 Arg-C 活化肉毒神經毒素（BoNT）。

圖 20 顯示 BoNT/A1 藉由 Lys-C 活化以產生成熟雙鏈形式，其中重鏈係藉由單一雙硫鍵與輕鏈連接。SDS-PAGE 凝膠上之總蛋白經染色，在還原條件下電泳。第 1 行代表分子量標記。第 2 至 6 行代表經 Arg-C 處理（在 8 °C 下處理 2 小時，活化蛋白酶濃度分別為 2000、400、80、16、3.2 及 0.39 U/μl）後之 BoNT/A1。第 8 行代表未暴露於 Arg-C 之單鏈 BoNT/A（未活化）。

圖 21：藉由纖維蛋白溶酶活化肉毒神經毒素（BoNT）。

圖 21 顯示 BoNT/A1 藉由纖維蛋白溶酶活化以產生成熟雙鏈形式，其中重鏈係藉由單一雙硫鍵與輕鏈連接。SDS-PAGE 凝膠上之總蛋白經染色，在還原條件下電泳。第 1 行代表分子量標記。第 2 至 9 行代表經纖維蛋白溶酶

處理（在 8℃ 下處理 2 小時，活化蛋白酶濃度分別為 5、2.5、1.25、0.63、0.31、0.16、0.08 及 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）後之 BoNT/A1。第 10 行代表未暴露於纖維蛋白溶酶之單鏈 BoNT/A（未活化）。

圖 22：藉由 Lys-N 活化肉毒神經毒素（BoNT）（4℃ 反應）。

圖 22 顯示 BoNT/A1 藉由 Lys-N 活化以產生成熟雙鏈形式，其中重鏈係藉由單一雙硫鍵與輕鏈連接。SDS-PAGE 凝膠上之總蛋白經染色，在還原條件下電泳。第 1 行代表分子量標記。第 2 行代表未暴露於 Lys-N 之單鏈 BoNT/A（未活化）。第 3 至 10 行代表經 Lys-N 處理後之 BoNT/A1（在 4℃ 下分別以 12.5、6.25、3.12、1.56、0.72、0.39、0.20 及 0.10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 之活化蛋白酶濃度處理 2 小時）。

【實施方式】

[0103] 下列實施方式說明本發明，無論如何不應被視為對其範圍之限制。

[0104]

實施例 1：天然 BoNT 水解酶（nBH）之純化及特徵化，其專一性切割單鏈 BoNT/A 成為彼之活性雙鏈形式

（1）讀取系統／活性測試：為了專一性檢測及純化在肉毒芽胞梭菌（*C. botulinum*）之培養上清液中及層析步驟之間水解肉毒神經毒素 A（BoNT/A）成為 50 kDa 輕

鏈 (LC) 及 100 kDa 重鏈 (HC) 之酶活性，我們在大腸桿菌 (*E. coli*) 中表現 150 kDa BoNT/A 為單鏈 (sc) 多肽。培養該重組 scBoNT/A 與適當酶活性 (nBH) 應產生可藉由還原性 10-13% SDS-PAGE 看見之 50 kDa LC 及 100 kDa HC。

(2) 芽胞梭菌蛋白酶表現：肉毒芽胞梭菌株 ATCC 3502 之單一菌落係於 100 ml 腦心浸液 (BHI) 培養基中培養，該培養液於 37°C、厭氧條件下隔夜培養。10 ml 之 O/N 培養液係經接種至 1 l BHI 培養基，厭氧培養 48 至 72 小時。

(3) 硫酸銨沉澱：1 l 培養上清液係藉由離心收集 (4°C, 6500xg, 25 分鐘)。添加硫酸銨至終濃度 85% (在此為 575 g)，於 4°C 攪拌懸浮液 6 小時，接著離心 (4°C, 6500xg, 30 分鐘)。成團塊之硫酸銨沉澱係經溶解於小體積 (在此為 5 ml) 之 50 mM NaP pH 7.5，並以 50 mM NaP, 150 mM NaCl pH 7.5 透析。最後，該透析液經離心 (4°C, 40000xg, 60 分鐘)，上清液用於 IEC。

(4) 離子交換層析 (IEC, 管柱 HiPrep 16/10 Q FF)：取 (3) 之上清液 (圖 1, 第 3 行) 施用於 HiPrep 16/10 Q FF 陰離子交換管柱，該管柱經包含 50 mM NaP pH 7.5, 150 mM NaCl 之緩衝液平衡及流析。流析以 1 ml/分鐘之流速進行。活性測試係藉由於 37°C 下培養 5 µl 之所有其他組分與 2 µg scBoNTA 進行，接著利用 SDS-PAGE 分析 (圖 1)。組合組分 6 至 24，利用超過濾

(Amicon-Ultra MWCO 10,000) 將彼之體積濃縮至 3.5 ml。

(5) 分子排阻層析 (SEC , HiLoad 16/60 Superdex 200) : 接著 , 將 (4) 之濃縮蛋白溶液裝入 HiLoad 16/60 Superdex 200 管柱 , 以 50 mM NaP pH 7.5 , 150 mM NaCl 平衡。分離以 1 ml/分鐘之流速進行。滯留體積介於 80 ml 至 100 ml 之組分係利用活性測試 (1) 分析 , 含有該酶活性 (nBH) 之適當組分係經組合 (~ 10 ml) 並藉由超過濾濃縮至 3 ml。接著 , 添加硫酸銨至終濃度 12.5% = 500 mM (+0.2 g) 。

(6) 疏水交互作用層析 (HIC , HiTrap 苯基瓊脂糖) : nBH 係與苯基瓊脂糖於緩衝液 A (50 mM NaP pH 7.5 , 500 mM 硫酸銨) 中結合。經結合之 nBH 藉由減少硫酸銨之量洗脫 (以 1 ml/分鐘之流速線性增加緩衝液 B (50 mM NaP pH 7.5) 梯度) 。所有含蛋白之組分利用活性測試 (1) 分析 , 適當組分係經組合及藉由超過濾濃縮至 3.5 ml。溶液之緩衝液調整至 50 mM NaP pH 7.5; 150 mM NaCl。

(7) SEC (HiLoad 16/60 Superdex 75) : 最後 , 藉由 SEC 純化 nBH , 使用 HiLoad 16/60 Superdex 75 管柱 , 流速 1 ml/分鐘之 50 mM NaP pH 7.5 , 150 mM NaCl。滯留體積介於 70 ml 至 80 ml 之組分係藉由 12.5% SDS-PAGE (圖 2) 分析 , 移動至 ~37.3 kDa 之含有 nBH 之組分 8 至 12 係經組合 (~ 10 ml) 並藉由超過濾濃縮至 1 ml。

(8) 移動至約 37.3 kDa 之主要蛋白 (nBH) 係根據 Edman 降解程序藉由 N 端肽定序分析。該識別肽之序列係 V Q G Q S V K G V G，對應 SEQ ID NO:1 的前十個殘基。

(9) 二批 nBH (NT02CB1447, 37.3 kDa, 圖 3 第 3 行: TIK301009, 第 4 行: TIK280509) 係根據上述方法可再現性分離。經下述調整分離方法得到 nBH 異構體 NT02CB1446 (38.6 kDa, 圖 3 第 2 行, 批號 TE311206): (i) 肉毒芽胞梭菌培養生長: 18 小時而非 48 至 72 小時; (ii) 層析步驟變化: IEC → SEC Superdex 75 → HIC 苯基瓊脂糖, 而非 IEC → SEC Superdex 200 → HIC 苯基瓊脂糖 → SEC Superdex 75。

[0105]

實施例 2: 藉由質譜法 (MS) 自肉毒芽胞梭菌識別 nBH 之序列

(1) 胰蛋白酶消化: 切除在 SDS-PAGE 移動至大約 38 kDa 之蛋白帶 (nBH) 以供胰蛋白酶消化, 使其在 37 °C 下於 50 mM NH_4HCO_3 , 50% 乙腈中輕搖 30 分鐘以脫色。重複脫色直到凝膠斑點變透明。添加乙腈 (100%) 並在 3 分鐘後移除。接著在真空離心乾燥機 (Eppendorf, Germany) 中乾燥斑點。添加胰蛋白酶 (10 ng/ μl) (在 50 mM NH_4HCO_3 中), 於冰上培養 1 小時。接著, 移除剩餘之胰蛋白酶溶液, 加入小體積 50 mM NH_4HCO_3 , 於 37 °C 下進行隔夜消化。收集上清液, 利用 5% TFA, 10

%乙腈萃取凝膠片二次。匯集組合所有液體，在真空離心乾燥機中乾燥，萃取肽係儲存於 4℃。

(2) 介質輔助雷射脫附離子化飛行時間 (MALDI-TOF/TOF) MS：樣本於 MALDI-TOF/TOF 質譜儀 (Ultraflex1 Bruker Daltonik GmbH) 中以線性模式、加速電壓 25 kV 分析。檢測自 700 m/z 至 4,500 m/z 之質量。樣本 (2 μ l) 以含有 50% 乙腈及 0.2% 三氟醋酸 (TFA) 之 2 μ l 芥子酸溶液直接在不鏽鋼 MALDI 標靶板上共結晶。每個樣本收集 500 發雷射點。

(3) 逆相層析肽分離：肽分離係藉由逆相層析進行，使用由自動採樣機及梯度幫浦組成之奈米 HPLC 系統 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)。該樣本係溶解於緩衝液 A (5% 乙腈，0.1% 甲酸)，取最多 10 μ l 之等分以流速 5 μ l/分鐘注射至 C18 管柱 (Zorbax SB-C18, 5 μ m, 300 Å, 0.5 mm 內徑，長度 15 cm)。在裝載後，管柱以緩衝液 A 清洗 15 分鐘，肽利用自 0% 至 100% 洗脫液 B 之洗脫液 A 及洗脫液 B (70% (v/v) 乙腈於 0.1% (v/v) 甲酸中) 之梯度於 75 分鐘內洗脫。

(4) 電噴灑離子化 (ESI) 介接及離子阱質譜法：HPLC 出口係直接與離子阱質譜儀之奈米型 ESI 來源連接，使用 Agilent 共軸鞘液體噴霧器 (Agilent Technologies)。出口毛細管係由環繞式鋼針持握，突出 0.1 至 0.2 mm。噴霧係藉由 N₂ 作為噴霧器氣體 (5 l/分鐘) 加以穩定。離子化電壓設定於 4,500 V，乾燥氣體以

5 psi 及 250°C 供應。光譜以 Esquire3000+離子阱質譜儀 (Bruker Daltonik) 每秒 13,000 m/z 之掃描速度收集。使用正離子模式之 ESI，質譜資料在 50 至 1600 m/z 掃描模式獲得，視資料需求可在 MS 及 MS/MS 分析之間切換。為了增加 MS/MS 譜圖之品質，MS/MS 分析僅選擇來自一譜圖之二種前驅離子，主動排除設定於 2 分鐘以排除已經被測量過的前驅離子。

(4) 資料處理：資料處理利用 Data Analysis (3.0 版) 及 BioTools (3.0 版) 套裝軟體 (Bruker Daltonik) 進行。蛋白識別係利用 MASCOT 軟體 (2.1 版) 及 MSDB 資料庫 (Matrix Science, London, UK) 進行。

(5) 結果：

[0106]

表 2：藉由 MS 識別之 nBH

行數	nBH 批號	蛋白濃度	ORF 名稱	Genbank 編號	ORF 之 胺基酸	MW [kDa]	Mascot 得分
2	TE311206	192 ng/μl	NT02CB1446 CBO1444	CAL82987.1	254-594	38.6	725
3	TIK301009	130 ng/μl	NT02CB1447 CBO1445	CAL82988.1	249-581	37.3	555
4	TIK280509	114 ng/μl	NT02CB1447 CBO1445	CAL82988.1	249-581	37.3	609

第 2 行之 38.6 kDa 蛋白帶 (nBH 批號 TE311206) 係經識別為 NT02CB1446/CBO1444，Mascot 得分 725，肽 MS/MS 序列涵蓋率為整個開放閱讀框 (ORF) 之 29.6%。

沒有識別到源自 N 端 253 個胺基酸之肽（圖 4）。批號 TE311206 之 MS/MS 分析顯示根據形成 nBH 之 C 端胺基酸 254 至 594，序列涵蓋率為 52%。

第 3 行（nBH 批號 TIK301009）及第 4 行（nBH 批號 TIK280509）之 37.3 kDa 蛋白帶分別被識別為具有 Mascot 得分 555 及 609 之 NT02CB1447/CBO1445。除了一肽以外，所有識別之肽皆源自 C 端 333 個胺基酸（圖 5）。批號 TIK301009 之 MS/MS 分析顯示根據形成 nBH 之 C 端胺基酸 249 至 581，序列涵蓋率為 49.5%。

[0107]

實施例 3：nBH 之酶專一性特徵。

（1）比較源自三個純化批量之 nBH 的濃度依賴性蛋白分解活性（圖 6）。分析源自批號 TIK301009、TIK280509 及 TE311206 之 nBH 的不同稀釋倍數之活性測試顯示較高稀釋倍數降低切割率。這三種不同批號之蛋白分解活性幾乎一致，顯示成熟異構體 NT02CB1446（TE311206）展現與成熟 NT02CB1447（SEQ ID NO:1）類似之專一活性。

（2）使用活性測試分析 nBH 對 scBoNT/A 野生型及突變物之時間依賴性切割（圖 7）。超過 95% 之 scBoNTAS 野生型被 nBH 以時間依賴性方式在 120 分鐘內活化成輕鏈及重鏈。圈環序列係經修飾以特徵化該切割位點。在 scBoNTAS Throm 中，所有離胺酸殘基皆被移除且插入凝血酶辨認序列 LVPRGS，如此延長該切割速率。在

scBoNT Res 中，該圈環缺乏任何鹼性胺基酸，如此大幅延緩完全水解，顯示 nBH 對於在切割位點之鹼性殘基如離胺酸及精胺酸具有高度辨識偏好。另外，nBH 對圈環之可接近性受到縮短該圈環至 8 個小型殘基或具有大型側鏈之 5 個胺基酸的阻礙（scBoNTAS(GGSG)₂ 及 scBoNTAS FQWYI）。

（3）以 nBH 消化 scBoNT/A 後對 50 kDa 切割產物的 MS/MS 分析，顯示最 C 端肽涵蓋胺基酸 G433 至 K438，其對應 BoNT/A LC 之生理性觀察 C 端（圖 8A）。對於被識別為 BoNT/A 之重鏈的 100 kDa 切割產物之分析，顯示最 N 端肽涵蓋胺基酸 A449 至 K456，其對應 BoNT/A HC 之生理性觀察 N 端（圖 8B）。因此，經分離之 nBH 產生經生理性處理之 BoNT/A 且較佳地水解在離胺酸及精胺酸殘基 C 端之肽鍵。

[0108]

實施例 4：BoNT 水解酶之演化保守性及彼之異構體

SEQ ID NO:2（Genbank 編號 CAL82988.1/YP_001253958.1）之蛋白序列分析顯示三個保守性結構域。殘基 18 至 573 對應鋅金屬蛋白酶（彈性蛋白酶）或涉及胺基酸運輸及代謝之 LasB，Blast 得分 738。殘基 148 至 212 對應肽酶前肽及 YPEB 結構域或 PepSY（Blast 得分 97）。殘基 336 至 573 係包括嗜熱菌蛋白酶（thermolysin）、溶蛋白素（protealysin）、溶金菌素及中性蛋白酶之肽酶 M4 家族的一部份（Blast 得分 803）。

肉毒芽胞梭菌 ATCC 3502 之基因組定序顯示存在編碼 iBH 異構體之六個 ORF (Sebaihia et al., 2007, Genome Res.17(7):1082-1092)。其他基因組資料可得自 10 個第一組肉毒芽胞梭菌 (*C. botulinum*) 菌株及非 BoNT 分泌性產芽胞芽胞梭菌 (*C. sporogenes*)，所有皆包含編碼 iBH 之 5 至 7 個 ORF。nBH (SEQ ID NO:1) 與其他 63 種異構體共享最少 64% 胺基酸序列一致性。

[0109]

實施例 5：產製對 BoNT 水解酶具專一性之抗體

(1) 產製 IgY：16 周齡之雞 [ISA Brown and Lohmann Selected Leghorn (LSL), Spreenhagener Vermehrungsbetrieb für Legehennen GmbH, Bestensee, Germany] 被養在專門為了養雞建造之個別飼籠 (Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany)。食物 (ssniff Legehühner-Zucht 1 and 2; ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Germany) 及水可自由採食，雞從 23 至 25 周齡開始下蛋。每天收集、標示雞蛋，存放於 4℃ 直到進一步處理。所有動物飼養及實驗根據柏林當地主管機關規定進行 (No. H0069/03)。雞隻在 1 年期間經肌肉注射 (左右側胸肌) 免疫接種及補強免疫共 10 次，每次間隔 4 至 8 周。使用之間隔係根據先前研究顯示要到免疫後至少 3 周，才出現記憶細胞 (Pei and Collisson, 2005)。使用之抗原濃度係每次注射約 20 µg (nBH)。每次免疫不注射超過 500 µl 之抗原溶液。第一次免疫使用完全弗氏 (Freund's) 佐

劑，之後的補強注射使用 FIA。IgY 之純化方法係改編自 Polson et al. (1980)。簡言之，蛋黃以無菌 PBS (pH 7.4, Roche, Mannheim, Germany) 稀釋 1:2。為了去除脂肪及脂蛋白，添加 3.5% (w/v) 聚乙二醇 (PEG) 6000 (Roth, Karlsruhe, Germany)。輕柔搖晃之後離心 (於 4°C 下以 10,000×g 離心 20 分鐘)，倒出上清液，加入固體 PEG 6000 至終濃度 12% (w/v)。混合物接著如上述離心。沉澱物經溶解於 10 ml 之 PBS，添加 PEG 至 12% (重量／體積)，然後溶液經離心。最後，沉澱物被溶解於 1.2 ml 之 PBS，轉移至為透析裝置 (QuixSep, Roth, Germany)，於 4°C 下對 PBS 進行透析。蛋白含量 (mg/ml) 藉由 12.5% SDS-PAGE 分析 (圖 9A)，於 280 nm 下以光度測量，根據 Lambert-Beer 規則計算 IgY 之消光係數為 1.33。

(2) ELISA: Nunc Maxisorp F96 微滴定盤 (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) 係以不同批量之 PBS 中之 nBH (500 ng/mL) 於 4°C 下隔夜包覆，接著以含有 0.1% Tween-20 及 2% 無脂脫脂奶粉之 PBS 封閉緩衝液 (Merck, Darmstadt, Germany) 封閉 1 小時。在清洗後，添加 IgY 稀釋液 (10 µg/ml 於封閉緩衝液中) 1 小時，接著利用經生物素標記之驢抗雞 IgY、鏈黴抗生物素蛋白-辣根過氧化酶 (二者皆為 Dianova, Hamburg, Germany) 及 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺 (Sigma) 檢測。被檢測到之 nBH 係如圖 9B 所示。

(3) 西方墨點法：nBH 以 12.5% SDS-PAGE 分離，使用標準免疫墨點技術轉移至聚偏二氟乙烯膜 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) 上。膜於 4°C 隔夜封閉，與 IgY (1:5,000 於封閉緩衝液中) 一起培養 1 小時。清洗後，膜以經生物素標記之驢抗雞 IgY 探測 30 分鐘，使用鹼性磷酸酶及 CDP-Star (Perkin Elmer, Waltham, MA) 發色。

[0110]

實施例 6：重組表現 BoNT 水解酶

(1) 質體建構：編碼天然 BH (SEQ ID NO:1) 及彼之前肽 (SEQ ID NO:2) 之基因部分係藉由 PCR 擴增，使用適當之寡核苷酸及肉毒芽胞梭菌 ATCC 3502 之基因組 DNA，彼等與編碼 His6 標籤之寡核苷酸融合並插入至 pQE3 (Qiagen) 以分別產生表現質體 pQ-BH1445H6-249-581 及 pQ-BH1445H6-1-581。核苷酸序列係藉由 DNA 定序證實。

(2) 純化重組蛋白：與羧基端 His6 標籤融合之 nBH 及 iBH 係利用大腸桿菌株 M15pREP4 (Qiagen) 在室溫下培養 10 小時產製，並使用 Talon-瓊脂糖珠 (Clontech Inc.) 根據廠商說明純化。包含所欲蛋白之組分係經匯集，在液態氮中冷凍，保存於 -70°C。iBH 係經分離為 MW 63 kDa 之重組蛋白 (圖 10A)。iBH 之不具活性利用活性測試顯示：在 37°C 下培養 1 小時後，沒有 scBoNT/A wt 被水解成 LC 及 HC (圖 10B)。

[0111]

實施例 7：抑制 BoNT 水解酶

(1) 篩選 BH 之肽抑制劑：缺乏一或多個鹼性殘基之根據 SEQ ID NO:4 至 25 之肽將被合成。各肽將被添加至根據活性測試之混合物。能減少經處理之 scBoNT/A 之量、延長完全處理 scBoNT/A 所需之時間或阻斷處理 scBoNT/A 之肽被認為是 nBH 之抑制劑。

(2) 篩選抗體基底抑制劑：針對源自 nBH 之表位產製之抗體如實施例 5 之 IgY 係與 nBH 一起培養，接著進行活性測試。能減少經處理之 scBoNT/A 之量、延長完全處理 scBoNT/A 所需之時間或阻斷處理 scBoNT/A 之抗體被認為是 nBH 之抑制劑。

[0112]

實施例 8：使用經純化之活性 BoNT 水解酶 (nBH) 獲得經蛋白分解處理之多肽

(1) 200 μ g 之重組純化 scBoNT/A 係與 350 ng 之經純化之活性 BoNT 水解酶於 37°C 下培養 12 分鐘。要停止反應，藉由 SEC (管柱 Superdex 200 10/300 GL，緩衝液：50 mM NaP pH 7.5，150 mM NaCl，樣本體積 = 0.3 ml，流速 = 0.25 ml/分鐘) 移除 nBH，切割之量藉由 10% SDS-PAGE 分析 (圖 11A)。

(2) 包含 ~40% 經處理之 BoNT/A 之組分 1 (1800 μ l) 係與 350 ng 經純化之活性 BoNT 水解酶於 37°C 下培養 15 分鐘，並藉由超過濃縮至 300 μ l。最後要停止反

應，藉由 SEC（管柱 Superdex 200 10/300 GL，緩衝液：50 mM NaP pH 7.5，150 mM NaCl，樣本體積 = 0.3 ml，流速 = 0.25 ml/分鐘）移除 nBH，切割之量藉由 10% SDS-PAGE 分析（圖 11B）。

（2）包含 ~80% 經處理之 BoNT/A 之組分 1 及 2（1800 μ l）係經組合並與 120 ng 經純化之活性 BoNT 水解酶於 37°C 下培養 25 分鐘，並藉由超過濾濃縮至 300 μ l。最後要停止反應，藉由 SEC（管柱 Superdex 200 10/300 GL，緩衝液：50 mM NaP pH 7.5，150 mM NaCl，樣本體積 = 0.3 ml，流速 = 0.25 ml/分鐘）移除 nBH，切割之量藉由 10% SDS-PAGE 分析（圖 11C）。獲得 >95% 經處理之 BoNT/A（Seq ID NO.3）。若該第二肽在 37°C 下於一步驟中處理 50 分鐘（200 μ g scBoNT/A 與 350 ng nBH 培養），則獲得相同的經完全處理之第二多肽（>95% 經處理之 BoNT/A）。在 37°C 下培養 1 小時後，超過 97% 之 BoNT/A 係經處理。

[0113]

實施例 9：藉由 Lys-C 活化肉毒神經毒素（BoNT）

溶解於緩衝液（50mM Tris/HCl pH 8.0，125mM NaCl）中之單鏈重組 BoNT/A1（0.5mg/ml）係藉由 Lys-C（1:500 至 1:2500 酶：底物比）於 37°C 或 4°C 下蛋白分解活化 2 至 20 小時，之後該反應藉由 0.4 μ M 4-（2-胺基乙基）苯磺醯基）氟鹽酸鹽（AEBSF）（專一性絲胺酸蛋白酶抑制劑）抑制。圖 12A 顯示 BoNT/A1 藉由 Lys-C 活化

以產生成熟雙鏈形式，其中重鏈係藉由單一雙硫鍵與輕鏈連接。圖 12B 顯示 BoNT/A1 具有 90% 之純度，使用 Lys-C 達到 97% 活化。

[0114]

實施例 10：比較 Lys-C 蛋白酶與胰蛋白酶活化之肉毒神經毒素 (BoNT)

溶解於緩衝液 (25 至 50mM Tris/HCl pH 8.0, 125mM NaCl) 中之單鏈重組 BoNT/A1 (0.2-0.5mg/ml) 係藉由胰蛋白酶 (1:50 至 1:500 酶：底物比) 或藉由 Lys-C (1:500 至 1:2500 酶：底物比) 於 37°C 或 4°C 下蛋白分解活化 2 至 20 小時，之後該反應藉由莫耳過量之大豆胰蛋白酶抑制劑 (胰蛋白酶活化) 或 0.4 μ M 之專一性絲胺酸蛋白酶抑制劑 4-(2-胺基乙基) 苯磺醯基) 氟鹽酸鹽 (AEBSF) (Lys-C 活化) 抑制。

圖 13A 顯示 BoNT/A1 藉由胰蛋白酶活化。結構域間區域經切割，產生雙鏈形式。重鏈內之至少一個額外位點經切割，產生重鏈截短之雙鏈形式。重鏈有清楚的運動位移，因為被截短。

圖 13B 顯示 BoNT/A1 藉由 Lys-C 或胰蛋白酶活化。二種蛋白酶皆切割結構域間區域，產生雙鏈形式。不像 Lys-C 的是，胰蛋白酶還切割重鏈內之至少一個額外位點，產生截短重鏈。經 Lys-C 及胰蛋白酶切割之 BoNT/A 的重鏈之間的移動差異反映胰蛋白酶的此截短作用。

[0115]

實施例 11：經 Lys-C 蛋白酶處理後之肉毒神經毒素 (BoNT) 切割產物的質譜分析

為了證實 Lys-C 切割之產物對應預期之 BoNT/A1 成熟雙鏈形式，使用質譜分析以測定各結構域之質量。簡言之，單鏈 BoNT/A1 (0.5 mg/ml) 係於 4℃ 下經 Lys-C (0.4 µg/ml) 活化 20 小時。該反應藉由添加蛋白酶抑制劑亮抑酶肽 (leupeptin) 停止，樣本經濃縮至 1.3 mg/ml。樣本藉由電噴灑離子化質譜法 (ESI-MS) 分析。二個主要尖峰在質譜圖上被發現。這些尖峰具有預期質量 50055 (預期 50050 Da) 及 98173 (預期 98152 Da)。這些資料證實使用 Lys-C 切割單鏈 BoNT/A1 產製全長 LC 及 HC。參考圖 14，單鏈 BoNT/A1 具有如圖所示之一級胺基酸序列。Lys-C 之蛋白分解活化切割輕鏈與重鏈區域之間的至少二個肽鍵；此產生成熟雙鏈形式。胺基酸 TKSLDKGYNK (在該圖以粗體、較大字型且畫底線表示) 自該成熟形式被切除。

[0116]

實施例 12：經 Lys-C 蛋白酶處理後之肉毒神經毒素 (BoNT) 切割產物的 N 端序列分析

為了補足實施例 11 報告之質譜資料，LC 及 HC 之樣本係藉由 N 端定序分析。簡言之，經 Lys-C 處理之 BoNT/A1 樣本進行 SDS-PAGE 處理。自膠體切除蛋白帶，經處理以進行 Edman N 端蛋白定序。LC 之 N 端序列為 PFVNK。HC 之 N 端序列為 ALNDL。這些資料顯示使

用 Lys-C 切割單鏈 BoNT/A1 產製包含完整 N 端之全長 LC 及 HC。

[0117]

實施例 13：分析經 Lys-C 蛋白酶處理後之肉毒神經毒素 (BoNT) 之功能性，與經胰蛋白酶切割之 BoNT 比較

藉由 Lys-C 蛋白分解活化之 BoNT/A1 產生相較於天然 BoNT/A1 具完整活性之成熟雙鏈形式。相對地，藉由胰蛋白酶活化產製之截短形式之 BoNT/A1 顯示減少活性。被胰蛋白酶移除之 BoNT/A 重鏈之 C 端對應該蛋白之細胞結合功能性結構域。此結構域包含授予 BoNT/A 專一性、高親和性神經元結合性之蛋白及神經節苷酯結合位點。

在這些實驗中，天然 BoNT/A 比較材料係得自 List Laboratories Inc.。天然 BoNT/A 係於純化前在生長中之芽胞梭菌培養內經蛋白分解活化。因此，和重組 BoNT/A1 不同的是，經純化之天然 BoNT/A1 不需要進一步蛋白分解活化步驟。

參考圖 15A，單鏈重組 BoNT/A1 係經 Lys-C 蛋白分解活化，接著進一步純化（藉由苯基瓊脂糖管柱層析）以分離成熟雙鏈 BoNT/A1 與 Lys-C。多種濃度之此經純化、經活化之 BoNT/A1 被添加至生長中之大鼠胚胎脊椎神經元 (eSCN) 原代培養，培養 24 小時。接著收集該經處理之 eSCN，進行西方墨點分析以測量 BoNT/A1 對 25kDa 細胞內突觸相關蛋白 (SNAP25) 之切割。相同實驗也利用

天然 BoNT/A1 進行。比較經重組 Lys-C 活化之 BoNT/A1 及天然 BoNT/A1 切割細胞內 SNAP25 之相對效價。重組 Lys-C 活化之 BoNT/A1 以 11.94 ± 0.10 之 pEC50 (1.2pM) 切割 SNAP25。天然 BoNT/A1 以 12.09 ± 0.03 之 pEC50 (0.49pM) 切割 SNAP25。因此重組 Lys-C 活化之 BoNT/A1 與天然 BoNT/A1 具有類似高效價。

相較於 Lys-C 活化之 BoNT/A1，藉由胰蛋白酶活化之重組 BoNT/A1 顯示降低活性。參照圖 15B，單鏈重組 BoNT/A1 係藉由胰蛋白酶蛋白分解活化，接著（藉由苯基瓊脂糖管柱層析）進一步純化以分離成熟雙鏈 BoNT/A1 與胰蛋白酶。此經純化、經活化之 BoNT/A1 以和 Lys-C 活化材料相同之方式測試切割細胞內 eSCN SNAP25 之效價（相較於天然 BoNT/A1）。重組、胰蛋白酶活化之 BoNT/A1 以 10.23 ± 0.19 之 pEC50 (59.3pM) 切割 SNAP25。天然 BoNT/A1 以 11.56 ± 0.08 之 pEC50 (2.8pM) 切割 SNAP25。因此重組、胰蛋白酶活化之 BoNT/A1 之效價相較於天然 BoNT/A1 及重組、Lys-C 活化之 BoNT/A1 皆減少。

[0118]

實施例 14：胰蛋白酶切割除 A1 亞型以外之其他肉毒神經毒素 A 亞型的活化區域以外

溶解於緩衝液（25mM Tris/HCl pH 8.0，125mM NaCl）中之單鏈重組 BoNT/A5 (0.5mg/ml) 係藉由胰蛋白酶（1:50 至 1:200 酶：底物比）於 37°C 下蛋白分解活化 5

至 30 分鐘，之後該反應藉由莫耳過量之大豆胰蛋白酶抑制劑抑制。

參考圖 16A，BoNT/A5 的結構域間區域被切割，產製其中重鏈藉由單一雙硫鍵與輕鏈連接之雙鏈形式。胰蛋白酶還切割重鏈內之至少一個額外位點，產生截短重鏈。重鏈有清楚的運動位移，因為被截短。

參考圖 16B，BoNT/A1 之 C 端的胰蛋白酶切割位點之一級序列保留於其他 BoNT/A 亞型。

[0119]

實施例 15：以 Lys-C 蛋白酶處理肉毒神經毒素除了 A1 亞型以外之 A2 亞型

溶解於緩衝液（25mM Tris/HCl pH 8.0，125mM NaCl）中之單鏈重組 BoNT/A2（0.3mg/ml）係藉由 Lys-C（1:750 酶：底物比）於 37°C 下蛋白分解活化 2 小時，之後該反應藉由 0.4 μ M 之專一性絲胺酸蛋白酶抑制劑 4-（2-胺基乙基）苯磺醯基）氟鹽酸鹽（AEBSF）（Lys-C 活化）抑制。圖 17 顯示 BoNT/A2 藉由 Lys-C 活化以產生成熟雙鏈形式，其中重鏈係藉由單一雙硫鍵與輕鏈連接。

[0120]

實施例 16：經 Lys-C 蛋白酶處理後之肉毒神經毒素 A2 切割產物的 N 端序列分析

為了進一步分析實施例 15 報告之經 Lys-C 處理之 BoNT/A2，LC 及 HC 之樣本係藉由 N 端定序分析。簡言之，經 Lys-C 處理之 BoNT/A2 樣本進行 SDS-PAGE 處

理。自膠體切除蛋白帶，經處理以進行 Edman N 端蛋白定序。LC 之 N 端序列為 PFVNK。HC 之 N 端序列為 ALNDL。這些資料顯示使用 Lys-C 切割單鏈 BoNT/A2 產製包含完整 N 端之全長 LC 及 HC。

[0121]

實施例 17：以 Lys-C 蛋白酶處理肉毒神經毒素除了 A1 亞型以外之 A6 亞型

溶解於緩衝液（50mM Tris/HCl pH 8.0，125mM NaCl）中之單鏈重組 BoNT/A6（0.5mg/ml）係藉由 Lys-C（0.4 μ g/ml）於 4°C 下蛋白分解活化 20 小時，接著進一步純化（苯基瓊脂糖管柱層析）以分離成熟雙鏈 BoNT/A6 與 Lys-C。圖 18 顯示經 Lys-C 活化之 BoNT/A6 產生成熟雙鏈形式。

[0122]

實施例 18：經 Lys-C 蛋白酶處理後之肉毒神經毒素 A6 切割產物的 N 端序列分析

為了進一步分析實施例 17 報告之經 Lys-C 處理之 BoNT/A6，經處理之 BoNT/A6 的 LC 及 HC 樣本係藉由 N 端定序分析。簡言之，樣本進行 SDS-PAGE 處理。自膠體切除蛋白帶，經處理以進行 Edman N 端蛋白定序。LC 之 N 端序列為 PFVNK。HC 之 N 端序列為 ALNDL。這些資料顯示使用 Lys-C 切割單鏈 BoNT/A6 產製包含完整 N 端之全長 LC 及 HC。

[0123]

實施例 19：經 Lys-C 蛋白酶處理後之肉毒神經毒素 A6 切割產物的質譜分析

為了補足實施例 18 報告之 N 端定序資料，且為了證實 Lys-C 切割之產物對應預期之 BoNT/A6 成熟雙鏈形式，使用質譜分析以測定各結構域之質量。簡言之，單鏈 BoNT/A6 (0.5 mg/ml) 係於 4°C 下經 Lys-C (0.4 µg/ml) 活化 20 小時。該反應藉由添加蛋白酶抑制劑亮抑酶肽 (leupeptin) 停止，樣本經濃縮至 1.3 mg/ml。樣本藉由電噴灑離子化質譜法 (ESI-MS) 分析。二個主要尖峰在質譜圖上被發現。這些尖峰具有預期質量 50233 (預期 50151 Da) 及 98162 (預期 98080 Da)。這些資料顯示使用 Lys-C 切割單鏈 BoNT/A6 產製全長 LC 及 HC。

[0124] 序列表說明如下：

SEQ ID NO:1：衍生自肉毒芽胞梭菌株 ATCC 3502 之具蛋白分解活性之多肽，GenBank 寄存編號 CAL82988.1，缺乏 248 個 N 端胺基酸殘基

SEQ ID NO:2：衍生自肉毒芽胞梭菌株 ATCC 3502 之不具蛋白分解活性之多肽，GenBank 寄存編號 CAL82988.1

SEQ ID NO:3：ATCC 3502 之 BoNT/A，Genbank 編號 AAA23262

SEQ ID NO:4：BoNT/A1 之圈環

SEQ ID NO:5：BoNT/A2/A6 之圈環

SEQ ID NO:6：BoNT/A3 之圈環

SEQ ID NO:7 : BoNT/A3 之圈環
SEQ ID NO:8 : BoNT/A4 之圈環
SEQ ID NO:9 : BoNT/A5 之圈環
SEQ ID NO:10 : BoNT/A7 之圈環
SEQ ID NO:11 : BoNT/B1/B4bv/B6 之圈環
SEQ ID NO:12 : BoNT/B2/B3 之圈環
SEQ ID NO:13 : BoNT/B5np 之圈環
SEQ ID NO:14 : BoNT/C/CD 之圈環
SEQ ID NO:15 : BoNT/D 之圈環
SEQ ID NO:16 : BoNT/DC 之圈環
SEQ ID NO:17 : BoNT/E1 至 E5 之圈環
SEQ ID NO:18 : BoNT/E6 之圈環
SEQ ID NO:19 : BoNT/F1/F6 之圈環
SEQ ID NO:20 : BoNT/F2/F3 之圈環
SEQ ID NO:21 : BoNT/F4 之圈環
SEQ ID NO:22 : BoNT/F5 之圈環
SEQ ID NO:23 : BoNT/F7 之圈環
SEQ ID NO:24 : BoNT/G 之圈環
SEQ ID NO:25 : TeNT 之圈環
SEQ ID NO:26 : 編碼 SEQ ID NO:1 之核酸序列
SEQ ID NO:27 : 編碼 SEQ ID NO:2 之核酸序列

序列表

<110> 美商益普生生物創新公司(Ipsen Bioinnovation Limited)

<120> 製造經蛋白分解處理之多肽之方法

<140>

<141> 2013-11-21

<150> PCT/EP2012/073283

<151> 2012-11-21

<160> 27

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 333

<212> PRT

<213> 肉毒芽胞梭菌

<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> 肉毒芽胞梭菌

<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 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> 肉毒芽胞梭菌

<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 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
 705 710 715 720

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
785 790 795 800

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
865 870 875 880

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 1025	Asn Ser Lys Ile Tyr 1030	Ile Asn Gly Arg Leu 1035
Lys Pro 1040	Ile Ser Asn Leu Gly 1045	Asn Ile His Ala Ser 1050
Met Phe 1055	Lys Leu Asp Gly Cys 1060	Arg Asp Thr His Arg 1065
Ile Lys 1070	Tyr Phe Asn Leu Phe 1075	Asp Lys Glu Leu Asn 1080
Ile Lys 1085	Asp Leu Tyr Asp Asn 1090	Gln Ser Asn Ser Gly 1095
Asp Phe 1100	Trp Gly Asp Tyr Leu 1105	Gln Tyr Asp Lys Pro 1110
Leu Asn 1115	Leu Tyr Asp Pro Asn 1120	Lys Tyr Val Asp Val 1125
Gly Ile 1130	Arg Gly Tyr Met Tyr 1135	Leu Lys Gly Pro Arg 1140
Met Thr 1145	Thr Asn Ile Tyr Leu 1150	Asn Ser Ser Leu Tyr 1155
Lys Phe 1160	Ile Ile Lys Lys Tyr 1165	Ala Ser Gly Asn Lys 1170
Val Arg 1175	Asn Asn Asp Arg Val 1180	Tyr Ile Asn Val Val 1185
Lys Glu 1190	Tyr Arg Leu Ala Thr 1195	Asn Ala Ser Gln Ala 1200
Lys Ile 1205	Leu Ser Ala Leu Glu 1210	Ile Pro Asp Val Gly 1215
Gln Val 1220	Val Val Met Lys Ser 1225	Lys Asn Asp Gln Gly 1230
Lys Cys 1235	Lys Met Asn Leu Gln 1240	Asp Asn Asn Gly Asn 1245
Phe Ile 1250	Gly Phe His Gln Phe 1255	Asn Asn Ile Ala Lys 1260
Ser Asn 1265	Trp Tyr Asn Arg Gln 1270	Ile Glu Arg Ser Ser 1275
Gly Cys 1280	Ser Trp Glu Phe Ile 1285	Pro Val Asp Asp Gly 1290
		Trp Gly Glu

Arg Pro Leu
1295

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/A1 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/A2/A6 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/A3 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/A3 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/A4 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/A5 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/A7 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/B1/B4bv/B6 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/B2/B3 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/B5np 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/C/CD 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/D 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/DC 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/E1-E5 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/E6 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/F1/F6 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/F2/F3 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/F4 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/F5 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>
<221> BoNT/F7 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<220>

<221> BoNT/G 圈環
<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> 破傷風芽胞梭菌(Clostridium Tetani)

<220>
<221> TeNT 圈環
<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> 肉毒芽胞梭菌

<400> 26
atggttcaag gtcaaagcgt taaaggagta ggaaaaacta gcttggatgg actagtaaat 60
attgatgtaa cttatggaaa tggaaaatac tatttaaaag atagcaacaa aaatatttat 120
ctatatgact taaaaaatca agttgatgaa tatgatctat acaattatct tagtagacct 180
aactataaac aaatattaat gagcaaatct gaattaatat ctaattacaa taataatttt 240
atagccaaqa atcagggttaa ttctgtagat gcttatgtaa acacaaataa aacctatgat 300
tattataaaa acaaattaaa tagaaacagt attgataata agggatgtaa tattaatggg 360
tttgttcatg taggtagaaa ttatggtaat gctttttggt acggtccata tgatgggatg 420
ttctttggcg atggcgacgg aatatacttc tcttcccttg caaaatcttt agatgttgta 480
ggccacgaat taagtcatgg tgtaacaaat aaagagtcta atcttaataa tgaaaatgaa 540
tctggtgccc taaatgaatc ttctcagat attatgggag tagctgttga gggtaaaaac 600
ttgtactag gtgaagattg ctgggttgct ggaggagtaa tgagagatat ggaaaatcca 660
tccagaggag gcccaaccagc tcatatgaaa gattataaat acaaaactat gaatgacgat 720
aacgggtggtg ttcatacaaa ttcaggtata ataaacatg ctgcttattt agttgcagat 780
ggaatagaaa aaactgggtgc aaaaaatagt aaagatatata tgggaaaaat attctataca 840
gctaattgct ataaatggga tgaaacaaca aattttgcta agtcagagaa tgatgtagtc 900
caagttacta aagaacttta tggcgaaaat agcaactatg taaaaattgt tgaaaaagct 960
tttgaccaag ttggaataac tgctacacct caattacat tataa 1005

<210> 27
<211> 1746
<212> DNA
<213> 肉毒芽胞梭菌

```

<400> 27
atgaaaagta aaaaattatt agctacagtg ctaagtgccg tgatcacttt ttctactgtt      60
tctgcagttt atgctgcgcc ttagggaaaa gaaagtaaag ttgaaccaa aactacaaca      120
ataacttggg aaaaaatga acaaaatact aaaaaagctg ctactgatat aactgaaaag      180
aaatttaaca attctgagga gataactaaa ttctttgaaa aaaatatatc taaatttgg      240
gtacaaaaag gttctcttaa aaacaccaag actgtaaaag acgaaaaagg taaaactaac      300
tatcatatga tttatgaagt agaaggata cctgtatact atggaagaat tgtttttaca      360
actgaaaaag actcctccat ggattctata aacggtagaa ttgatactgt ttttgaaaat      420
gggaattgga aaaacaaaat caaactatca aaagaagatg ctatagcaaa agctaaaaat      480
gatattaaag atgaaaaagc aactagttaa aagaccgatt tatactctgta taattttgag      540
ggcaaaccct atgtagttta tttagtagat ctaattacag acaacgggag ttggacgggt      600
ttcgttaatg ctgaggatgg ttctatagta aataaattta ataatactcc tactttaatt      660
gatactaaag atcaaaaatt acccaatgct aaaaaaatta aagatgaagc taaaaagct      720
agtaatgcaa ataatgtaat tgatgttcaa ggtaaaagcg ttaaaggagt aggaaaaact      780
agcttgatg gactagttaa tattgatgta acttatggaa atggaaaata ctatttaaaa      840
gatagcaaca aaaatattta tctatatgac ttaaaaaatc aagttgatga atatgatcta      900
tacaattatc ttagtagacc taactataaa caaatattaa tgagcaaatc tgaattaata      960
tctaattaca ataataattt tatagccaac aatcaggtta attctgtaga tgcttatgta     1020
aacacaaata aaacctatga ttattataaa aacaaattaa atagaaacag tattgataat     1080
aagggtatga atattaatgg gtttgttcat gtaggtagaa attatggtaa tgctttttgg     1140
tacggtccat atgatgggat gttctttggc gatggcgacg gaatatactt ctcttccctt     1200
gcaaaatctt tagatgttgt aggccacgaa ttaagtcatg gtgtaacaaa taaagagtct     1260
aatcttaaat atgaaaatga atctgggtgcc ctaaataaat ctttctcaga tattatggga     1320
gtagctgttg agggtaaaaa ctttgtacta ggtgaagatt gctgggttgc tggaggagta     1380
atgagagata tggaaaatcc atccagagga ggccaaccag ctcatatgaa agattataaa     1440
tacaaaacta tgaatgacga taacggtggt gtccatacaa attcaggtat aataaaccat     1500
gctgcttatt tagttgcaga tggaatagaa aaaactgggtg caaaaaatag taaagatatt     1560
atgggaaaaa tattctatag agctaattgc tataaatggg atgaaacaac aaattttgct     1620
aagtgcagaa atgatgtagt ccaagttact aaagaacttt atggcgaaaa tagcaactat     1680
gtaaaaatig ttgaaaaagc ttttgaccaa gttggaataa ctgctacacc tcaattacca     1740
ttataa

```

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

製造經蛋白分解處理之多肽之方法

METHODS FOR THE MANUFACTURE OF PROTEOLYTICALLY
PROCESSED POLYPEPTIDES

【中文】

本發明關於具蛋白分解活性之多肽及彼之多種用途。

【英文】

The present invention relates to proteolytically active polypeptides and various uses thereof.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：
無

申請專利範圍

1. 一種 Lys-C 藉由水解於蛋白分解處理單鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)以產生雙鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)之用途。

2. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該單鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)係天然存在之神經毒素、重組神經毒素或經改質之神經毒素，諸如缺乏天然 H_c 結構域或彼之部分之神經毒素或以其他胺基酸殘基取代該神經毒素 H_c 結構域之衍生物。

3. 如申請專利範圍第 2 項之用途，其中該單鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)包含與選自 SEQ ID NO:11 至 13 之任一者之多肽序列具有至少 50% 序列一致性之胺基酸序列；

較佳地其中該 Lys-C 水解該單鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)於位置緊鄰 SEQ ID NO:11 至 13 之任一者之該序列內之鹼性胺基酸殘基的 C 端。

4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之用途，其中該雙鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)之 L 鏈的 C 端及 H 鏈的 N 端係與自野生型梭菌分離之該對應雙鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)一致。

5. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之用途，其中該雙鏈梭菌神經毒素血清型 B (BoNT/B)當與自野生型梭菌之該相同的單鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)多肽所產製之該對應雙鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)

多肽比較時，具有一致的胺基酸序列。

6. 一種製造經蛋白分解處理之多肽之方法，其包含使下述(a)與(b)接觸之步驟：

(a)第一多肽，該第一多肽係 Lys-C；

(b)第二多肽，該第二多肽係易被該第一多肽蛋白分解；

其中該接觸導致蛋白分解處理該第二多肽成為至少二個切割產物；

其中該第二多肽係單鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)且其中該第一多肽水解該單鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)以產生雙鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)。

7. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該單鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)係天然存在之神經毒素、重組神經毒素或經改質之神經毒素，諸如缺乏天然 H_c 結構域或彼之部分之神經毒素或以其他胺基酸殘基取代該神經毒素 H_c 結構域之衍生物。

8. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該第二多肽包含與選自 SEQ ID NO:11 至 13 之任一者之多肽序列具有至少 50% 序列一致性之胺基酸序列；

較佳地其中該第一多肽蛋白分解切割該第二多肽於位置緊鄰 SEQ ID NO:11 至 13 之任一者之該序列內之鹼性胺基酸殘基的 C 端。

9. 如申請專利範圍第 6 至 8 項中任一項之方法，其

中該雙鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)之 L 鏈的 C 端及 H 鏈的 N 端係與自野生型梭菌分離之該對應雙鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)一致。

10. 如申請專利範圍第 6 至 8 項中任一項之方法，其中該雙鏈梭菌神經毒素血清型 B (BoNT/B)當與自野生型梭菌之該相同的單鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)多肽所產製之該對應雙鏈肉毒神經毒素血清型 B (BoNT/B)多肽比較時，具有一致的胺基酸序列。

11. 如申請專利範圍第 6 至 8 項中任一項之方法，其中該接觸發生於細胞內、細胞溶解物中、經純化之細胞溶解物中或個體體內。

12. 一種如申請專利範圍第 6 至 11 項中任一項之方法之用途，其係用於評估產品品質或產製藥品。

13. 一種組成物，其包含藉由如申請專利範圍第 6 至 11 項中任一項之方法所獲得之經處理多肽及醫藥上可接受之載劑。

14. 如申請專利範圍第 13 項之組成物，其中該組成物包含經處理與未經處理之第二多肽之混合物，該混合物包含低於 5% 之未經處理之第二多肽。

15. 如申請專利範圍第 13 項之組成物，其中該組成物係調製為固體、液體或氣霧(或氣體)形式。

16. 如申請專利範圍第 13 至 15 項中任一項之組成物，其中該組成物係藥品或美容組成物。

17. 如申請專利範圍第 13 至 15 項中任一項之組成

物，其係用於治療選自下列之疾病或病狀：隨意肌強度、局部肌張力障礙(包括頭、頸肌張力障礙及良性自發性眼瞼痙攣、半邊顏面痙攣及局部痙攣)、胃腸疾患、多汗症及美容除皺，在其他態樣亦包含眼瞼痙攣、口下頷肌張力障礙、張口型、閉口型、磨牙、梅傑氏(Meige)症候群、舌肌肌張力障礙、眼瞼肌肉運動失調、張口型頸肌張力障礙、頸項前屈、頸項後屈、頸項側屈、斜頸、咽部肌張力障礙、喉部肌張力障礙、痙攣性發聲障礙／內收肌型、痙攣性發聲障礙／外展肌型、痙攣性呼吸困難、四肢肌張力障礙、手臂肌張力障礙、特定任務性肌張力障礙、書寫痙攣、音樂家指痙攣、高爾夫手痙攣、腿部肌張力障礙、大腿內收、大腿外展膝關節彎曲、膝關節伸直、踝關節彎曲、踝關節伸直、馬蹄內翻足、畸形足肌張力障礙、紋狀趾、腳趾彎曲、腳趾伸直、中軸肌張力障礙、比薩症候群、肚皮舞者肌張力障礙、節段性肌張力障礙、半身性肌張力障礙、全身性肌張力障礙、lubag 症候群中之肌張力障礙、皮質基底核退化中之肌張力障礙、lubag 症候群中之肌張力障礙、遲發性肌張力障礙、脊髓小腦性失調症中之肌張力障礙、帕金森氏症中之肌張力障礙、亨汀頓氏舞蹈症中之肌張力障礙、髓素異常表象(Hallervorden Spatz disease)中之肌張力障礙、多巴誘發之運動困難／多巴誘發之肌張力障礙、遲發性運動困難／遲發性肌張力障礙、陣發性運動困難／肌張力障礙、運動性非運動性動作誘發之上顎肌陣攣、肌陣攣肌纖維顫動、僵硬、良性肌肉痙

攣、遺傳性下巴顫抖、矛盾性下巴肌活動、半側咀嚼肌痙攣、肥厚性鰓肌病、嚼肌肥厚、脛骨前肌肥厚、眼球震顫、震動幻視核上性凝視麻痺、癲癇、持續性不全癲癇 (partialis continua)、計畫痙攣性斜頸手術、外展肌聲帶麻痺、反抗性突變煩躁不安、上食道括約肌功能不全、聲帶肉芽腫、口吃性妥瑞氏症、中耳肌陣攣、保護性喉閉合、喉切除術術後、語言障礙、保護性垂瞼、眼瞼內翻、奧迪氏 (Odi) 括約肌功能異常、假性食道弛緩不能、非弛緩不能性食道運動障礙、陰道痙攣、術後制動震顫、膀胱功能失常、膀胱尿道括約肌失常、膀胱括約肌痙攣、半側臉痙攣、神經再生性運動困難、魚尾紋之美容使用、皺眉臉不對稱、頰肌皺縮、僵硬人症候群、破傷風性前列腺增生 (tetanus prostate hyperplasia)、過胖、治療幼兒腦性麻痺斜視、混合麻痺性共同性斜視、在視網膜剝離手術之後、在白內障手術之後、在無晶體眼中肌炎性斜視、肌病性斜視、分離性垂直眼偏斜、作為斜視手術之輔助治療、內斜視、外斜視、弛緩不能、肛門裂、外分泌腺活性過高、Frey 氏症候群、假哭性症候群、多汗症、腋窩掌足鼻漏、中風中之相對流涎過多、帕金森氏症中之相對流涎過多、肌萎縮性側索硬化痙攣症狀中之相對流涎過多、腦炎及脊髓炎自體免疫疾病中之相對流涎過多、多發性硬化症、橫貫性脊髓炎、戴維克氏 (Devic) 症候群、病毒感染、細菌感染、寄生蟲感染、真菌感染、在遺傳性痙攣性截癱中風後症候群腦半球梗塞中、腦幹梗塞、脊椎梗塞、偏頭痛、中

樞神經系統外傷、腦半球病灶、腦幹病灶、脊椎病灶、在中樞神經系統出血中、腦內出血、蜘蛛膜下腔出血、硬膜下出血、脊椎內出血、在癌中、腦半球性腫瘤、腦幹腫瘤、脊椎腫瘤、打鼾。

scBoNTAS wt	KLLCVRGIITS <u>K</u> TKSLDKGYNKALNDLCIKV
scBoNTAS Throm	KLLCVRGIITS.T.SLV <u>P</u> RG.S.ALNDLCIKV
scBoNTAS Res	KLLC <u>V</u> .GIITS.T.SLVP.GS.ALNDLCIKV
scBoNTAS (GGSG) ₂	KLLCGGSG.....GSGGC <u>I</u> KV
scBoNTAS CGS-C	KLL.G.....S.IKV
scBoNTAS FQWYI	KLLCFQW.....YICIKV

圖 7A

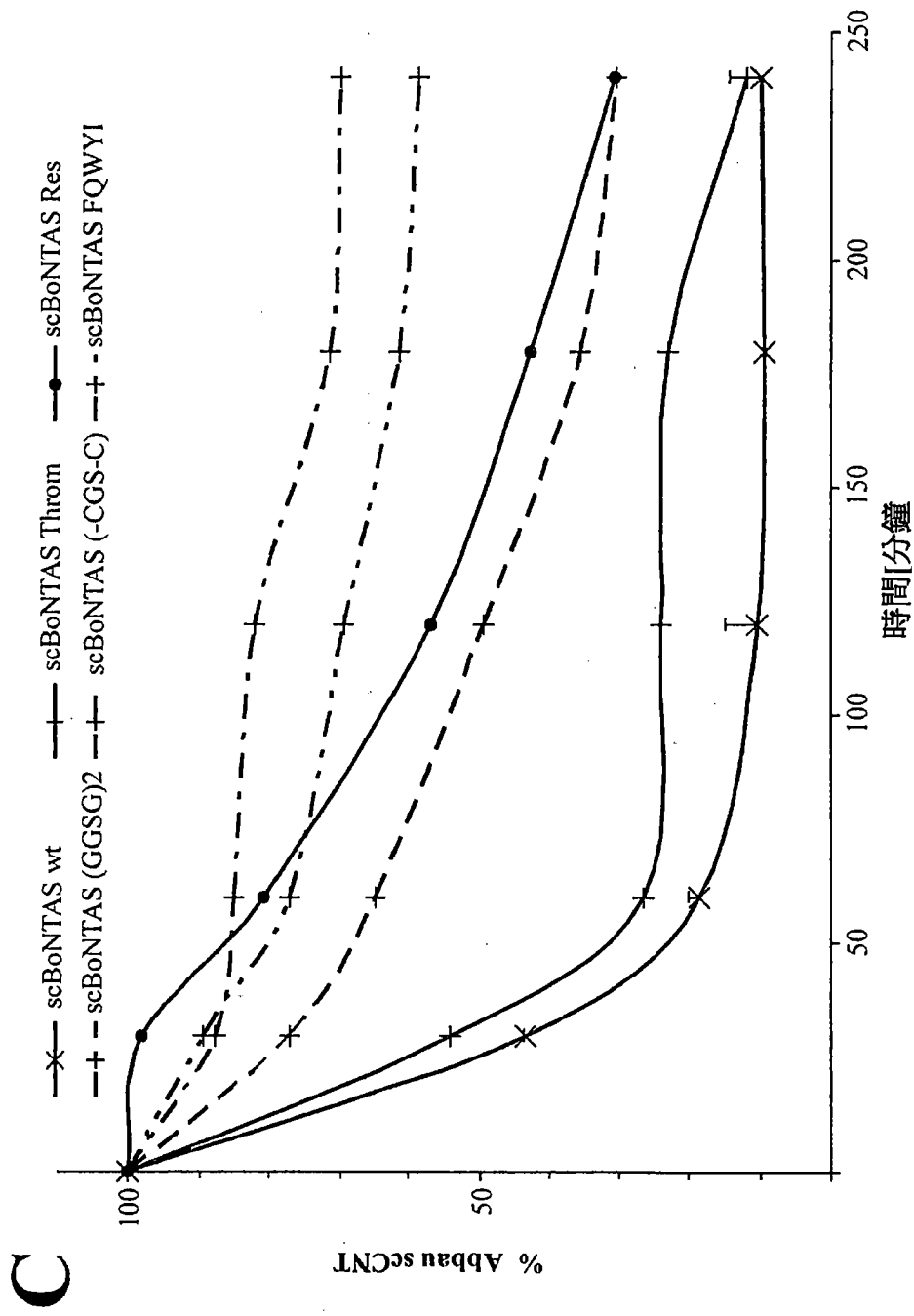


圖 7C

PFVVKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMQPVKAFKIHNKIWVIPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYDYDSTYLSTDNEKD
NYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSGYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNL
TRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNP LLGAGKFATDPAVTLAHQLIYAGHRLYGIAPNPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFE
ELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTASLQYMKNVFKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIY
TEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDAVKINIVPKVNYTIYDGFNLNNTNLAANFNGQNTNINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIIT
SK **TKSLDKGYNK**ALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIEN
LSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFHGSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVKNKATEAAMFLG
WVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTID
NALSKRNEKWDEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAM
ININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTFTE
YIKNIINTSILNRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVNFDPIDKNQQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWIRIPKYFNSISLNN
EYTIINC MENNSGWKVS LNYGEI IWTLQDTQEIKQRVVF KYSQMINISDYINRWIFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNI
HASNNIMFKLDGCRDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQNSGILKDFWGDYLYQYDKPYMMLNLYDPNKYVDVNNVGIR
GYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRGTKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVVKNEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNL
SQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFNNAIKLVASNWYNRQIERSRSLGCSWEFIPVDDGWGERPL

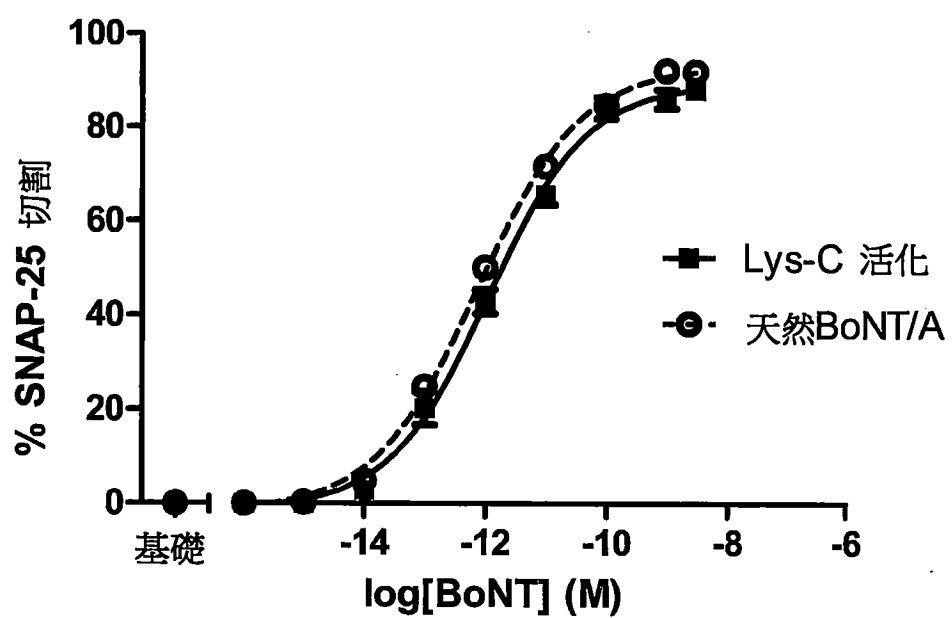


圖 15A

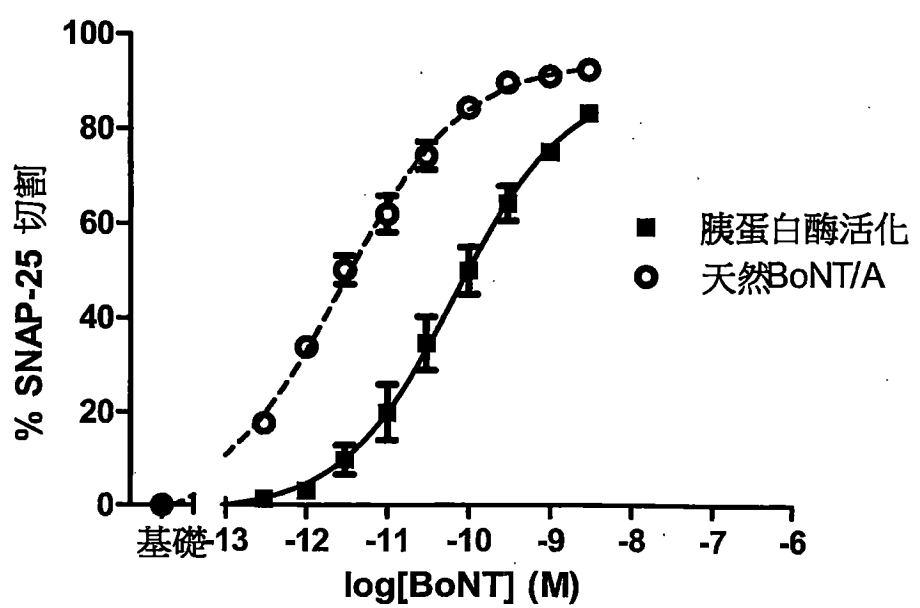


圖 15B

