



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0084098
(43) 공개일자 2017년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6803 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7013483
(22) 출원일자(국제) 2015년11월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년05월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/077245
(87) 국제공개번호 WO 2016/079310
국제공개일자 2016년05월26일
(30) 우선권주장
14194265.6 2014년11월21일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
메르츠 파마 게엠베하 운트 코. 카가아
독일연방공화국 60318 프랑크푸르트 암 마인 에켄
하이머 란트스트라세 100
(72) 발명자
아이젤레 칼-하인츠
독일 60385 프랑크푸르트 암 마인 팔라멘츠플라츠
2베
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성의 측정 방법**

(57) 요약

본 발명은 신경독소의 생물학적 활성의 측정 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 (a) (i) 앵커 단백질, (ii) 리포터 단백질 및 (iii) 앵커 단백질과 리포터 단백질을 중재하는 신경독소 절단 부위를 포함하는 융합 단백질을 신경독소 민감성 세포에서 발현시키는 단계; (b) 단계 (a)의 신경독소 민감성 세포를 신경독소와 항온처리하고, 당해 세포를 신경독소가 이의 생물학적 활성을 발휘하도록 하는 조건하에 배양하는 단계; (c) 단계 (b)의 신경독소 민감성 세포를, 투과된 신경독소 민감성 세포로부터 리포터 단백질의 방출은 가능하게 하지만 앵커 단백질의 방출은 가능하게 하지 않는 조건하에 투과시키는 단계; 및 (d) 세포로부터 방출된 리포터 단백질의 활성을 정량화하여 신경독소의 생물학적 활성을 측정하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명은 신경독소 민감성 세포에서 신경독소의 생물학적 활성을 측정하기 위한, (i) 앵커 단백질, (ii) 리포터 단백질 및 (iii) 앵커 단백질과 리포터 단백질을 중재하는 신경독소 절단 부위를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 융합 단백질을 포함하는 키트도 또한 본 발명에 추가로 포함된다. 최종적으로, 본 발명은 신경독소 민감성 세포에서 신경독소의 생물학적 활성을 측정하기 위한, 본 발명의 융합 단백질의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C07K 2319/50 (2013.01)

C07K 2319/60 (2013.01)

C07K 2319/61 (2013.01)

G01N 2333/33 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

신경독소의 생물학적 활성의 측정 방법으로서,

(a) (i) 앵커 단백질, (ii) 리포터 단백질 및 (iii) 상기 앵커 단백질과 상기 리포터 단백질을 중재하는 신경독소 절단 부위를 포함하는 융합 단백질을 신경독소 민감성 세포에서 발현시키는 단계;

(b) 단계 (a)의 상기 신경독소 민감성 세포를 신경독소와 향온처리하고, 상기 신경독소 민감성 세포를 상기 신경독소가 이의 생물학적 활성을 발휘하도록 하는 조건하에 배양하는 단계;

(c) 단계 (b)의 상기 신경독소 민감성 세포를, 투과된 신경독소 민감성 세포로부터 상기 리포터 단백질의 방출은 가능하게 하지만 상기 앵커 단백질의 방출은 가능하게 하지 않는 조건하에 투과시키는 단계; 및

(d) 단계 (c)의 상기 투과된 신경독소 민감성 세포로부터 방출된 상기 리포터 단백질의 활성을 정량화하여 상기 신경독소의 생물학적 활성을 측정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 신경독소 민감성 세포가 종양 세포주, 1차 세포(primary cell), 줄기 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유도되는, 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 앵커 단백질이 콜린 수용체, H1-수용체, G 단백질-커플링된 수용체(GPCR) 및 SV2로 이루어진 그룹으로부터 선택된 막 단백질인, 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경독소 절단 부위가 BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G 및 TeNT 절단 부위로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포터 단백질이 루시페라제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 및 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 또는 GFP, YFP, BFP 및 RFP로 이루어진 그룹으로부터 선택된 형광성 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된 효소인, 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 용혈소가 상기 신경독소 민감성 세포의 투과화용으로 사용되는, 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 용혈소가 스트렙토리신 0, 퍼프린고리신 0, 뉴몰리신, 세균성 용혈소, 및 뱀 또는 거미로부터의 기공 형성 독소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질이 콜린 수용체-GFP-SNAP-25-루시페라제, H1-수용체-SNAP-25-루시페라제 및 H1-수용체-SNAP-25-HRP로부터 선택된 융합 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포터 단백질의 상기 활성의 상기 정량화가 상기 리포터 단백질의 활성의 표준화를 포함하는, 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 리포터 단백질의 상기 활성의 상기 표준화가 상기 신경독소 민감성 세포 중 또는 상기 신경독소 민감성 세포에 잔류하는 비절단된 융합 단백질의 잔류성 리포터 단백질 활성 또는 상기 융합 단백질의 총 리포터 단백질 활성을 측정함으로써 수행되는, 방법.

청구항 11

신경독소 민감성 세포에서 신경독소의 생물학적 활성을 측정하기 위한, (i) 앵커 단백질, (ii) 리포터 단백질 및 (iii) 상기 앵커 단백질과 상기 리포터 단백질을 중재하는 신경독소 절단 부위로 이루어진 융합 단백질.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 앵커 단백질이 콜린 수용체, H1-수용체, G 단백질 커플링된 수용체(GPCR) 및 SV2로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 상기 리포터 단백질이 루시페라제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제 및 서양고추냉이 퍼옥시다제 또는 GFP, YFP, BFP 및 RFP로 이루어진 그룹으로부터 선택된 형광성 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된 효소이고; 상기 신경독소 절단 부위가 BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G 및 TeNT 절단 부위로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 융합 단백질.

청구항 13

청구항 11 또는 12에 있어서, 상기 융합 단백질이 콜린 수용체-GFP-SNAP-25-루시페라제, H1-수용체-SNAP-25-루시페라제 및 H1-수용체-SNAP-25-HRP로부터 선택된 융합 단백질을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 14

청구항 11 내지 13 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 키트.

청구항 15

신경독소 민감성 세포에서 신경독소의 생물학적 활성을 측정하기 위한, 청구항 11 내지 13 중 어느 한 항의 융합 단백질의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경독소의 생물학적 활성의 측정 방법으로서, 상기 방법이 (a)(i) 앵커 단백질, (ii) 리포터 단백질 및 (iii) 신경독소 민감성 세포에서 앵커 단백질과 리포터 단백질을 중재하는 신경독소 절단 부위를 포함하는 융합 단백질을 발현시키는 단계; (b) 단계 (a)의 신경독소 민감성 세포를 신경독소와 항온처리하고, 세포를 신경독소가 이의 생물학적 활성을 발휘하도록 하는 조건하에 배양하는 단계; (c) 단계 (b)의 신경독소 민감성 세포를 투과된 신경독소 민감성 세포로부터 리포터 단백질의 방출은 가능하게 하지만 앵커 단백질의 방출은 가능하게 하지 않는 조건하에 투과시키는 단계; 및 (d) 세포로부터 방출된 리포터 단백질의 활성을 정량화하여 신경독소의 생물학적 활성을 측정하는 단계를 포함하는, 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 신경독소 민감성 세포에서 신경독소의 생물학적 활성을 측정하기 위한, (i) 앵커 단백질, (ii) 리포터 단백질 및 (iii) 앵커 단백질과 리포터 단백질을 중재하는 신경독소 절단 부위를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 융합 단백질을 포함하는 키트도 또한 본 발명에 포함된다. 최종적으로, 본 발명은 신경독소 민감성 부위에서 신경독소의 생물학적 활성을 측정하기 위한, 본 발명의 융합 단백질의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 클로스트리듐 보툴리눔 및 클로스트리듐 테타니는 매우 강력한 신경독소, 즉, 각각 보툴리눔 독소(BoNT) 및 테타누스 독소(TeNT)를 생성한다. 이러한 클로스트리듐 신경독소(CNT)는 신경 세포에 특이적으로 결합하여 신경 전달물질 방출을 파괴한다. 각 독소는 불활성 미처리된 약 150kDa 단일쇄 단백질로서 합성된다. 번역 후 처리는 다이설파이드 브릿지의 형성, 및 세균 프로테아제(들)에 의한 제한된 단백질분해(니킹)를 포함한다. 활성 신경독소는 다이설파이드 결합에 의해 연결된 2개의 쇠, 약 50kDa의 N-말단 경쇄 및 약 100kDa의 중쇄로 이루어

진다. CNT는 구조적으로 및 기능적으로 3개의 도메인, 즉, 촉매성 경쇄, 전위 도메인(N-말단 절반)을 포함하는 중쇄 및 수용체 결합 도메인(C-말단 절반)으로 이루어진다(참조: 예를 들어, Krieglstein 1990, Eur. J. Biochem. 188, 39; Krieglstein 1991, Eur. J. Biochem. 202, 41; Krieglstein 1994, J. Protein Chem. 13, 49). 보툴리눔 신경독소는 150kDa의 신경독소 단백질 및 관련된 비-독성 단백질을 포함하는 분자 복합체로서 합성된다. 복합체 크기는 클로스트리듐 균주 및 300kDa 내지 500kDa 및 900kDa 범위에 걸친 상이한 신경독소 혈청형에 기초하여 상이하다. 이들 복합체 내의 비-독성 단백질은 신경독소를 안정화시키고 신경독소를 붕괴에 대항하여 보호한다(참조: Silberstein 2004, Pain Practice 4, S19 - S26).

[0003] 클로스트리듐 보툴리눔은 보툴리눔 신경독소(BoNT)의 A 내지 G로 명명된 7개의 항원적으로 상이한 혈청형을 분비한다. 모든 혈청형은 클로스트리듐 테타니에 의해 분비되는 관련된 테타누스 신경독소(TeNT)와 함께, SNARE 단백질을 절단하여 시냅스 세포외배출을 차단하는 Zn^{2+} -엔도프로테아제이다(참조: Couesnon, 2006, Microbiology, 152, 759). CNT는 보툴리누스 중독 및 테타누스에서 보이는 이완 근육 마비를 야기한다(참조: Fischer 2007, PNAS 104, 10447).

[0004] 그것의 독성 효과에도 불구하고, 보툴리눔 독소 복합체는 다수의 질환에서 치료제로서 사용되어 왔다. 보툴리눔 독소 혈청형 A는 인간 용도로 미국에서 1989 년도에 사시, 안검연축, 및 기타 장애의 치료에 관해 승인되었다. 그것은 보툴리눔 독소 A(BoNT/A) 단백질 제제로서, 예를 들어, 상품명 BOTOX(Allergan, Inc.) 하에 또는 상품명 DYSPORT/RELOXIN(Ipsen, Ltd) 하에 시판된다. 개선된, 복합체-비함유 보툴리눔 독소 A 제제가 상품명 XEOMIN(Merz Pharmaceuticals, LLC) 하에 시판된다. 치료적 적용을 위해, 상기 제제는 치료될 근육 내로 직접 주입된다. 생리적 pH에서, 독소는 단백질 복합체로부터 방출되고, 목적하는 약리학적 효과가 발생한다. 보툴리눔 독소의 효과는 단지 일시적이며, 이는 치료 효과를 유지하기 위해 보툴리눔 독소의 반복 투여가 요구되는 이유이다.

[0005] 클로스트리듐 신경독소는 수의근 근력을 약화시키고, 사시, 국소성 긴장이상증, 예를 들어, 경부 긴장이상증, 및 양성 본태성 안검경련의 효과적인 치료법이다. 클로스트리듐 신경독소는 나아가 편측안면경련, 및 국소 강직을 완화하고, 더욱이, 광범위한 기타 증상, 예를 들어, 위장 장애, 다한증, 및 미용 주름 교정에 효과적인 것으로 밝혀졌다(참조: Jost 2007, Drugs 67, 669).

[0006] 클로스트리듐 신경독소의 제조 과정 동안, 상기 신경독소의 정성적 및 정량적 측정 뿐만 아니라 생물학적으로 활성인 신경독소 폴리펩티드의 품질 제어가 특히 중요하다. 또한, 정부 기관은 단지 간단하고 신뢰할 수 있으며 검증된 보툴리눔 독소 활성 검정을 수용한다. 현재 마우스 LD₅₀ 생물검정, 치사율 시험은 여전히 의약 제조업자에 의해 그들의 제제의 효능을 분석하는데 사용되는 "골드 표준"이다(참조: Arnon 등 (2001), JAMA 285, 1059-1070). 그러나, 최근에, 동물 시험에 대한 필요 및 모든 불리한 점, 비용 및 이러한 유형의 동물-기반 검정과 관련되는 윤리적 관심을 완화하는 대안적 접근법을 탐색하는 상당한 노력이 있어 왔다. 또한, 규제 기관은 보툴리눔 신경독소의 효능 시험에 3가지 "R" 원리를 적용하기 위해 제약 회사들과 협력하고 있다(참조: "Reduce, Refine, Replace"; Straughan, Altern. Lab. Anim. (2006), 34, 305-313). 결과로서, 살아 있는 동물을 사용하는 방법에 대한 합리적 대안을 제공하기 위해 세포-기반 시험 시스템이 개발되었다. 그러나, 지금까지 신경독성 폴리펩티드에 충분히 민감인 것으로 밝혀진 신경독소 생물학적 활성의 측정에 3개의 세포상 시험 시스템만이 이용가능하다. 이들 세포-기반 시험 시스템은 시험관 내에서 분화되는 설치류 배아로부터 단리된 1차 뉴런(참조: Pellett 등 (2011), Biochem. Biophys. Res. Commun. 404, 388-392), 뉴런 분화 유도된 다능성 줄기 세포(참조: Whitmarsh 등 (2012), Toxicol. Sci. 126, 426-35), 및 SiMa 세포주의 서브클론(참조: WO 2010/105234 A1)의 사용을 포함한다.

[0007] 그러나, 1차 뉴런의 단리는 동물의 살해를 필요로 하고 힘들고 시간 소모적이다. 추가로, 상이한 1차 뉴런을 사용하는 시험 시스템은 큰 편차를 보인다. 유사하게, 뉴런 분화 유도된 다능성 줄기 세포의 생성은 어렵고, 시간 소모적이다. 또한, 그러한 세포의 저장은 매우 문제가 많다. 종양 세포주를 사용하는 검정은 빈번히 BoNT에 충분히 민감성이 아니다. 더욱이, 복잡한 분화 프로토콜이 상기 종양 세포주에 요구되며, 이는 상기 세포주를 사용하는 검정의 큰 편차 및/또는 높은 실패율을 초래한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기에 비추어, 정부 기관에게 수용가능한 신경독소 폴리펩티드 활성을 측정하기 위한 추가의 시험 시스템이 매

우 바람직하다. 또한, 동물-기반 시험 시스템에 대한 대안이 필요하다.

[0009] 따라서, 본 발명의 기초가 되는 기술적 문제는 상기한 필요성에 응하는 수단 및 방법의 제공으로 나타날 수 있다. 기술적 문제는 청구항 및 본원에서 이하 특성화되는 구현예에 의해 해결된다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은, 제1 국면에서, 신경독소의 생물학적 활성의 측정 방법으로, 상기 방법이
- [0011] (a)(i) 앵커 단백질, (ii) 리포터 단백질 및 (iii) 앵커 단백질과 리포터 단백질을 중재하는 신경독소 절단 부위를 포함하는 융합 단백질을 신경독소 민감성 세포에서 발현시키는 단계;
- [0012] (b) 단계 (a)의 신경독소 민감성 세포를 신경독소와 향온처리하고, 신경독소 민감성 세포를 신경독소가 이의 생물학적 활성을 발휘하도록 하는 조건하에 배양하는 단계;
- [0013] (c) 단계 (b)의 신경독소 민감성 세포를 투과된 신경독소 민감성 세포로부터 리포터 단백질의 방출은 가능하게 하지만 앵커 단백질의 방출은 가능하게 하지 않는 조건하에 투과시키는 단계; 및
- [0014] (d) 단계 (c)의 투과된 신경독소 민감성 세포로부터 방출된 리포터 단백질의 활성을 정량화하여 신경독소의 생물학적 활성을 측정하는 단계를 포함하는, 방법에 관한 것이다.
- [0015] 당해 기술 분야에 기재된 신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성을 측정하기 위한 세포 기반 시험 시스템에서, 세포는 신경독소 폴리펩티드에 대한 충분한 민감성을 획득하기 위해 세포를 신경 세포로 분화시킨다. 후속적으로, 이러한 세포는 신경독소 폴리펩티드와 향온처리한다. 이후, 절단된 신경독소 기질의 양은 통상적으로 특이적 항체를 사용함으로써 측정된다. 신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성의 정확한 측정을 위해, 고품질의 3개의 신경독소 기질-특이적 항체가 3개의 상이한 숙주 종으로부터 필요하다. 이는 신경독소 폴리펩티드의 기질, 예를 들어, BoNT/A 기질 SNAP-25를 다른 세포상 단백질로부터 분리하기 위해 포획 항체를 포함한다. 이 포획 항체는 빈번하게 신경독소 기질의 N-말단 영역, 예를 들어, SNAP-25의 N-말단 영역에 대해 지시된다. 추가로, 네오-에피토프 특이적 항체가 신경독소-절단된 기질, 예를 들어, BoNT/A-절단된 SNAP-25의 검출용으로 필요하다. 표준화를 가능하게 하는 신경독소 기질의 총량, 또는 비절단된 신경독소 기질의 양을 측정하기 위해, 일반적으로 신경독소 기질의 C-말단 영역, 예를 들어, SNAP-25의 C-말단 영역에 대해 지시된 추가의 검출 항체가 필요하다.
- [0016] 본 발명의 신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성의 측정 방법은 본 발명의 신규 융합 단백질을 발현시키기 위해 유전적으로 변형된 신경독소 민감성 세포에 기초한다. 신경독소 민감성 세포는 종양 세포주, 1차 세포, 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 본원의 다른 곳에서 정의된 다른 세포로부터의 세포이거나 이들로부터 유도될 수 있다. "로부터 유도된"은 신경독소 민감성 세포가, 예를 들어, 이의 클론 또는 서브클론을 포함하는 지시된 세포로부터 유래한다는 것을 의미한다. 이러한 클론 또는 서브클론은 부모 세포와 비교하여 비변형되거나 유전적으로 변형될 수 있다. 특정 국면에서, 신경독소 민감성 세포는 신경 세포로 분화될 수 있다. 이러한 경우에, 신경독소 민감성 세포는 신경독소 민감성 세포의 신경 분화 세포로의 분화를 가능하게 하는 조건하 및 시간 동안 배양 배지 중에서 분화된다. 본 발명의 융합 단백질은 본원의 다른 곳에서 보다 구체적으로 정의된 바와 같은 앵커 단백질, 신경독소 절단 부위 및 리포터 단백질을 포함한다. 예를 들어, 융합 단백질은 앵커 단백질, 리포터 단백질 및 신경독소 절단 부위로서 막 관통 단백질 또는 막 관련 단백질을 포함한다. 신경독소 폴리펩티드를 위한 절단 부위는 앵커 단백질과 리포터 단백질 사이에 위치된다. 본 발명의 방법의 제1 단계에서, 언급된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 이후에 (생물학적 활성) 융합 단백질의 발현을 가능하게 하는 조건하에 배양되는 신경독소 민감성 세포로 도입된다. 본 발명의 방법의 특정 국면에서, 본 발명의 융합 단백질의 발현은 당해 기술 분야에 공지된 유도성 발현 시스템, 예를 들면, 테트라사이클린-유도성 발현 시스템(참조: Zhou, X., Vink, M., Klave, B., Berkhout, B. & Das, A. T. (2006) Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. Gene Ther. 13(19): 1382-1390), 미페프리스톤-유도성 발현 시스템(참조: Wang, Y., B.W. O'Malley, J., Tsai, S. Y., and O'Malley, B. W. (1994). A Regulatory System for Use in Gene Transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8180-8184), 엑디존-유도성 발현 시스템(참조: No D, Yao TP, Evans RM. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 16; 93(8): 3346-51; Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Kaiser H, Brack AR, Kandolf R, Kupper JH. Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies. Anal Biochem. 2004 Nov 1; 334(1): 9-19) 또는 시판되는 것(참조: Clontech; Life Technologies; Agilent)에 의해 유도된다. 후속적으로, 신경독소 민감성 세포는 신경독소

가 이의 생물학적 활성을 발휘하도록 하는 시간(예: 약 24 내지 72시간) 및 조건하에 배양된 신경독소 폴리펩티드와 항온처리된다. 융합 단백질의 신경독소 폴리펩티드 절단 부위에서 신경독소 폴리펩티드의 단백질분해 활성에 의한 절단시, 리포터 단백질이 세포로 방출된다. 중독 단계에는 임의로 세척 단계가 뒤따를 수 있다. 이후에 신경독소 민감성 세포는, 예를 들어, 투과성 신경독소 민감성 세포로부터 앵커 단백질의 방출이 아니라 리포터 단백질의 방출을 가능하게 하는 시간 및 조건하에 용혈소에 의해 투과된다. 후속적으로, 리포터 단백질을 포함하는 상청액이 회수되고, 경우에 따라, 리포터 단백질의 활성이 측정되기 전에 추가로 처리된다, 예를 들어, 여과되거나 원심분리된다. 세포로부터 방출된 리포터 단백질의 활성을 정량화함으로써, 신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성이 측정될 수 있다.

[0017] 본 발명의 신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성의 시험 방법은 당해 기술 분야의 공지된 방법과 비교하여 향상된 민감도를 나타냈다. 또한, 본 발명의 방법은 간단한 조작성으로 인해 더 높은 정밀도와 견고함을 나타냈다. 본 발명의 이러한 기술적 및 정성적 이점은 다음 실시예에서 입증된다.

[0018] 클로스트리듐 신경독소는 그들이 시냅스전 신경 말단으로부터 신경전달물질의 분비를 특이적으로 억제한다는 점을 특징으로 한다. 말초 뉴런에 대한 선택성은 두 개의 상이한 수용체, SV2 및 GT1b의 인식에 의해 매개된다. 신경독소의 생리학적인 효과는 수용체의 결합 및 신경독소 경로의 전위에 이은 소위 SNARE 복합체의 단백질의 절단에 기초한다. BoNT의 생물학적 활성의 측정은 상기 신경독소 단백질의 특성화에서 중요한 국면이고, 특히 BoNT-함유 제품의 클리어런스를 위한 규제 당국에 의해 요구된다. 따라서, BoNT의 생물학적 활성의 측정을 위한 신뢰성 시험은 BoNT를 함유하는 제품의 연구, 개발 및 마케팅의 기초이다. 또한, 세포 기반 시험 시스템은 윤리적인 이유 때문에 지금까지 주요한 동물 시험을 대체할 것이다. 이러한 세포 기반 시험 시스템을 확립하기 위해, 보툴리눔 신경독소에 대한 신경 세포 또는 세포주의 충분한 고감도가 필수적이다. 그러나, 이러한 고감도를 획득하기 위해, 신경 세포주의 힘든 분화 방법이 지금까지 필요하다. 그 결과, 상기한 바와 같이, 몇 가지 세포 기반 시험 시스템만 사용할 수 있다. 의약품에서 보툴리눔 독소의 생물학적 활성을 측정하기 위해, 신경 세포 또는 세포주는 다음과 같은 특성을 가져야 한다: 첫째, 세포는 표적과 가능한 한 근접하게 닮기 위해 인간 신경 기원, 즉 인간 환자의 것이어야 한다. 둘째, 세포 시스템은 완성품의 부형제에 대해, 바람직하게는 생산 공정의 중간 단계(공정 제어)의 불순물에 대해서도 강해야 한다. 셋째, 세포 기반 시험 시스템은 바이알(예: 50U, 100U 또는 200U BoNT/A)에서 BoNT의 생물학적 활성의 정확한 측정을 가능하게 하는 동적 측정 범위를 나타내어야 한다. 부형제의 용해도, 세포 배양 배지의 용적 등과 같은 기술적 요인을 고려하면, 1pM 미만의 BoNT 농도가 정확하게 측정되어야 한다. 발명자의 최선의 지식에 따르면, BoNT에 대해 충분히 높은 민감도를 나타내는 세 가지 세포 기반 시험 시스템이 지금까지 이용가능하다. 이들은 본원의 다른 곳에서 이미 언급된 바와 같이, 설치류의 배아의 1차 뉴런, 뉴런 분화 유도된 다능성 줄기 세포 및 SiMa 세포주의 서브클론을 포함한다. 그러나, 상기 세포 또는 세포주는 빈번하게 큰 편차와 관련되는 복잡하고 힘든 분화 프로토콜 후에만 충분히 고감도를 나타내는 것으로 보고되었다. 대조적으로, 본 발명은 상기 요건을 충족시키고, 당해 기술 분야에 기재된 세포상 시험 시스템과 비교하여 민감도와 관련하여 추가로 향상된 보툴리눔 신경독소(BoNT)의 생물학적 활성을 측정하기 위한 간단하고 신뢰가능하며 견고한 세포 기반 시험 시스템을 제공한다.

[0019] 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 다른 숙주 세포 폴리펩티드를 본질적으로 함유하지 않는 단리되거나 정제된 폴리펩티드를 포함한다. 언급된 용어는 융합 단백질을 포함한다. 융합 단백질 또는 키메라 단백질(문자 그대로, 상이한 공급원으로부터의 부분으로 제조됨)은 원래 별도의 단백질로 코딩된 둘 이상의 유전자의 결합을 통해 생성된 단백질이다. 이 융합 유전자의 번역은 원래 단백질 각각으로부터 유도된 기능적 특성을 갖는 단일 단백질을 생성한다. 재조합 융합 단백질은 당해 기술 분야에 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 인공적으로 생성된다(참조: 예를 들어, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, third edition, 2001). 키메라 단백질 또는 키메라는 일반적으로 상이한 기능 또는 물리화학적 패턴을 갖는 폴리펩티드로 제조된 하이브리드 단백질을 나타낸다. 또한, 용어 "융합 단백질"은 하나의 국면에서 화학적으로 변형된 융합 단백질을 포함한다. 이러한 변형은 돌연변이, 예를 들어, 점 돌연변이, 치환, 결실, 삽입 등과 같은 인공적 변형, 또는 번역후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 포스포릴화, 팔미토일화, 미리스토일화 등과 같은 천연 발생 변형일 수 있다. 융합 단백질은 본원에서 언급된 생물학적 특성을 가져야 한다. 보다 구체적으로, 본원에 사용된 용어 "융합 단백질" 또는 "융합 폴리펩티드"는 앵커 단백질, 리포터 단백질 및 신경독소 절단 부위를 포함한다. 본원에 사용된 "앵커 단백질"은 원형질 막에 안정하게 부착되거나 원형질 막에 통합되고, 신경독소 민감성 세포의 세포질과 접촉하는 폴리펩티드이다. 따라서, 앵커 단백질은 (트랜스)막 또는 통합 막 단백질 또는 막-관련 단백질일 수 있다. 융합 단백질의 앵커 단백질은 원형질 막의 내부((트랜스)막 또는 통합 막 단백질의 경우) 또는 원형질 막(막-관련 단백질의 경우)에 둘 다 절단되지 않고 신경독소-절단된 상태로 위치된다. 원형질 막에 일시적으로 부착되거나 원형질 막에 단지 부분적으로 관련되는 단

백질은 앵커 단백질로서 적합하지 않다는 것이 당업자에게 즉시 명백하다. 원형질 막은 세포막 및 소포막을 포함한다. 막관통 단백질은, 예를 들어, 콜린 수송체(NP_068587), 히스타민 H1 수용체(H1-수용체, NP_001091683), 또는 임의의 다른 G 단백질 커플링된 수용체(GPCR; 예를 들어, AAI28124, NP_000675, P08172) 또는 SV2(NP_055664)이다. 막-관련 단백질은, 예를 들어, SNAP-25(P60880), MARCKS 단백질(NP_002347), 또는 C2 도메인 함유 단백질(예: NP_002728; NP_002730)이다. 언급된 생물학적 특성을 갖는 이러한 앵커 단백질의 단편도 또한 포함된다. 본원에 사용된 "신경독소 절단 부위"는 BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G 또는 TeNT 절단 부위, 바람직하게는 BoNT/A, BoNT/C1 또는 BoNT/E 절단 부위이다. 신경독소 절단 부위는 신경독소 폴리펩티드에 의해 인식되고 절단된다. 신경독소 절단 부위의 상응하는 서열은 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 개시 내용이 본원에 참조로 인용된 문헌(참조: Binz 등 (2010), *Toxins*, 2(4), pp. 665-682, WO 2010/124998 또는 WO 2010/105234 A1)에 기재되어 있다. 신경독소 절단 부위는 앵커 단백질과 리포터 단백질 사이에 위치되고, 신경독소 민감성 세포의 세포질로부터 신경독소 폴리펩티드에 접근가능하다. 융합 단백질의 신경독소 폴리펩티드 절단 부위에서 신경독소 폴리펩티드의 단백질분해 활성에 의해 절단시, 리포터 단백질은 신경독소 민감성 세포의 세포질로 방출되는 반면, 앵커 단백질은 원형질 막 내에 또는 원형질 막에 잔류한다. 본원에 사용된 "리포터 단백질" 또는 "검출 단백질"(두 용어는 상호교환가능하다)은 검출가능한 마커, 예를 들어, 루시페라제, 알칼리성 포스포타제, 베타-갈락토시다제 또는 서양고추냉이 퍼옥시다제와 같은 효소이다. 또는, 리포터 단백질은 형광성 단백질, 예를 들어, GFP, BFP, YFP, RFP 등일 수 있다. 융합 단백질의 리포터 단백질은 비절단된 상태로 원형질 막에 위치되고, 신경독소 폴리펩티드에 의한 절단시 세포질로 방출된다. 언급된 생물학적 특성을 갖는 이러한 리포터 단백질의 단편도 또한 포함된다. 융합 단백질의 배열은 앵커 단백질-신경독소 절단 부위-리포터 단백질 또는 리포터 단백질-신경독소 절단 부위-앵커 단백질일 수 있다. 융합 단백질은 하나 이상의 링커 영역, 예를 들어, 폴리-글리신 링커 등을 추가로 포함할 수 있다. 링커는, 예를 들어, 융합 단백질에서 앵커 단백질과 신경독소 절단 부위 또는 신경독소 절단 부위와 리포터 단백질을 연결하기 위해 사용될 수 있다. 둘 이상의 링커, 예를 들어, 앵커 단백질과 신경독소 절단 부위 사이에 하나의 링커 및 신경독소 절단 부위와 리포터 단백질 사이에 추가의 링커가 융합 단백질에 사용된다는 것이 또한 예상된다. 링커는 동일하거나 상이할 수 있다. 하나 이상(예: 둘, 셋 또는 심지어 그 이상)의 신경독소 절단 부위(들)를 포함할 수 있는 앵커 단백질 및 리포터 단백질 사이의 링커도 또한 포함된다. 본원에 사용된 용어 "링커" 또는 "링커 영역"은 아미노산 서열의 짧은 세그먼트인 폴리링커를 나타낸다. 상응하는 DNA 서열에 의해 코딩된 적합한 링커 서열은, 예를 들어, 문헌(참조: Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C: *Neurotoxins affecting neuroexocytosis. Physiol. Rev.* 2000, 80: 717-66)에 기재되어 있다. (가요성 또는 강성 링커에서와 같이) 기능적 단백질을 함께 연결하는데 있어서의 기본적인 역할 이외에, 링커는 융합 단백질을 생산하기 위한 다수의 다른 이점을 제공할 수 있다, 예를 들어, 생물학적 활성을 향상시키고, 발현 수율을 증가시키고 목적하는 약물동태학적 프로파일을 달성할 수 있다(참조: 예를 들어, Chen 등, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65(10), pp.1357-69). 또한, 융합 단백질은, 예를 들어, 태그된 융합 단백질 또는 이의 성분, 예를 들어, 리포터 단백질의 효율적인 단리 및/또는 정제를 가능하게 하는 적합한 태그, 예를 들어, FLAG-태그, Myc-태그, His-태그, HA-태그 또는 GST-태그를 포함할 수 있다. 태그(들)는 경우에 따라 링커를 통해 융합 단백질에 부착될 수 있다. 융합 단백질이 표준화 또는 정규화 인자를 포함한다는 것이 본 발명의 범위에 의해 또한 예상된다. 표준화 또는 정규화 인자는 또한 경우에 따라 링커를 통해 융합 단백질에 부착될 수 있다. 예를 들어, GFP가 본 발명의 콜린 수송체-GFP-SNAP-25-루시페라제 융합 단백질에서 표준화 인자 또는 정규화 인자로서 사용된다. 각 측정 또는 측정된 값의 정규화 또는 보정을 위한 이러한 추가의 성분의 도입은 개별 측정의 통계적 편차를 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 검정 과정에서, 상이한 발현율, 세포수, 재료 손실 등이 랜덤하게 또는 체계적으로 발생하여 측정된 값이 통계적 오차를 경험하게 한다. 보정 계수를 도입함으로써, 개별적 측정치를 보다 용이하게 서로 비교할 수 있다. 예를 들어, 세포의 배양 동안 상이한 발현율이 발생하거나, 세척 단계 동안 세포 재료의 상이한 손실이 존재하는 경우, 이는 보정 계수의 측정에 의해 예측가능할 것이다. 융합 단백질은, 하나의 국면에서, 당업자에게 익히 공지된 화학적 합성 또는 제조합 분자 생물학 기술에 의해 제조할 수 있다(참조: 예를 들어, Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, third edition, 2001). 하나의 국면에서, 이러한 융합 단백질의 제조 방법은 (a) 본원에 다른 곳에서 보다 상세히 기재된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 (b) 상기 숙주 세포로부터 융합 단백질을 수득하는 단계를 포함한다. 이 방법의 하나의 국면에서, 융합 단백질은, 예를 들어, 숙주 세포 용해물로부터 친화도 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및/또는 예비 겔 전기영동을 포함하는 통상의 정제 기술에 의해 수득될 수 있다. 하나의 국면에서 용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 융합 단백질 및 다른 단백질을 또한 포함하는 폴리펩티드 체제를 포함한다.

[0020]

본원에 사용된 용어 "신경독소 민감성 세포"는 신경독소 폴리펩티드에 특징적인 생물학적 특성, 즉, (a) 수용체 결합, (b) 내재화, (c) 엔도솜 막을 통한 세포질로의 전좌 및/또는 (d) 시냅스 소포 막 융합에 관련되는 단백질의 엔도단백질분해 절단을 나타내는 신경독소 폴리펩티드에 민감한 세포를 의미한다. 따라서, 본원에서 언급된 "신경세포 민감성 세포"는 신경독소 중독에 민감하다. 신경독소 중독에 민감한 세포는 바람직하게는 본원에서 정의된 바와 같은 생물학적 활성 또는 성숙 신경독소 폴리펩티드에 민감하다. 정의상, "신경독소 중독에 민감한 세포"는 적어도 하나의 신경독소 수용체 및 적어도 하나의 신경독소 기질을 발현시키거나 발현시키도록 유전자조작되어야 한다. 신경독소를 위한 수용체 및 기질은 당해 기술 분야에 기재되어 있다. 본원에 사용된 용어 "신경독소 민감성 세포"는 세포 또는 세포주, 예를 들면, 단리된 1차 세포 또는 이의 세포주 또는 확립된 세포주의 세포 또는 확립된 세포주, 예를 들어, 본원에서 정의된 바와 같은 신경아세포종 세포 또는 신경아세포종 세포주를 포함한다. 본원에 나타낸 신경독소 민감성 세포는 적합한 세포 배양 조건하에 신경 세포로 분화시킬 수 있는 세포, 예를 들어, 종양 세포를 포함한다. 이러한 세포는, 예를 들어, 종양 세포주로부터의 세포, 예를 들어, Neuro-2a 세포, PC12 세포, NG108-15 세포, P19 세포, SiMa 세포 또는 SH-SY5Y 세포, 1차 세포, 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포, 이로부터 유도된 세포 또는 본원의 다른 곳에서 정의되고 다음 실시예에 사용된 다른 세포를 포함한다. 본원에 나타낸 용어 "신경독소 중독에 민감한"은 전체 세포상 메카니즘을 경험할 수 있는 세포를 의미하고, 이에 의해 신경독소 폴리펩티드(예: BoNT/A)는 신경독소 기질(예: BoNT/A 기질 SNAP-25)을 절단하고, 이의 상응하는 수용체에 대한 신경독소의 결합(예: BoNT/A 수용체에 대한 BoNT/A의 결합), 신경독소/수용체 복합체의 내재화, 세포내 소포로부터의 신경독소 경로의 세포질로의 전좌 및/또는 신경독소 기질의 단백질분해 절단, 바람직하게는 언급된 메카니즘 모두를 포함한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 신경독소 민감성 세포는 바람직하게는 먼저 신경독소를 흡수한 다음, 상기 나열된 전반적인 세포상 메카니즘을 경험할 수 있다. 본원에 사용된 신경독소 민감성 세포는, 예를 들어, 약 100나노몰(nM), 약 10nM, 약 1nM, 약 500피코몰(pM), 약 400pM, 약 300pM, 약 200pM, 약 100pM, 약 90pM, 약 80pM, 약 70pM, 약 60pM, 약 50pM, 약 40pM, 약 30pM, 약 20pM, 약 10pM, 약 9pM, 약 8pM, 약 7pM, 약 6pM, 약 5pM, 약 4pM, 약 3pM, 약 2pM, 약 1pM, 약 0.5pM, 또는 약 0.1pM의 신경독소 폴리펩티드 또는 심지어 지시된 값의 1 미만을 흡수할 수 있다. 100pM 이상의 EC50 값이 문헌에 보고되어 있다. 바람직하게는, 본원에 사용된 "신경독소 민감성 세포"는, 예를 들어, 약 1nM 이하, 500pM 이하, 약 400pM 이하, 약 300pM 이하, 약 200pM 이하, 약 100pM 이하, 약 90pM 이하, 약 80pM 이하, 약 70pM 이하, 약 60pM 이하, 약 50pM 이하, 약 40pM 이하, 약 30pM 이하, 약 20pM 이하, 약 10pM 이하, 약 9pM 이하, 약 8pM 이하, 약 7pM 이하, 약 6pM 이하, 약 5pM 이하, 약 4pM 이하, 약 3pM 이하, 약 2pM 이하, 약 1pM 이하, 약 0.9 pM 이하, 약 0.8pM 이하, 약 0.7pM 이하, 약 0.6pM 이하, 약 0.5 pM 이하, 약 0.4pM 이하, 약 0.3pM 이하, 약 0.2pM 이하, 또는 심지어 약 0.1pM 이하까지 신경독소 중독에 민감하다. 신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성을 측정하기 위한 검정은 당해 기술 분야에 익히 공지되어 있고, 또한 본원의 다른 곳에 기재되어 있다(참조: 예를 들어, Pellett 등, Withemarsh 등 *Toxicological Sciences* 126(2), 426-435 (2012), WO 2010/105234 A1).

[0021]

당해 기술 분야에 공지된 바와 같이, "절반 최대 유효 농도(EC50)"는 일부 특정 노출 시간 후 기준치와 최대치 사이의 반응 중간치를 유도하는 약물, 항체 또는 독물의 농도를 의미한다. 이는 일반적으로 약물 효능의 척도로서 사용된다. 따라서, 등급화된 용량 반응 곡선의 EC50은 이의 최대 효과의 50%가 관찰되는 화합물의 농도를 나타낸다. 정량적 용량 반응 곡선의 EC50은 특정 노출 기간 후 집단의 50%가 반응을 나타내는 화합물의 농도를 나타낸다.

[0022]

신경독소 중독에 민감하고/하거나 신경독소 흡수 능력을 갖는 세포 또는 세포주, 즉, 본원에서 정의된 바와 같은 신경독소 민감성 세포의 동정 및/또는 단리 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다(참조: 예를 들어, US 2012/0122128 A1). 신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성은, 하나의 국면에서, 상기한 생물학적 특성 모두로부터 생성된다. 당해 기술 분야에 공지된 신경독소의 생물학적 활성을 측정하기 위한 세포 기반 시스템은 본원의 다른 곳에 기술되어 있다. 신경독소의 생물학적 활성을 평가하기 위한 생체내 검정은, 예를 들어, 이미 언급된 마우스 LD₅₀ 검정 및 피어스 등 및 드레시어 등(Pearce 등 and Dressier 등)에 의해 문헌(참조: Pearce 1994, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128: 69-77 and Dressier 2005, *Mov. Disord.* 20:1617-1619)에 기재된 바와 같은 생체의 마우스 편측형경막 검정을 포함한다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 신경독소의 생물학적 활성은 일반적으로 마우스 단위(MU)로 표현된다. 1MU는 복강내 주사후 특정 마우스 집단의 50%를 사멸시키는 신경독성 성분의 양, 즉 마우스 i.p. LD 50이다. 본 발명의 방법은 복잡한 분화 프로토콜을 필요로 하는 당해 기술 분야에 기재된 세포상 시험 시스템과 비교하여 신경독소 폴리펩티드에 대한 민감도가 증가된 간단하고 신뢰가능하며 견고한 세포 기반 시험 시스템을 제공한다. 따라서, 본 발명의 방법은 신경독소의 생물학적 활성을 측정하기 위한 당해 기술 분야의 세포상 시험 시스템에 대한 향상된 대안을 제공한다. 추가로, 본 발명의 방법은 동물 기

반 검정의 대안으로서 사용될 수 있다.

[0023] 본원에 사용된 용어 "분화", "분화하는" 또는 "분화된"은 특정되지 않거나 비교적 덜 특정된 세포가 비교적 더 특정되는 공정을 나타낸다. 세포 개체 발생의 맥락에서, 형용사 "분화된"은 상대적인 용어이다. 따라서, "분화된 세포"는 비교되는 세포보다 특정 발달 경로를 따라 추가로 진행된 세포이다. 분화된 세포는, 예를 들어, 말단 분화된 세포, 즉, 유기체의 다양한 조직 및 기관에 특정 기능을 취하고, 가능하지만 유사분열후일 필요는 없는 완전 특정된 세포일 수 있다. 다른 예에서, 분화된 세포는 또한 추가로 증식시키고/시키거나 분화시킬 수 있는 분화 계통내의 전구 세포일 수 있다. 유사하게, 세포는 비교되는 세포보다 특정 발달 경로를 따라 추가로 진행될 경우 "비교적 덜 특정되고", 이때 후자는 따라서 "비특정된" 또는 "비교적 덜 특정된" 것으로 간주된다. 비교적 더 특정된 세포는, 예를 들어, 특정 세포상 성분 또는 생산물, 예를 들어, RNA, 단백질, 특정 세포상 마커 또는 다른 물질의 존재, 부재 또는 발현 수준, 특정 생화학적 경로의 활성화, 형태학적 외관, 증식 능력 및/또는 동역학, 분화 가능성 및/또는 분화 신호에 대한 반응 등과 같은 하나 이상의 명백한 표현형 특성에서 비특정된 또는 비교적 덜 특정된 세포와 상이할 수 있고, 여기서 이러한 특성은 추가로 상기 발달 경로에 따라 비교적 더 특정된 세포의 진행을 의미한다.

[0024] 본원에 사용된 용어 "신경 분화 세포"는 최종 신경 분화 상태에 도달한 세포를 의미한다. 예를 들어, 뮤린 배아 암종 P19 세포는 그들이 뉴런으로 추가로 분화되기 전에 신경-전구 세포로 먼저 분화한다. 신경-분화 공정은, 예를 들어, 표현형으로(위상차 현미경에 의해) 및/또는 신경 분화 마커의 발현에 의해 수행될 수 있다(참조: 예를 들어, Babuska 등 (2010), Prague Medical Report 111, 289-299 or Migliore and Shepherd, Nature Reviews Neuroscience 6, 810-818 (2005)). 상기 신경 분화 마커의 발현의 측정용으로 사용될 수 있는 검정은, 예를 들어, 당해 기술 분야에 공지되어 있는 PCR, RT-PCR, 노던 블롯, 웨스턴 블롯 또는 도트 블롯, 면역 침강 분석, 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA) 또는 FACS 분석을 포함한다(참조: 예를 들어, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, third edition, 2001). 신경 분화 세포의 추가의 특성을 시험하기 위한 검정도 또한 당해 기술 분야에 공지되어 있다.

[0025] 본원에 사용된 용어 "신경 세포로 분화할 수 있는 종양 세포"는, 예를 들어, 신경아세포종 세포, 배아 암종 세포, 기형암종 세포, 신경 하이브리드 세포(예: 뉴런 x 신경교아종 세포) 또는 섬유아세포종 세포를 의미한다. 신경 세포로 분화할 수 있는 이러한 종양 세포의 예는 마우스 및 인간 종양 세포, 즉, P19(뮤린 배아 암종) 세포, SiMa(인간 신경아세포종) 세포 또는 SH-SY5Y(인간 신경아세포종)를 포함한다.

[0026] 본원에 사용된 용어 "신경아세포종"은 신체의 다수의 영역에서 발견된 신경 세포로부터 발생하는 암을 의미한다. 신경아세포종은 신경 세포와 유사한 기원을 갖고 신장 상부에 착석하는 부신과 그 주위에서 가장 일반적으로 발생한다. 그러나, 신경아세포종은 또한 복부의 다른 영역과 신경 세포의 그룹이 존재하는 가슴, 목 및 골반에서도 발생할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "신경아세포종 세포"는 신경독소 민감성이고 신경 세포로 분화할 수 있는 하나 이상의 신경아세포종 세포를 포함한다. 신경아세포종 세포는 1차 신경아세포종 세포 또는 1차 신경아세포종 세포주일 수 있다. 확립된 신경아세포종 세포 또는 세포주도 또한 상기 용어에 의해 포함된다. 신경아세포종 세포는 포유동물 신경아세포종 세포, 예를 들어, 랫트 또는 마우스 신경아세포종 세포와 같은 설치류 신경아세포종 세포 뿐만 아니라 레서스, 마카크 또는 시노몰구스 신경아세포종 세포와 같은 원숭이 신경아세포종 세포 또는 침팬지 신경아세포종 세포와 같은 영장류 신경아세포종 세포 또는, 바람직하게는 인간 신경아세포종 세포일 수 있다. 확립된 신경아세포종 세포주의 예는, 예를 들어, Neuro-2a(마우스 신경아세포종), Kelly(인간 신경아세포종), SH-SY5Y(인간 신경아세포종) 또는 SiMa(인간 신경아세포종)를 포함한다. 인간 신경아세포종 세포는 바람직하게는 신경독소 민감성 신경 분화 세포를 생성하기 위해 본 발명의 방법에 사용된다. 보다 바람직하게는, 본원에서 정의된 바와 같은 신경아세포종 세포는 SiMa 세포 또는 SiMa 세포주이다. 이는, SiMa 세포가 BoNT-민감성 형태로 전송하는 것이 용이하기 때문이다. 또한, 그들은 BoNT에 대한 고감도를 갖는다. 또한, SiMa 세포에 대한 분화 프로토콜은 다른 신경아세포종 세포 또는 세포주와 비교하여 간단하고 보다 짧다. 본 발명의 방법에 사용된 SiMa 세포는 부모 SiMa 세포 또는 이로부터 유래된 (서브)클론일 수 있다.

[0027] 본 발명의 방법에 따라서 사용된 용어 "접촉하는"은 물리적 및/또는 화학적 및/또는 생물학적 상호 작용이 가능하도록 상기한 신경독소 민감성 세포 및 신경독소를 물리적으로 근접시키는 것을 의미한다. 신경독소 폴리펩티드는 천연, 제조합, 단리된, 변형된, 본질적으로 정제된 또는 정제된 신경독소 폴리펩티드 또는 이의 변이체일 수 있다. 또는, 신경독소는 샘플, 바람직하게는 생물학적 샘플, 예를 들어, 세포, 세포 용해물, 혈액, 혈장, 혈청 또는 림프액으로 구성될 수 있다. 특이적인 상호작용을 가능하게 하는 적합한 조건은 당업자에게 익히 공지되어 있다. 상기한 조건은 본 발명의 방법에 적용되는 세포 및 신경독소에 의존하고, 당업자는 더 이상 고심

하지 않고 적응할 수 있다. 또한, 상호작용을 가능하게 하기에 충분한 시간은 또한 일상적인 실험에 의해 당업자가 결정할 것이다. 예를 들어, 본원에 정의된 단리된 또는 재조합 신경독소 폴리펩티드 또는 이의 변이체 또는 신경독소 폴리펩티드를 포함하는 샘플의 특정량이 신경독소 민감성 세포에 첨가될 수 있다. 이후, 세포를 신경독소 폴리펩티드가 이의 생물학적 활성을 발휘하도록 하는 조건하에서 적어도 24시간, 바람직하게는 48시간, 더욱 바람직하게는 72시간 동안 신경독소 폴리펩티드로 항온처리한다. 본원에 사용된 "신경독소 폴리펩티드가 이의 생물학적 활성을 발휘하도록 하는 조건"은 당해 기술 분야에 공지되어 있다.

[0028] 본 발명에 사용된 용어 "신경독소", "신경독소 폴리펩티드" 또는 "신경독소 단백질"은 보툴리눔 신경독소의 7개의 상이한 혈청형, 즉, BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G, 및 테타누스 신경독소 (TeNT), 및 본원에 정의된 바와 같은 이의 변이체를 의미한다. 상응하는 핵산 및 아미노산 서열은 당해 기술 분야에 공지되어 있다(참조: 예를 들어, Uniprot 또는 TREMBL 서열 데이터베이스 또는 WO 2010/124998, 이의 개시내용은 본원에 참조로 인용된다). 바람직하게는, BoNT/A, BoNT/C1 또는 BoNT/E가 본 발명의 방법에 사용된다. 상기 신경독소를 위한 상응하는 수용체 및 기질은 당해 기술 분야에 익히 기재되어 있다. 신경독소 폴리펩티드는 천연 발생 신경독소 또는 비천연 발생 신경독소일 수 있다. 천연 발생 신경독소 폴리펩티드는, 예를 들어, 번역후 변형, 택일적으로 접합된 전사물 또는 자발적인 돌연변이 및 서브타입으로부터 생성된 아이소폼을 포함하는 천연 발생 공정에 의해 생성된다. 예를 들어, BoNT/A 서브타입은 BoNT/A1 서브타입, BoNT/A2 서브타입, BoNT/A3 서브타입, BoNT/A4 서브타입 또는 BoNT/A5 서브타입이다. 천연 발생 신경독소 폴리펩티드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100개 이상의 아미노산 잔기가 첨가되고, 치환되거나 결실된 상기 참조된 서열을 포함한다. 천연 발생 BoNT/A를 포함하는 시판되는 약제학적 조성물은 이미 도입부에서 언급되어 있다. 비천연 발생 신경독소 폴리펩티드는, 예를 들어, 랜덤 돌연변이발생 또는 합리적 설계를 사용하는 유전자 공학에 의해 생성된 변경된 아미노산 서열을 갖는 신경독소 폴리펩티드 및 화학적 합성에 의해 생성된 신경독소 폴리펩티드를 포함하여, 구조가 인간 조작의 도움으로 변형된 임의의 신경독소 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 비천연 발생 신경독소 폴리펩티드는 당해 기술 분야에 기재되어 있다.

[0029] 본 발명의 다른 국면에서, 신경독소 폴리펩티드는 본원에서 정의된 BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G, 또는 테타누스 신경독소의 아미노산 서열과 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 신경독소 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또한 예상되고, 여기서 폴리뉴클레오티드는 본원에서 정의된 BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G, 또는 테타누스 신경독소의 아미노산 서열과 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한서열을 갖는다. 본 발명에 사용된 바와 같은 동일하다는 것은 서열이 최고 차수 일치가 수득되도록 정렬된 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 서열 동일성을 의미한다. 이는, 예를 들어, BLASTP, BLASTN, FASTA, Altschul 1990, J. Mol. Biol. 215, 403과 같은 컴퓨터 프로그램에서 분류된 공개 기술 또는 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 퍼센트 동일성 값은, 하나의 국면에서, 전체 아미노산 서열에 대해 계산된다. 다양한 알고리즘을 기반으로 하는 일련의 프로그램이 상이한 서열을 비교하는 당업자에게 이용가능하다. 이러한 맥락에서, Needleman 및 Wunsch 또는 Smith 및 Waterman의 알고리즘이 특히 신뢰할만한 결과를 제공한다. 서열 정렬을 수행하기 위해, GCG 소프트웨어 패키지(참조: Genetics Computer Group 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)의 일부인 프로그램 PileUp(참조: 1987, J. Mol. Evolution 25, 351; Higgins 1989 CABIOS 5, 151) 또는 프로그램 Gap and BestFit(참조: Needleman and Wunsch 1970, J Mol Biol 48; 443; Smith and Waterman 1981, Adv. Appl. Math. 2, 482)가 사용되어야 한다. 퍼센트(%)로 상기 인용된 서열 동일성 값은, 본 발명의 하나의 국면에서, 다르게 특정되지 않는 한, 서열 정렬을 위한 표준 셋팅으로서 항상 사용되는 다음 셋팅으로 전체 서열 영역에 대해 프로그램 GAP를 사용하여 결정되어야 한다: 갭 중량: 50, 길이 중량: 3, 평균 일치: 10.000 및 평균 불일치: 0.000. 상기한 변이체는, 본 발명의 하나의 국면에서, 신경독소의 생물학적 특성 중의 적어도 하나를, 하나의 국면에서, 본원에서 인용된 신경독소 폴리펩티드의 생물학적 특성 모두를 보유하는 것으로 이해될 것이다. 추가의 국면에서, 변이체는 향상되거나 변경된 생물학적 특성을 갖는 신경독소일 수 있고, 예를 들어, 그들은 효소 인식 및/또는 절단에 대해 향상된 기질 내의 절단 부위를 인식하고 절단할 수 있거나 수용체 결합 또는 상기 특정된 임의의 다른 특성에 대해 향상될 수 있다.

[0030] 본원에서 언급된 신경독소는 원칙적으로 N-말단 경쇄 및 C-말단 중쇄를 포함한다. 신경독소는 "미처리된 신경독소 폴리펩티드"로서 칭명되는 단일 쇠 전구체 분자로서 생성된다. 후속 처리 결과로서, "처리된 신경독소 폴리펩티드"가 수득된다. 상기 처리된 신경독소 폴리펩티드는 신경독소에 대한 특징적인 생물학적 특성, 즉, (a) 수용체 결합, (b) 내재화, (c) 엔도솜 막을 통한 세포질로의 전좌 및/또는 (d) 시냅스 소포 막 융합에 관련된

단백질의 엔도단백질분해 절단을 나타낸다. 따라서, 처리된 신경독소 폴리펩티드는 생물학적 활성 또는 성숙 신경독소 폴리펩티드로서 칭명된다. 신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성은, 하나의 국면에서, 본원의 다른 곳에서 나타낸 바와 같이, 상기한 생물학적 특성 모두로부터 생성된다.

[0031] 본원에 사용된 용어 "투과화"는 신경독소 민감성 세포의 혈장 또는 세포막을 투과성으로 만드는 공정을 의미한다. 세포 투과화의 하나의 방법은 용혈소, 예를 들어, 스트렙토폴리신 O(참조: Barry, E. 등, *Biotechniques*, 15, 1016 (1993); Graves, J.D. 등, *Biochem. J.*, 265, 407-413 (1990); Sekiya K, Satoh R, Danbara H, Futaesaku Y. A ring-shaped structure with acrown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. *J Bacteriol.* 1993 Sept.; 175(18): 5953-61), 퍼플린고리신 O(참조: Prepore to pore transition of a cholesterol-dependent cytolysin visualized by electron microscopy. Dang, T.X., Hotze, E.M., Rouiller, I., Tweten, R.K., Wilson-Kubalek, E.M. *J. Struct. Biol.* (2005)), 뉴몰리신(참조: Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJ, Andrew PW, Saibil HR (April 2005). "Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin". *Cell* 121 (2): 247-56), 리스테리오리신 O(참조: Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehland J, Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev.* 2001 July; 14(3): 584-640), 세균 용혈소 또는 뱀 또는 거미의 기공 형성 독소로 항온처리함으로써 신경독소 민감성 세포의 혈장 또는 세포막의 투과화를 포함한다. 많은 용혈소는 기공 형성 독소이고, 즉 그들은 세포의 세포질 막 상에 기공을 형성하여 세포를 투과성으로 할 수 있다. 용혈소를 사용하여 세포를 투과성으로 하는 방법 및 프로토콜은 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 상기한 간행물에 기재되어 있다. 신경독소 민감성 세포는 투과된 세포로부터 리포터 단백질의 방출을 가능하게 하지만, 앵커 단백질의 방출은 가능하게 하지 않는 조건하에 투과된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 혈장 또는 세포막은 용혈소에 의한 투과화를 사용함으로써 온전하게 유지된다. 막 관련 단백질 또는 막 단백질은 제자리에 잔류하고, 가용성 단백질만 세포막을 통과할 수 있고 세포 내부를 떠날 수 있다. 비절단된 융합 단백질은 세포막과 관련되고, 투과화 후 거기에 잔류한다. 절단된 융합 단백질로부터, 측정가능한 신호를 함유하는 부분, 즉 리포터 단백질은 세포 내부를 떠날 수 있고, 이에 의해 세포와 물리적으로 분리된다.

[0032] 본원에 사용된 용어 "양"은, 예를 들어, 리포터 단백질 또는 신경독소 폴리펩티드의 절대량, 상기 단백질 또는 폴리펩티드의 상대량 또는 농도 뿐만 아니라 그것과 관련되거나 그로부터 유도될 수 있는 임의의 값 또는 파라미터를 포함한다.

[0033] 예를 들어, 리포터 단백질 또는 신경독소 폴리펩티드의 "양을 측정하는"이란 용어는 정량적 또는 반정량적 방식으로, 예를 들어, 리포터 단백질 또는 신경독소 폴리펩티드의 절대량, 상대량 또는 농도를 측정하는 것에 관한 것이다. 검출에 적합한 척도는 당업자에게 익히 공지되어 있다. 리포터 단백질 또는 신경독소 폴리펩티드의 양의 측정은 하나의 국면에서 또한 소정량의 리포터 단백질 또는 신경독소 폴리펩티드와 표준 용액을 적용함으로써 방법의 보정을 필요로 하는 것으로 이해된다. 이러한 보정을 수행하는 방법은 당업자에게 익히 공지되어 있고, 또한 다음 실시예를 참조한다.

[0034] 본원에서 언급된 "리포터 단백질" 또는 "검출 단백질" (두 용어는 상호교환가능하다)은 하나의 국면에서, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제 및 서양고추냉이 퍼옥시다제와 같은 효소이다. 예를 들어, 루시페라제는 발광 반응을 촉매할 수 있는 효소의 부류에 속한다. 루시페라제는 반딧불 또는 세균 루시페라제로서 자연적으로 발생한다. 루시페라제 및 그들의 서브단위의 구조 뿐만 아니라 그들을 코딩하는 핵산 서열은 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌(참조: Chon 1985, *J. Biol. Chem.* 260(10): 6139-46 and Johnston 1986, *J. Biol. Chem.* 261(11): 4805-11)에 기재되어 있다. 루시페라제 활성은 루시페라제 기질의 효소 전환을 측정함으로써 결정될 수 있다. 후자의 것은 전환 반응 동안 방출된 빛의 강도를 검출함으로써 측정될 수 있다. 루시페라제에 의해 촉매된 전환 반응 동안 발생하는 발광을 측정하기 위한 적합한 시스템 및 키트는 당해 기술분야에 익히 공지되어 있고, 시판된다(제공자는, 예를 들어, Takara Clontech, Thermo Scientific, 및 Promega이고; 예를 들어, 다음 간행물을 참조한다: Gailey, P. C., Miller, E. J. & Griffin, G. D. (1997) Low-cost system for real-time monitoring of luciferase gene expression. *BioTechniques* 22: 528-534; Gould, S. J. & Subramani, S. (1988) Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Analyt. Biochem.* 175:5-13 Fulton, R. & Van Ness, B. (1993) Luminescent reporter gene assays for luciferase and beta-galactosidase using a liquid scintillation counter. *BioTechniques* 14:762-763; Lemasters, J. J. & Hackenbrock, C. R. (1977) Kinetics of product inhibition during firefly luciferase luminescence. *Biochemistry* 16(3): 445-447; Nguyen, V. T., Morange, M. & Bensaude, O. (1988) Firefly

luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. *Analyt. Biochem.* 171: 404-408; Seliger, H. H. & McElroy, W. D. (1960) Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.* 88:136-141; Vieites, J. M., Navarro-Garcia, F., Perez-Diaz, R., Pla, J. & Nombela, C. (1994) Expression and in vivo determination of firefly luciferase as gene reporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10:1321-1327). 산화환원 반응에서 루시페라제에 의해 매개된 발광은 샘플 중의 신경독소 폴리펩티드의 양과 동일하다. 따라서, 세포로부터 방출된 루시페라제의 활성을 정량화함으로써, 신경독소의 생물학적 활성이 측정될 수 있다. 공지된 신경독소 폴리펩티드 농도를 갖는 표준 곡선은 평행하게 기준으로 사용될 수 있다. 추가의 기준으로서, 단백질 측정이 경우에 따라 변할 수 있는 샘플 중의 세포 수에 루시페라제에 의한 신호를 일치시키기 위해 수행될 수 있다. 이 방법은 당해 기술 분야에서 통상적이며, 상기한 본 발명의 활성 검정과 병행하여 수행될 수 있다. 리포터 단백질로서 사용될 수 있는 다른 적합한 효소는 베타-갈락토시다제이다. 이 효소를 사용하는 검정은 또한 시판되고, 당해 기술 분야에 기재되어 있다(참조: Thermo Scientific, Life Technologies, Promega; Nielsen, D. A., Chou, J., MacKrell, A. J., Casadaban, M. J. and Steiner, D. F. (1983) *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(17): 5198-202). 또는, GFP, YFP, BFP 또는 RFP와 같은 형광성 단백질이 리포터 단백질로서 이용될 수 있다. 상기 리포터 단백질을 사용하는 검정은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 본원에 사용된 용어 "리포터 단백질의 활성을 정량화하는"은 신경독소 민감성 세포의 투과화 후 가용성 상청액에 잔류하는 본 발명의 절단된 용합 단백질의 리포터 단백질 활성 또는 신경독소 민감성 세포 중 또는 세포에 잔류하는 본 발명의 비절단된 용합 단백질의 잔류성 리포터 단백질 활성 또는 본 발명의 용합 단백질의 전체 리포터 단백질 활성을 측정함을 의미한다. 리포터 단백질의 전체 활성의 측정을 위해, 투과된 세포 중 리포터 단백질의 활성이 측정될 수 있거나, 상청액의 제거 후 전체 잔류하는 리포터 단백질의 활성이 측정될 수 있다. 또는, 본 발명의 용합 단백질 콜린 수송체-GFP-SNAP-25-루시페라제 중의 GFP와 같은 표준화 또는 정규화 인자가 측정되어 본 발명의 용합 단백질의 전체 초기량을 나타낼 수 있다. 세포로부터 방출된 리포터 단백질의 활성을 정량화함으로써, 신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성이 측정될 수 있다.

- [0035] 본원에 사용된 용어 "신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성을 측정하는"은 신경독소 단백질의 생물학적 특성, 즉, (a) 수용체 결합, (b) 내재화, (c) 엔도솜 막을 통한 세포질로의 전좌 및/또는 (d) 시냅스 소포 막 용합에 관련된 단백질의 엔도단백질분해 절단을 측정함을 의미한다. 보다 구체적으로, 신경독소(예: BoNT/A)가 신경독소 기질(예: SNAP-25)을 절단하는 전체적인 세포 메카니즘은 신경독소의 이의 상응하는 수용체에의 결합(예: BoNT/A의 BoNT/A 수용체에의 결합), 신경독소/수용체 복합체의 내재화, 세포내 소포로부터 신경독소 경로의 세포질로의 전좌 및 신경독소 기질의 단백질분해 절단을 포함한다. 신경독소 폴리펩티드의 생물학적 활성을 측정하기 위한 시험관내 및 생체내 검정은 당해 기술 분야에 익히 공지되어 있고, 본원의 다른 곳에 언급되어 있다(참조: 예를 들어, Pellett 등, Withmarsh 등 *Toxic. Sciences* 126(2), 426-435 (2012), WO 2010/105234 A1).
- [0036] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 맥락이 명백하게 다르게 지시하지 않는 한, 단수 및 복수 참조를 모두 포함한다. 예로서, "세포"는 하나의 세포보다 하나 이상을 의미한다.
- [0037] 본원에 사용된 바와 같이, 명시된 항목, 수, 백분율 또는 기간의 값을 정량화할 때 용어 "약"은 명시된 항목, 수, 백분율 또는 기간의 값의 ± 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%의 범위를 의미한다. ± 10%의 범위가 바람직하다.
- [0038] 본원에 사용된 용어 "본질적으로 정제된"은 신경독소 폴리펩티드가 본질적으로 다른 숙주 세포 폴리펩티드를 함유하지 않는다, 즉 그것이 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 숙주 세포 폴리펩티드의 불순물을 함유할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0039] 본원에 사용된 용어 "포함하는(comprising)", "포함한다(comprises)" 및 "구성된다(comprised of)"는 "포함하는(including)", "포함한다(includes)", "포함하는(encompassing)", "포함한다(encompasses)" 또는 "함유하는(containing)", "함유한다(contains)"와 동의어이고, 포괄적이거나 개방적이며, 추가의 인용되지 않은 구성원, 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 명백하게, "포함하는"이라는 용어는 "구성되는"이라는 용어를 포함한다. 보다 구체적으로, 본원에 사용된 용어 "포함하다"는 청구범위가 나열된 요소 또는 방법 단계 모두를 포함할 뿐만 아니라 또한 추가의 명명되지 않은 요소 또는 방법 단계도 또한 포함할 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 단계 a), b) 및 c)를 포함하는 방법은 이의 가장 협소한 의미로 단계 a), b) 및 c)로 이루어진 방법을 포함한다. "로 이루어지는"이란 어구는 조성물 (또는 장치, 또는 방법)이 인용된 요소 (또는 단계)를 포함하고, 더 이상 없음을 의미한다. 대조적으로, 용어 "포함한다"는 단계 a), b) 및 c) 이외에 추가의 단계, 예를 들어, 단

계 d) 및 e)를 포함하는 방법을 또한 포함할 수 있다.

- [0040] "0.1 내지 0.5 μmol 농도의 화합물 X"와 같은 수치 범위가 본원에 사용되는 경우, 그 범위는 0.1 및 0.5 μmol 뿐만 아니라 0.1과 0.5 μmol 사이의 임의의 수치 값, 예를 들어, 0.2, 0.3 및 0.4 μmol을 포함한다.
- [0041] 본원에 사용된 용어 "시험관내"는 동물 또는 인체의 외부 또는 외부를 나타낸다. 본원에 사용된 용어 "시험관내"는 "생체외"를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 용어 "생체외"는 전형적으로 동물 또는 인체로부터 제거되어 신체 외부에서, 예를 들어, 배양 용기에서 유지되거나 증식된 조직 또는 세포를 의미한다. 본원에 사용된 용어 "생체내"는 동물 또는 인체 내부 또는 내부를 나타낸다.
- [0042] 특정 국면에서, 본 발명의 방법은
- [0043] (a)(i) 앵커 단백질, (ii) 리포터 단백질 및 (iii) 앵커 단백질과 리포터 단백질을 중재하는 신경독소 절단 부위를 포함하는 융합 단백질을 신경 세포로 분화할 수 있는 신경독소 민감성 세포에서 발현시키는 단계;
- [0044] (b) 단계 (a)의 신경독소 민감성 세포를 상기 신경독소 민감성 세포를 신경 분화 세포로 분화하는 조건하 및 시간 동안 배양 배지에서 분화하는 단계;
- [0045] (c) 단계 (b)의 신경 분화 세포를 신경독소로 향온처리하고, 세포를 신경독소가 이의 생물학적 활성을 발휘하도록 하는 조건하에 배양하는 단계;
- [0046] (d) 단계 (c)의 신경 분화 세포를 투과된 신경 분화 세포로부터 리포터 단백질의 방출은 가능하게 하지만 앵커 단백질의 방출은 가능하게 하지 않는 조건하에 투과시키는 단계; 및
- [0047] (e) 단계 (d)의 세포로부터 방출된 리포터 단백질의 활성을 정량화하여 신경독소의 생물학적 활성을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0048] 이 특정 국면에서, 신경독소 민감성 세포는 신경 세포로 분화될 수 있다. 바람직하게는, 신경 세포로 분화될 수 있는 상기 신경독소 민감성 세포는 종양 세포이다. 본 발명의 방법의 일부 국면에서, 신경 세포로 분화될 수 있는 상기 종양 세포는, 예를 들어, ACC 기탁 번호: 164하에 DSMZ(German collection of Microorganisms and Cell cultures)로부터 이용가능한 SiMa 세포이다. SiMa 세포주 DSMZ ACC 164는 또한 부모 SiMa 세포주로서 공지되어 있다. 본 발명의 방법에 사용된 SiMa 세포는 부모 SiMa 세포 또는 이의 (서브)클론일 수 있다. 이러한 서브클론은 또한 당해 기술 분야에 공지되어 있다(참조: 예를 들어, WO 2010/105234, US 8,476,068 B2 또는 Ester Fernandez-Salas, Joanne Wang, Yanira Molina, Jeremy B. Nelson, Birgitte P. S. Jacky, K. Roger Aoki - PloSOne; 2012 7(11) e49516). 다른 국면에서, 신경 세포로 분화될 수 있는 종양 세포는 P19 세포(참조: Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. J Cell Biol. 1982 Aug; 94(2): 253-62; Staines WA, Craig J, Reuhl K, McBurney MW. Retinoic acid treated P19 embryonal carcinoma cells differentiate into oligodendrocytes capable of myelination. Neuroscience. 1996 Apr; 71(3): 845-53) 또는 SH-SY5Y 세포(참조: Encinas, Mario, 등 "Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells." Journal of neurochemistry 75.3 (2000): 991-1003)이다. 추가의 신경독소 민감성 세포는 본원에 다른 곳에서 언급된다. 상기 세포는 DMSZ의 프로토콜에 따라서 배양될 수 있다. 본 발명의 다른 특정 국면에서, 신경 세포로 분화될 수 있는 신경독소 민감성 세포는 1차 세포, 줄기 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포이거나 이들로부터 유도된다. 상기 세포를 신경 세포로 분화시키기 위한 프로토콜은 당해 기술 분야에 기재되어 있고, 예를 들어, 인용된 간행물을 참조한다.
- [0049] 본 발명의 방법의 특정 국면에서, 앵커 단백질은 막관통 단백질이다. 바람직하게는, 막관통 단백질은 콜린 수송체, H1-수용체(히스타민 H1 수용체), G 단백질 커플링된 수용체(GPCR) 및 SV2로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0050] 본 발명의 방법의 특정 국면에서, 신경독소 절단 부위는 BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G 및 TeNT 절단 부위로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본 발명의 융합 단백질에 포함된 신경독소 절단 부위는 융합 단백질에 의해 신경 독소 폴리펩티드에 이용 가능하여 신경독소 프로테아제가 적합한 조건하에 신경독소 민감성 세포에서 본 발명의 융합 단백질을 인식하고 결합하고 절단할 수 있도록 한다고 이해될 것이다. 당업자는 융합 단백질 내 적합한 배치가 어떻게 설계될 수 있는지를 잘 알고 있다. 또한, 융합 단백질은 동반되는 실시예에 기재된 신경독소 민감성 세포 중의 단백질분해 활성 신경독소 폴리펩티드에 의한 절단

에 대해 시험될 수 있다.

- [0051] 본 발명의 또 다른 특정 국면에서, 리포터 단백질은 루시페라제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제 및 서양고추냉이 퍼옥시다제 또는 GFP, YFP, BFP 및 RFP로 이루어진 그룹으로부터 선택된 형광성 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된 효소이다.
- [0052] 본 발명의 방법의 추가의 특정 국면에서, 용혈소는 세포의 투과화를 위해 사용된다. 신경독소 민감성 세포는 투과된 신경독소 민감성 세포로부터 리포터 단백질의 방출을 가능하게 하지만 앵커 단백질의 방출을 가능하지 않게 하는 조건하에 투과된다.
- [0053] 용혈소는 바람직하게는 스트렙토리신 0, 퍼프린고리신 0, 뉴몰리신, 세균성 용혈소 및 뱀 또는 거미의 기공 형성 독소로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 세포를 투과성화하는데 용혈소의 사용 및 이와 관련된 프로토콜은 당해 기술 분야에 익히 기재되어 있다.
- [0054] 본 발명의 방법의 특별한 국면에서, 융합 단백질은 콜린 수송체-GFP-SNAP-25-루시페라제, H1-수용체-SNAP-25-HRP 및 H1-수용체-SNAP-25-루시페라제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 융합 단백질을 포함하거나 융합 단백질로 이루어진다. 또한, 하나의 국면에서 서열번호 2 또는 4로 도시된 아미노산 서열, 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질이 포함된다. 두 서열 사이의 서열 동일성을 측정하기 위한 수단 및 방법은 본원의 다른 곳에서 언급되어 있다. 퍼센트 동일성 값은, 하나의 국면에서, 기준 서열, 즉, 서열번호 2 또는 4의 전체 아미노산 서열에 대해 계산된다. 서열번호 2(콜린 수송체-GFP-SNAP-25-루시페라제; CHT-GFP-SNAP-LUC)에 나타난 아미노산 서열은 서열번호 1 및 5에 도시된 핵산 서열에 의해 코딩되고, 서열번호 4(H1-수용체-SNAP-25-루시페라제; HIR-SNAP-LUC)에 나타난 아미노산 서열은 서열번호 3에 도시된 핵산 서열에 의해 코딩된다. 상응하는 서열은 서열 목록에 나타난다.
- [0055] 본 발명의 방법의 추가의 국면에서, 리포터 단백질의 활성의 정량화는 리포터 단백질의 활성의 표준화를 포함한다.
- [0056] 본 발명의 방법의 특이적 국면에서, 리포터 단백질의 활성의 표준화는 신경독소 민감성 세포 중 또는 세포에 잔류하는 비절단된 융합 단백질의 잔류성 리포터 단백질 활성 또는 융합 단백질의 전체 리포터 단백질 활성을 측정함으로써 수행된다.
- [0057] 또한, 본 발명은 신경독소 민감성 세포에서 신경독성의 생물학적 활성을 측정하기 위한, (i) 앵커 단백질, (ii) 리포터 단백질 및 (iii) 앵커 단백질과 리포터 단백질을 중재하는 신경독소 절단 부위를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 바람직하게는, 신경독소 민감성 세포는 신경 세포로 분화될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 방법에 대한 정의 및 구현에는 본 발명의 융합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포 및 키트에 대해 준용된다.
- [0059] 본 발명의 융합 단백질의 특정 국면에서, 앵커 단백질은 콜린 수송체(CHT), H1-수용체, GPCR 및 SV2로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 리포터 단백질은 루시페라제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제 및 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 또는 GFP, YFP, BFP 및 RFP로 이루어진 그룹으로부터 선택된 형광성 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된 효소이고; 신경독소 절단 부위는 BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G 및 TeNT 절단 부위로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본 발명의 융합 단백질에 언급된 앵커 단백질, 리포터 단백질 및 신경독소 절단 부위의 임의의 조합이 추가로 포함된다. 바람직하게는, 본 발명의 융합 단백질의 배치는 N-말단으로부터 C-말단으로, 앵커 단백질-신경독소 절단 부위-리포터 단백질이다. 표준화 인자가 사용되는 경우, 본 발명의 융합 단백질의 배치는 바람직하게는 N-말단으로부터 C-말단으로, 앵커 단백질-표준화 인자-신경독소 절단 부위-리포터 단백질이다.
- [0060] 본 발명의 융합 단백질의 추가의 특정 국면에서, 융합 단백질은 콜린 수송체-GFP-SNAP-25-루시페라제(표준화 또는 정규화 인자로서 GFP 포함), H1-수용체-SNAP-25-루시페라제 및 H1-수용체-SNAP-25-HRP로 이루어진 그룹으로부터 선택된 융합 단백질을 포함하거나 융합 단백질로 이루어진다. 또한, 하나의 국면에서 서열번호 2 또는 4로 도시된 아미노산 서열, 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질이 포함된다. 두 서열 사이의 서열 동일성을 측정하기 위한 수단 및 방법은 본원의 다른 곳에서 언급되어 있다. 퍼센트 동일성 값은, 하나의 국면에서, 기준 서열, 즉, 서열번호 2 또는 4의 전체 아미노산 서열에 대해 계산된다. 서열번호 2(콜린 수송체-GFP-SNAP-25-루시페라제; CHT-GFP-SNAP-LUC)에 나타난 아미노산 서열은 서열번호 1 및 5에 도시된 핵산 서열에

의해 코딩되고, 서열번호 4(H1-수용체-SNAP-25-루시퍼라제; H1R-SNAP-LUC)에 나타낸 아미노산 서열은 서열번호 3에 도시된 핵산 서열에 의해 코딩된다. 상응하는 서열은 서열 목록에 나타낸다.

[0061] 본 발명은 또한 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

[0062] 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산(분자)"은 일본쇄 또는 이본쇄 DNA 분자 뿐만 아니라 RNA 분자를 의미한다. 게놈 DNA, cDNA, hnRNA, mRNA 뿐만 아니라 이러한 분자 중의 자연 발생 또는 인공적으로 변형된 유도체 모두가 상기 용어에 포함된다. 폴리뉴클레오티드는, 하나의 국면에서, 선형 또는 환형 분자이다. 폴리뉴클레오티드 서열은 본 발명의 융합 단백질을 코딩한다. 또한, 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열 이외에, 본원에 사용된 폴리뉴클레오티드는 적절한 전사 및/또는 번역에 필요한 추가의 서열, 예를 들어, 5' 또는 3' UTR 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 추가로 고심하지 않고 당업자에 의해 아미노산 서열로부터 유도될 수 있다. 유전 코드의 축퇴성 면에서, 최적의 코돈이 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 사용될 수 있다. 이에 의해, 예를 들어, 신경독소 민감성 세포에서 최적의 발현이 달성될 수 있다.

[0063] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 하나의 국면에서, 상기 벡터는 발현 벡터이다.

[0064] 용어 "벡터"는 바람직하게는 과지, 플라스미드, 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터 뿐만 아니라, 세균 또는 효모 인공 염색체와 같은 인공 염색체를 포함한다. 또한, 상기 용어는 또한 게놈 DNA로 표적화 작제물의 랜덤 또는 부위 지시된 통합을 가능하게 하는 표적화 단백질에 관한 것이다. 이러한 표적 작제물은, 바람직하게는 동종 또는 이종 재조합에 충분한 길이의 DNA를 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는, 하나의 국면에서, 숙주 또는 숙주 세포에서 증식 및/또는 선택을 위한 선택가능한 마커를 추가로 포함한다. 벡터는 당해 기술 분야에 익히 공지된 다양한 기술에 의해 숙주 세포로 도입될 수 있다. 예를 들어, 인산칼슘 침전물 또는 염화루비듐 침전물과 같은 침전물, 또는 하전된 지질과의 복합체 또는 플러렌과 같은 탄소 기반 클러스터에 도입될 수 있다. 또는, 플라스미드 벡터는 열 충격 또는 전기천공 기술에 의해 도입될 수 있다. 벡터는 바이러스여야 하고, 이는 숙주 세포에 적용 전에 적합한 패키징 세포주를 사용하여 시험관내에서 패키징될 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 복제 능력이 있거나 복제 결함이 있을 수 있다. 후자의 경우, 바이러스 증식은 일반적으로 숙주/세포를 보완하는데에서만 발생할 것이다. 또한, 본 발명의 하나의 국면에서, 폴리뉴클레오티드는 상기 벡터 중의 원핵 또는 진핵 숙주 세포 또는 단리된 이의 분획에서의 발현을 가능하게 하는 발현 조절 서열에 작동적으로 연결된다. 폴리뉴클레오티드의 발현은 폴리뉴클레오티드의 번역가능한 mRNA로의 전사를 포함한다. 숙주 세포에서 발현을 보장하는 조절 요소는 당해 기술 분야에 익히 공지되어 있다. 하나의 국면에서, 그들은 전사의 개시를 보장하는 조절 서열 및/또는 전사물의 전사 및 안정화의 종결을 보장하는 폴리-A 신호를 포함한다. 추가의 조절 요소는 전사 및 번역 인핸서를 포함할 수 있다. 원핵 숙주 세포에서 발현을 허용하는 가능한 조절 요소는, 예를 들어, 이. 콜리(E. coli) 중의 lac-, trp- 또는 tac- 프로모터를 포함하고, 진핵 숙주 세포에서 발현을 허용하는 조절 요소의 예는 효모 중 AOX1- 또는 GAL1- 프로모터 또는 포유동물 및 다른 동물 세포에서 CMV-, SV40-, RSV-프로모터(라우스 육종 바이러스), CMV-인핸서, SV40-인핸서 또는 글로빈 인트론이다. 본 발명에 의해 예상되는 다른 발현 시스템은 폴리헤드린 프로모터 기반 시스템과 같이 곤충 세포에서 발현을 허용해야 한다.

[0065] 또한, 유도성 발현 조절 서열이 본 발명에 포함되는 발현 벡터에 사용될 수 있다. 유도성 발현 시스템 및 적합한 발현 조절 서열은 당해 기술 분야에 익히 공지되어 있다. 예를 들어, 전사 전사 촉진용 테트라사이클린-반응성 조절 시스템은 문헌(참조: Zhu Z, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, Elias JA: Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2002, 13:121-8; or Shockett P, Schatz D: Inducible gene expression using an autoregulatory, tetracycline-controlled system. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2002, Chapter 16: Unit 16.14)에 기재되어 있다. 이러한 유도성 벡터는 tet 또는 lac 오퍼레이터 서열 또는 열 충격 또는 당해 기술 분야에 기재된 다른 환경 인자에 의해 유도될 수 있는 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 두 개의 일반적으로 사용되는 유도성 발현 시스템은 Tet-Off 및 Tet-On이다(참조: Bujard and Gossen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (12): 5547-51). 그들은 Tet 억제제와 억제제보다 전사 활성화 단백질(전사활성제)을 생성하기 위한 VP16 활성화 도메인의 융합으로 이루어진다. 유전자 발현은 Tet-Off 또는 Tet-On 단백질의 유도성 프로모터 내에 위치한 테트라사이클린 반응 요소(TRE)에의 결합 결과로서 활성화된다. 차이는 가장 안정한 테트라사이클린 유사체인 독사사이클린(Dox)에 대한 이들 각각의 반응에 관한 것이다: Tet-Off는 Dox의 부재하에 발현을 활성화시키는 반면, Tet-On은 Dox의 존재하에 활성화시킨다. 적합한 벡터는 시판된다. 예를 들어, Clontech에 의해

설정된 Tet-On 3G 벡터는 배양 배지에 독시사이클린을 첨가하여 작동시키는 엄격하게 조절된 매우 반응성 테트라사이클린(Tet)-유도성 포유동물 발현 시스템을 생성하기 위해 사용될 수 있다. pCMV-Tet3G 벡터는 유도제 독시사이클린의 존재하에 높은 활성을 나타내고, 이의 부재시에는 예외적으로 낮은 활성을 나타내는 테트라사이클린 조절된 전사활성제 Tet-On 3G를 발현시킨다. Tet-On 3G는 돌연변이 Tet 억제제(TetR)의 아미노산 1-207의 단순 포진 바이러스 VP16 단백질로부터 3개의 최소 "F"-형 전사 활성화 도메인을 형성하는 39 아미노산에의 융합으로부터 발생된다. Tet-On 3G의 구성적 발현은 인간 사이토메갈로바이러스 전초기 프로모터(P_{CMV IE})에 의해 구동된다. 추가로, EF1알파 변형은 CMV 프로모터가 사일런싱된 세포주에 이용가능하다. 추가의 상세한 정보는 Clontech 카탈로그 번호 631163 및 본원에 인용된 참조문헌을 참조한다. 전사의 개시를 담당하는 요소들 이외에, 이러한 조절 요소는 또한 폴리뉴클레오티드의 다운스트림의 SV40-폴리-A 부위 또는 tk-폴리-A 부위와 같은 전사 종결 신호를 포함할 수 있다. 이러한 맥락에서, Okayama-Berg cDNA 발현 벡터 pcDV1(Pharmacia), pBluescript(Stratagene), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3, pcDNA3.1(Invitrogen) 또는 pSPORT1(Invitrogen) 또는 바콜로바이러스 유도된 벡터와 같은 적합한 발현 벡터가 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 바람직하게는, 상기 벡터는 발현 벡터 및 유전자 전이 또는 표적화 벡터이다. 레트로바이러스, 우두 바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스 또는 소 유두종 바이러스와 같은 바이러스로부터 유래된 발현 벡터는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 표적 세포 집단으로의 전달을 위해 사용될 수 있다. 당업자에게 익히 공지된 방법은 재조합 바이러스 벡터를 작제하기 위해 사용될 수 있고, 예를 들어, 문헌(참조: Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), (2001) N.Y. and Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994))에 기재된 기술을 참조한다.

[0066] 본 발명은 추가로 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 융합 단백질을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0067] 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"는 원핵 및 진핵 숙주 세포, 바람직하게는 단리된 원핵 및 진핵 숙주 세포를 포함한다. 바람직하게는, 숙주 세포는 진핵 숙주 세포이다. 본원에 사용된 진핵 숙주 세포는 동물의 세포, 바람직하게는 본 발명의 융합 단백질을 생산하기에 적합한 포유동물 또는 인간 세포주이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 숙주 세포의 계놈에 안정하게 통합되거나 숙주 세포에 의해 일시적으로 발현될 수 있다. 따라서, 본원에서 언급된 숙주 세포는, 하나의 국면에서, 1차 세포 또는 세포주로서 효모 세포, 인간 세포를 포함하는 포유동물 세포, 식물 세포 또는 곤충 세포를 포함한다. 예를 들어, 본원에서 언급된 신경독소 민감성 세포는 숙주 세포로서 사용될 수 있다.

[0068] 본 발명의 융합 단백질은 당업자에게 익히 공지된 화학적 합성 또는 재조합 분자 생물학 기술에 의해 제조될 수 있다(참조: 예를 들어, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, third edition, 2001). 하나의 국면에서, 본 발명의 융합 단백질을 제조하는 이러한 방법은 (a) 본원에 다른 곳에 기재된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 (b) 상기 숙주 세포로부터 융합 단백질을 수득하는 단계를 포함한다. 이 방법의 한 국면에서, 본 발명의 융합 단백질은 숙주 세포 용해물로부터 친화도 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및/또는 예비 겔 전기영동을 포함하는 통상적인 정제 기술에 의해 수득될 수 있다. 융합 단백질이 본 발명의 융합 단백질 및 다른 단백질을 또한 포함하는 폴리펩티드 제제를 포함한다는 것이 본 발명의 범위에 의해 예상된다.

[0069] 또한, 본 발명은 융합 단백질, 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 벡터 및/또는 본 발명의 숙주 세포를 포함하는 키트에 관한 것이다. 본원에 사용된 용어 "키트"는 본 발명의 방법을 수행하기 위해 즉시 사용 가능한 방식으로 별개의 또는 통상적인 바이알에 제공되는 본 발명의 언급된 성분을 포함하는 수단의 집합체를 의미한다. 하나의 국면에서, 키트는 하나의 국면에서 본 발명의 방법을 수행하기 위한 부가적인 수단, 신경독소 폴리펩티드를 포함하는 보정 표준 용액 및/또는 리포터 단백질 활성(예: 루시페라제 활성)을 측정하기 위한 수단, 예를 들어, 리포터 단백질을 위한 검출제 또는 상기 리포터 단백질에 의해 전환된 기질을 포함한다. 또한, 키트는 본 발명의 방법을 수행하기 위한 지침서를 포함한다. 이러한 지침서는 매뉴얼로서 제공될 수 있거나 구현 시 본 발명의 방법의 하나 이상의 단계를 통제할 수 있는 데이터 저장 매체 상에 컴퓨터 구현가능한 알고리즘의 형태일 수 있다. 하나의 국면에서, 키트는 상기 특정된 본 발명의 방법을 수행하는데 사용되어야 한다.

발명의 효과

[0070] 최종적으로, 본 발명은 신경독소 민감성 세포에서 신경독소의 생물학적 활성을 측정하기 위한, 융합 단백질, 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 벡터 및/또는 본 발명의 숙주 세포의 용도에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0071] 본 발명은 이하 하기 실시예에 의해 설명되지만, 이는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0072] 실시예
- [0073] 서열번호 2에 나타낸 아미노산 서열을 코딩하는 서열번호 5에 나타낸 서열을 갖는 DNA 분자(콜린 수송체-GFP-SNAP-25-루시퍼라제; CHT-GFP-SNAP-LUC)를 새롭게 합성한 다음, pcDNA 3.1 벡터(Life Technologies)에 클로닝한다. 추가로, 플라스미드(삽입된 작제물을 갖는 DNA 벡터)를 증폭시키고, 추출하고 정제한다. DNA 합성, 클로닝, 증폭 및 단리는 GeneArt, Life technologies에 의해 수행된다.
- [0074] 플라스미드는 리포펙타민 2000(Life Technologies)을 사용하여 SH-SY5Y 세포(ATCC CRL-2266)에 형질감염시킨다. 세포 배양 및 형질감염은 공급업자의 지침서에 따라 수행된다.
- [0075] 플라스미드의 형질감염 후, 플라스미드 함유 세포를 선택적으로 성장시키기 위해 겐타마이신의 존재하에 배양한다. 배양이 약 5백만개의 세포에 도달하자마자 단일 세포 클로닝을 한계 희석 방법을 사용하여 수행한다. 이에 의해, 약 400 클론이 생성되고, 접착 품질, 성장률, 플라스미드 발현율 및 BoNT/A에 대한 민감도에 대해 시험한다. 발현율은 GFP 형광을 측정함으로써 결정되는 반면, BoNT/A 민감도는 문헌(참조: Pellett S, Tepp WH, Clancy CM, Borodic GE, Johnson EA. FEBS Lett. 2007 Oct 16; 581(25): 4803-8)에 따라 웨스턴 블롯 SNAP-25 절단 검정에 의해 시험된다. 양호한 접착성 및 성장률 및 SH-SY5Y 부모 세포에 필적하거나 더 나은 BoNT/A 민감도를 나타내는 클론으로부터, 최고 GFP 발현율을 갖는 것들을 선택하고, 세포 은행에 저장한다.
- [0076] BoNT/A 리포터 검정을 위해, 세포를 96-웰 플레이트 상에 씨딩한 후, 라셋티-에스카구에일 등(Rasetti-Escargueil 등)에 따라 분화시킨다(참조: Enhanced sensitivity to Botulinum type A neurotoxin of human neuroblastoma SH-SY5Y cells after differentiation into mature neuronal cells by C. Rasetti-Escargueil, C.B. Machado, R. Preneta-Blanc, R.A. Fleck, D. Sesardic The Botulinum J. (TBJ), Vol. 2, No. 1, 2011). 분화된 세포는 대수 단계로 0.01 내지 10pM의 최종 농도로 배양 배지에서 희석된 BoNT/A와 함께 72시간 동안 항온처리한다. 항온처리 후, 세포를 PBS(10mM 인산나트륨, 0.9% NaCl, pH 7.4)로 1회 세척하고, 50µl 스트렙토리신 0 용액(10mM 인산나트륨, 0.9% NaCl, 10mM 디티오프레이트, 50U/mL 스트렙토리신 0, pH 7.4)으로 투과시킨다. 37°C에서 15분 항온처리 후, 각 웰의 상청액을 화이트 96-웰 플레이트로 옮기고, 루시퍼라제 활성을 공급업자의 지침서(Sigma Aldrich LUC1-1KT)에 따라 측정한다. 배양 플레이트 상에 잔류하는 세포는 PBS로 1회 세척하고, GFP 형광을 플레이트 판독기로 측정한다. 각 단일 웰을 위해, Luc/GFP 비는 측정된 신호 값을 나누어서 계산한다. BoNT/A 생물학적 활성은 미지의 샘플의 용량 반응 곡선과 기준 표준의 각 곡선을, 예를 들어, 평행선 검정에 의해 비교함으로써 계산된다.

서열 목록

- <110> Merz Pharma GmbH & Co. KGaA
- <120> Methods for the Determination of the Biological Activities of Neurotoxin Polypeptides
- <130> MP12470PC
- <160> 5
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 4722
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> CHT-GFP-SNAP-LUC
- <400> 1

atggctttcc atgtggaagg actgatagct atcatcgtgt tctaccttct aattttgctg 60
 gttggaatat gggctgcctg gagaaccaa aacagtggca gcgcagaaga gcgcagcgaa 120
 gccatcatag ttggtggccg agatattggt ttattggttg gtggatttac catgacagct 180

 acctgggtcg gaggaggta tatcaatggc acagctgaag cagtttatgt accagttat 240
 ggcttagctt gggctcaggc accaatgga tattctctta gtctgatttt aggtggcctg 300
 ttctttgcaa aacctatgcg ttcaaagggg tatgtgacca tgttagacce gtttcagcaa 360
 atctatgaa aacgcatggg cggactcctg ttatttctg cactgatggg agaaatgttc 420
 tgggctgcag caattttctc tgctttggga gccacatca gcgtgatcat cgatgtggat 480
 atgcacattt ctgtcatcat ctctgcactc attgccactc tgtacacact ggtgggaggg 540
 ctctattctg tggcctacac tgatgtcgtt cagctctttt gcatttttgt agggctgtgg 600

 atcagcgtcc cctttgcatt gtcacatcct gcagtcgag acatcgggtt cactgctgtg 660
 catgccaat accaaaagcc gtggctggga actggtgact catctgaagt ctactcttgg 720
 cttagatgtt ttctgttgtt gatgctgggt ggaatcccat ggcaagcata ctttcagagg 780
 gtctctctt ctctctcagc cacctatgct caagtgtgt ccttctggc agctttcggg 840
 tgcttggtga tggccatccc agccatactc attggggcca ttggagcatc aacagactgg 900
 aaccagactg catatgggtt tccagatccc aagactacag aagaggcaga catgatttta 960
 ccaattgttc tgcagtatct ctgccctgtg tatatttctt tctttggtct tgggtgcagtt 1020

 tctgctgctg ttatgtcacc agcagattct tccatcttgt cagcaagttc catgtttgca 1080
 cggaacatct accagcttct ctccagacaa aatgcttcgg acaaagaaat cgtttgggtt 1140
 atgcgaatca cagtgtttgt gtttggagca tctgcaacag ccatggcctt gctgacgaaa 1200
 actgtgtatg ggctctggta cctcagttct gaccttgtt acatcgttat ctccccag 1260
 ctgctttgtg tactctttgt taagggaacc aacacctatg gggccgtggc aggttatgtt 1320
 tctggcctct tctgagaat aactggaggg gagccatctc tgtatcttca gcccttgatc 1380
 ttctaccctg gctattacc tgatgataat ggtatatata atcagaaatt tccatttaa 1440

 acacttgcca tggttacatc attcttaacc aacatttga tctctatct agccaagtat 1500
 ctatttgaaa gtggaacctt gccacctaaa ttagatgtat ttgatgctgt tgttgcaaga 1560
 cacagtgaag aaaacatgga taagacaatt ctgtcaaaa atgaaaatat taaattagat 1620
 gaacttgcac ttgtgaagcc acgacagagc atgacctca gctcaacttt caccaataaa 1680
 gaggccttcc ttgatgttga ttccagtcca gaagggtctg ggactgaaga taatttacag 1740
 atgagtaaag gagaagaact tttcactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt 1800

gatgttaatg ggcacaaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aagtgatgc aacatacga 1860

aaacttacc ttaaatat ttgcactact ggaactac ctgttccatg gccaacactt 1920
gtcactactt tctcttatgg tgttcaatgc ttttcaagat acccagatca tatgaaacag 1980
catgactttt tcaagatgc catgcccga ggttatgtac aggaaagaac tatattttc 2040
aaagatgacg ggaactaca gacacgtgct gaagtcaagt ttgaagtgat tacccttgtt 2100
aatagaatcg agttaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct tggacacaaa 2160
ttggaataca actataactc acacaatgta tacatcatgg cagacaaaca aaagaatgga 2220
atcaaagtta acttcaaat tagacacaac attgaagatg gaagcgttca actagcagac 2280

cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggcctgtcc ttttaccaga caaccattac 2340
ctgtccacac aatctgcctt ttcgaaagat cccaacgaaa agagagacca catggctctt 2400
cttgagtttg taacagetgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caaatggcc 2460
gaagacgcag acatgcgcaa tgagctggag gagatgcagc gaagggtga ccagtggct 2520
gatgagtcgc tggaaagcac ccgtcgtatg ctgcaactgg ttgaagagag taaagatgct 2580
ggtatcagga ctttggttat gttggatgaa caaggagaac aactggaac cattgaggaa 2640
gggatggacc aatcaataa ggacatgaaa gaagcagaaa agaatttgac ggacctagga 2700

aaattctgcg gcttttgtgt gtgtccctgt aacaagctta aatcaagtga tgcttacaaa 2760
aaagcctggg gcaataatca ggacggagtgt gtggccagcc agcctgctcg ttagtggac 2820
gaacgggagc agatggccat cagtggcggc tcatccgca gggtacaaa tgatcccga 2880
gaaaatgaaa tggatgaaaa cctagagcag gtgagcggca tcatcgggaa cctccgtcac 2940
atggccctgg atatggcaca tgagatcgt acacagaatc gccagatcga caggatcatg 3000
gagaaggctg attccaaca aaccagaatt gatgagccca accaacgtgc aacaaagatg 3060
ctgggaagtg gtatggaaga cgcaaaaaac ataagaaag gcccggcgc atctatcct 3120

ctagaggatg gaaccgctgg agagcaactg cataaggcta tgaagagata cgcctggtt 3180
cctggaaca ttgcttttac agatgcacat atcgagtgat acatcacgta cgcggaatac 3240
ttcgaatgt ccgttcggtt ggcagaagct atgaaacgat atgggctgaa tacaatcac 3300
agaatcgtcg tatgcagtga aaactctctt caattcttta tgccggtgtt gggcgcgtta 3360
tttatcggag ttgcagttgc gcccgcgaac gacatttata atgaactgta attgctcaac 3420
agtatgaaca tticgcagcc taccgtagt tttgtttcca aaaaggggtt gcaaaaaatt 3480
ttgaactgc aaaaaaatt accaataatc cagaaaatta ttatcatgga ttctaaaacg 3540

gattaccagg gatttcagtc gatgtacacg ttcgtcacat ctcatctacc tcccggtttt 3600
aatgaatacg attttgtagc agagtccttt gatcgtgaca aaacaattgc actgataatg 3660
aatcctctg gatctactgg gttacctaag ggtgtggccc ttccgcatag aactgcctgc 3720
gtcagattct cgcatgccag agatcctatt ttggcaatc aaatcattcc ggatactgcg 3780
atTTAAGTg ttgttcatt ccatcacggt ttggaatgt ttactacact cggatatttg 3840
atatgtggat ttcgagtcgt cttaatgtat agatttgaag aagagctgtt ttacgatcc 3900
cttcaggatt acaaaattca aagtgcgttg ctagtaccaa ccctattttc attcttcgcc 3960

aaaagcactc tgattgacaa atacgattta tctaatttac acgaaattgc ttctgggggc 4020
gcacctcttt cgaagaagt cggggaagcg gttgcaaac gttccatct tccagggata 4080
cgacaaggat atgggctcac tgagactaca tcagctattc tgattacacc cgagggggat 4140
gataaacggg gcgcggtcgg taaagtgtt ccattttttg aagcgaaggt tgtggatctg 4200
gataccggga aaacgctggg cgTTaatcag agaggcgaat tatgtgtcag aggacctatg 4260
attatgtccg gttatgtaaa caatccgga gcgaccaacg ctttgattga caaggatgga 4320
tggtacatt ctggagacat agcttactgg gacgaagacg aacacttctt catagttgac 4380

cgcttgaagt ctttaattaa atacaaagga taccaggtgg cccccgctga attggaatcg 4440
atattgttac aacaccccaa catcttcgac gcgggcgtgg caggtcttcc cgacgatgac 4500
gccggtgaac ttcccgcgcg cgttgtgtt ttggagcacg gaaagacgat gacggaaaaa 4560
gagatcgtgg attacgtgc cagtcaagta acaaccgca aaaagtgtcg cggaggagtt 4620
gtgtttgtgg acgaagtacc gaaaggtctt accgaaaaac tcgacgcaag aaaaatcaga 4680
gagatcctca taaaggccaa gaaggcgga aagtccaaat tg 4722

<210> 2
<211> 1574
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein

<400> 2

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

Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly
 50 55 60
 Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Val Pro Gly Tyr
 65 70 75 80
 Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile
 85 90 95
 Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val
 100 105 110
 Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly
 115 120 125
 Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala
 130 135 140
 Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp
 145 150 155 160
 Met His Ile Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Ile Ala Thr Leu Tyr Thr
 165 170 175
 Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu
 180 185 190
 Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser
 195 200 205
 His Pro Ala Val Ala Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr
 210 215 220
 Gln Lys Pro Trp Leu Gly Thr Val Asp Ser Ser Glu Val Tyr Ser Trp
 225 230 235 240
 Leu Asp Ser Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala
 245 250 255
 Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val
 260 265 270
 Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Ile Pro Ala
 275 280 285
 Ile Leu Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala

290 295 300
 Tyr Gly Leu Pro Asp Pro Lys Thr Thr Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu
 305 310 315 320
 Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly
 325 330 335
 Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile

 340 345 350
 Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe
 355 360 365
 Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr
 370 375 380
 Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys
 385 390 395 400
 Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Val
 405 410 415

 Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Val Lys Gly Thr Asn Thr
 420 425 430
 Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Val Ser Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr
 435 440 445
 Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly
 450 455 460
 Tyr Tyr Pro Asp Asp Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Pro Phe Lys
 465 470 475 480
 Thr Leu Ala Met Val Thr Ser Phe Leu Thr Asn Ile Cys Ile Ser Tyr

 485 490 495
 Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp
 500 505 510
 Val Phe Asp Ala Val Val Ala Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys
 515 520 525
 Thr Ile Leu Val Lys Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asp Glu Leu Ala Leu
 530 535 540
 Val Lys Pro Arg Gln Ser Met Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys

Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu

1060 1065 1070

Val Asn Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala

1075 1080 1085

Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val

1090 1095 1100

Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu

1105 1110 1115 1120

Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg

1125 1130 1135

Glu Leu Leu Asn Ser Met Asn Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val

1140 1145 1150

Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro

1155 1160 1165

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

1170 1175 1180

Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe

1185 1190 1195 1200

Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile

1205 1210 1215

Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val

1220 1225 1230

Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp

1235 1240 1245

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

1250 1255 1260

Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu

1265 1270 1275 1280

Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu

1285 1290 1295

Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val

1300 1305 1310
 Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr
 1315 1320 1325
 Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser
 1330 1335 1340
 Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile

 1345 1350 1355 1360
 Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr
 1365 1370 1375
 Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe
 1380 1385 1390
 Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val
 1395 1400 1405
 Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly
 1410 1415 1420

 Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly
 1425 1430 1435 1440
 Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe
 1445 1450 1455
 Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
 1460 1465 1470
 Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
 1475 1480 1485
 Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Ala Gly Glu Leu

 1490 1495 1500
 Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys
 1505 1510 1515 1520
 Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu
 1525 1530 1535
 Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
 1540 1545 1550
 Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys

1555

1560

1565

Gly Gly Lys Ser Lys Leu

1570

<210> 3

<211> 3729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H1R-SNAP-Luc

<400> 3

```

atgagcctcc ccaattcctc ctgcctctta gaagacaaga tgtgtgaggg caacaagacc      60
actatggcca gccccagct gatgccctg gtggtgtgctc tgagcactat ctgcttggtc      120
acagtagggc tcaacctgct ggtgctgtat gccgtacgga gtgagcggaa gctccacact      180
gtggggaacc tgtacatcgt cagcctctcg gtggcggact tgatcgtggg tgccgtcgtc      240
atgcctatga acatcctcta cctgctcatg tccaagtggg cactgggccc tectctctgc      300

ctcttttggc ttccatgga ctatgtggcc agcacagcgt ccattttcag tgtcttcac      360
ctgtgcattg atcgctaccg ctctgtccag cagcccctca ggtaccttaa gtatcgtacc      420
aagaccggag cctcggccac cattctgggg gctggtttc tctcttttct gtgggttatt      480
cccattctag gctggaatca cttcatgcag cagacctcgg tgcgcccaga ggacaagtgt      540
gagacagact tctatgatgt cacctggttc aaggtcatga ctgccatcat caacttctac      600
ctgcccacct tgctcatgct ctggttctat gccaagatct acaaggccgt acgacaacac      660
tgccagcacc gggagctcat caataggtcc ctcccttct tctcagaaat taagctgagg      720

ccagagaacc ccaaggggga tgccaagaaa ccagggaagg agtctccctg ggaggttctg      780
aaaaggaagc caaaagatgc tgggtgtgga tctgtcttga agtcaccatc ccaaaccccc      840
aaggagatga aatccccagt tgtcttcagc caagaggatg atagagaagt agacaaactc      900
tactgcttte cacttgatat tgtgcacatg caggctgcgg cagaggggag tagcagggac      960
tatgtagccg tcaaccggag ccatggccag ctcaagacag atgagcaggg cctgaacaca      1020
catggggcca gcgagatata agaggatcag atgttaggtg atagccaatc cttctctcga      1080
acggactcag ataccaccac agagacagca ccaggcaaag gcaaattgag gagtgggtct      1140

aacacaggcc tggattacat caagtttact tggaagaggc tccgctcgca ttcaagacag      1200
tatgtatctg ggttgcacat gaaccgcaa aggaaggccc ccaaacagtt gggttttate      1260
atggcagcct tcactctctg ctggatccct tatttcatct tcttcatggt cattgccttc      1320

```

tgcaagaact gttgcaatga acatttgcac atgttcacca tctggctggg ctacatcaac 1380
 tccacactga accccctcat ctacccttg tgcaatgaga acttcaagaa gacattcaag 1440
 agaattctgc atattcgctc catggccgaa gacgcagaca tgcgcaatga gctggaggag 1500
 atgcagcgaa gggctgacca gttggctgat gagtgcctgg aaagcacccg tcgtatgctg 1560

 caactggttg aagagagtaa agatgctggt atcaggactt tggttatggt ggatgaacaa 1620
 ggagaacaac tggaacgcat tgaggaaggg atggaccaa tcaataagga catgaaagaa 1680
 gcagaaaaga atttgacgga cctaggaaaa tctgcgggc tttgtgtgtg tcctgtaac 1740
 aagcttaaat caagtgatgc ttacaaaaa gcctggggca ataacagga cggagtggg 1800
 gccagccagc ctgctcgtg agtggacgaa cgggagcaga tggccatcag tggcggcttc 1860
 atccgaggg taacaaatga tgcccagaa aatgaaatgg atgaaaacct agagcaggtg 1920
 agcggcatca tcgggaacct ccgtcacatg gccctggata tgggcaatga gatcgataca 1980

 cagaatcgcc agatcgacag gatcatggag aaggctgatt ccaacaaaac cagaattgat 2040
 gaggccaacc aacgtgcaac aaagatgctg ggaagtggta tggaagacgc caaaaacata 2100
 aagaaaggcc cggcgcatt ctatctcta gaggatggaa ccgctggaga gcaactgcat 2160
 aaggctatga agagatacgc cctggttctt ggaacaattg cttttacaga tgcacatc 2220
 gaggtgaaca tcacgtacgc ggaatacttc gaaatgtccg ttcggttggc agaagctatg 2280
 aaacgatatg ggctgaatac aaatcacaga atcgctgat gcagtgaaaa ctctcttcaa 2340
 ttctttatgc cgggtgtggg cgcgttattt atcggagtgg cagttgcgcc cgcgaacgac 2400

 atttataatg aacgtgaatt gctcaacagt atgaacattt cgcagcctac cgtagtgttt 2460
 gtttcaaaa aggggttgca aaaaattttg aacgtgcaaa aaaaattacc aataatccag 2520
 aaaattatta tcatggattc taaaacggat taccagggat ttcagtcgat gtacacgttc 2580
 gtcacatctc atctacctc cggttttaat gaatacagat ttgtaccaga gtcctttgat 2640
 cgtgacaaaa caattgcaat gataatgaat tcctctggat ctactgggtt acctaagggt 2700
 gtggcccttc cgcatagaac tgctgcgtc agattctgc atgccagaga tcctattttt 2760
 ggcaatcaaa tcattccgga tactgcgatt ttaagtgtg ttccattcca tcacggtttt 2820

 ggaatgttta ctacactcg atatttgata tftggatttc gagtctctt aatgtataga 2880
 tttgaagaag agctgttttt acgatccctt caggattaca aaattcaaag tgcgttgcta 2940
 gtaccaacc tattttcatt cttcgcaaaa agcactctga ttgacaaata cgatttatct 3000
 aatttacacg aaattgcttc tggggcgca cctctttcga aagaagtcgg ggaagcgggt 3060
 gcaaaacgct tccatcttc agggatacga caaggatatg ggctcactga gactacatca 3120
 gctattctga ttacaccga ggggatgat aaaccggcg cggctcgtaa agttgttcca 3180

tttttgaag cgaaggttgt ggatctggat accgggaaaa cgctggcgt taatcagaga 3240

 ggccaattat gtgicagagg acctatgatt atgtccggtt atgtaacaa tccggaagcg 3300
 accaacgcct tgattgacaa ggatggatgg ctacattctg gagacatagc ttactgggac 3360
 gaagacgaac acttcttcat agttgaccgc ttgaagtctt taattaaata caaaggatat 3420
 caggtggccc ccgctgaatt ggaatcgata ttgttacaac accccaacat cttcgacgcg 3480
 ggcggtggcag gtcttcccga cgatgacgcc ggtgaacttc ccgcgccgt tgttgttttg 3540
 gagcacggaa agacgatgac ggaaaaagag atcgtggatt acgtgccag tcaagtaaca 3600
 accgcgaaaa agttgcgcgg aggagtgtg tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc 3660

 ggaaaactcg acgcaagaaa aatcagagag atcctcataa aggccaagaa gggcggaaag 3720
 tccaaattg 3729

<210> 4
 <211> 1243
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> fusion protein
 <400> 4

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

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

 100 105 110
 Ala Ser Ile Phe Ser Val Phe Ile Leu Cys Ile Asp Arg Tyr Arg Ser

Arg Asp Lys Thr Ile Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly
 885 890 895

Leu Pro Lys Gly Val Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe
 900 905 910

Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr
 915 920 925

Ala Ile Leu Ser Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr
 930 935 940

Thr Leu Gly Tyr Leu Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg
 945 950 955 960

Phe Glu Glu Glu Leu Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln
 965 970 975

Ser Ala Leu Leu Val Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr
 980 985 990

Leu Ile Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly
 995 1000 1005

Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe
 1010 1015 1020

His Leu Pro Gly Ile Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser
 1025 1030 1035 1040

Ala Ile Leu Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly
 1045 1050 1055

Lys Val Val Pro Phe Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly
 1060 1065 1070

Lys Thr Leu Gly Val Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro
 1075 1080 1085

Met Ile Met Ser Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu
 1090 1095 1100

Ile Asp Lys Asp Gly Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp
 1105 1110 1115 1120

Glu Asp Glu His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys

1125 1130 1135
 Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu
 1140 1145 1150
 Gln His Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp
 1155 1160 1165
 Asp Ala Gly Glu Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys
 1170 1175 1180

Thr Met Thr Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr
 1185 1190 1195 1200
 Thr Ala Lys Lys Leu Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro
 1205 1210 1215
 Lys Gly Leu Thr Gly Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu
 1220 1225 1230
 Ile Lys Ala Lys Lys Gly Gly Lys Ser Lys Leu
 1235 1240

<210> 5
 <211> 4767
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> cloning construct
 <400> 5

gcgtttaaac ttaagctatg gctttccatg tggaaggact gatagctatc atcgtgttct 60
 accttctaatt ttigtctggtt ggaatatggg ctgcctggag aaccaaaaac agtggcagcg 120
 cagaagagcg cagcgaagcc atcatagttg gtggccgaga tattggttta ttggttggtg 180
 gatttaccat gacagctacc tgggtcggag gagggtatat caatggcaca gctgaagcag 240
 tttatgtacc aggttatggc cttagcttggg ctgaggcacc aattggatat tctcttagtc 300
 tgattttagg tggcctgttc tttgcaaac ctatgcgttc aaaggggtat gtgaccatgt 360

 tagaccggtt tcagcaaatc tatggaaaac gcattggcgg actcctgttt attcctgcac 420
 tgatgggaga aatgttctgg gctgcagcaa ttttctctgc tttgggagcc accatcagcg 480
 tgatcatcga tgtggatatg cacatttctg tcatcatctc tgcactcatt gccactctgt 540
 acacactggt gggagggtctc tattctgtgg cctacactga tgtcgttcag ctcttttgca 600
 tttttgtagg gctgtggatc agcgtcccct ttgcattgtc acatcctgca gtcgcagaca 660

tcgggttcac tgctgtgcat gccaaatacc aaaagccgtg gctgggaact gttgactcat 720
ctgaagtcta ctcttggctt gatagttttc tgttgttgat gctgggtgga atcccatggc 780

aagcatactt tcagagggtt ctctcttctt cctcagecac ctatgctcaa gtgctgtcct 840
tcctggcagc tttcgggtgc ctggatgatg ccatcccagc catactcatt ggggccattg 900
gagcatcaac agactggaac cagactgcat atgggcttcc agatcccaag actacagaag 960
aggcagacat gattttacca attgttctgc agtatctctg ccctgtgtat atttcttctt 1020
ttggtcttgg tgcagtttct gctgctgtta tgcacacagc agattcttcc atcttgcag 1080
caagtccat gtttgcacgg aacatctacc agctttcctt cagacaaaat gcttcggaca 1140
aagaaatcgt ttgggttatg cgaatcacag tgtttgtgtt tggagcatct gcaacagcca 1200

tggccttgct gacgaaaact gtgtatgggc tctggtacct cagtctgac ctgtttaca 1260
tcgttatctt cccccagctg ctttgtgtac tctttgttaa gggaaccaac acctatgggg 1320
ccgtggcagg ttatgtttct ggcctcttcc tgagaataac tggaggggag ccatactgt 1380
atcttcagcc ctgtatcttcc taccctggct attacctga tgataatggt atatataatc 1440
agaaatttcc atttaaaaca cttgccatgg ttacatcatt cttaaccaac atttgcactt 1500
cctatctagc caagtatcta tttgaaagtg gaaccttgcc acctaaatta gatgatattg 1560
atgctgttgt tgcaagacac agtgaagaaa acatggataa gacaattctt gtcaaaaatg 1620

aaaatattaa attagatgaa cttgcacttg tgaagccacg acagagcatg acctcagct 1680
caactttcac caataaagag gccttccttg atgttgattc cagtcagaa gggcttggga 1740
ctgaagataa ttacagatg agtaaaggag aagaactttt cactggagt gtcccaattc 1800
ttgttgaatt agatggtgat gttaatgggc acaaatttc tgtcagtgga gagggigaag 1860
gtgatgcaac atacgaaaaa cttaccctta aatttattg cactactgga aaactacctg 1920
ttccatggcc aacacttgc actactttct cttatggtgt tcaatgcttt tcaagatacc 1980
cagatcatal gaaacagcat gactttttca agagtgccat gcccgaaggt tatgtacagg 2040

aaagaactat atttttcaaa gatgacggga actacaagac acgtgctgaa gtcaagtttg 2100
aaggtgatac cctgtttaat agaatcgagt taaaaggtat tgattttaaa gaagatggaa 2160
acattcttgg acacaaattg gaatacaact ataactcaca caatgtatac atcatggcag 2220
acaaacaaaa gaatggaatc aaagttaact tcaaaattag acacaacatt gaagatggaa 2280
gcgttcaact agcagacat tatcaacaaa atactccaat tggcgatggc cctgtccttt 2340
taccagacaa ccattacctg tccacacaat ctgcccttc gaaagatccc aacgaaaaga 2400

gagaccacat ggccttctt gagttttaa cagctgctgg gattacacat ggcattgatg 2460

aactatacaa aatggccgaa gacgcagaca tgcgcaatga gctggaggag atgcagcgaa 2520

gggctgacca gttggctgat gagtcgctgg aaagcacccg tcgtatgctg caactggttg 2580

aagagagtaa agatgctggt atcaggactt tggttatggt ggatgaacaa ggagaacaac 2640

tggaacgcat tgaggaagg atggaccaa tcaataagga catgaaagaa gcagaaaaga 2700

atttgacgga cctaggaaaa ttctcgggac tttgtgtgtg tccctgtaac aagcttaaat 2760

caagtgatgc ttacaaaaa gcctggggca ataatacagga cggagtgggt gccagccagc 2820

ctgctcgtgt agtggacgaa cgggagcaga tggccatcag tggcggcttc atccgcaggg 2880

taacaaatga tgcccagaaa aatgaaatgg atgaaaacct agagcagggt agcggcatca 2940

tcgggaacct ccgtcacatg gccctggata tggcaatga gatcgataca cagaatcgcc 3000

agatcgacag gatcatggag aaggtgat ccaacaaaac cagaattgat gaggccaacc 3060

aacgtgcaac aaagatgctg ggaagtggt tggaaagacg caaaaacata aagaaaggcc 3120

cggcgccatt ctatctcta gaggatgga cgcctggaga gcaactgcat aaggctatga 3180

agagatagc cctggttctt ggaacaattg cttttacaga tgcacatc gaggtgaaca 3240

tcacgtacgc ggaatacttc gaaatgtccg ttcggttggc agaagctatg aaacgatatg 3300

ggctgaatac aaatcacaga atcgtcgtat gcagtgaaaa ctctcttcaa ttctttatgc 3360

cgggtgtggg cgcgttatct atcggagtgg cagttgccc cgcgaacgac atttataatg 3420

aacgtgaatt gctcaacagt atgaacattt cgcagcctac cgtagtgttt gtttcaaaa 3480

aggggttgca aaaaatttg aacgtgcaaa aaaaattacc aataatccag aaaattatta 3540

tcatggattc taaaacggat taccagggat ttcagtcgat gtacacgttc gtcacatctc 3600

atctacctcc cggttttat gaatacagat ttgtaccaga gtcctttgat cgtgacaaaa 3660

caattgcact gataatgaat tcctctggat ctactgggtt acctagggt gtggcccttc 3720

cgcatagaac tgctgcgtc agattctcgc atgccagaga tcctatttt ggcaatcaaa 3780

tcattccgga tactgcgatt ttaagtgtt tccattcca tcacggtttt ggaatgttta 3840

ctacactcgg atatttgata tgtggatttc gagtcgtctt aatgtataga ttgagaag 3900

agctgtttt acgatccct caggattaca aaattcaaag tgcgttgcta gtaccaacc 3960

tattttcatt ctccgcaaaa agcactctga ttgacaaata cgatttatct aatttacag 4020

aaattgcttc tggggcgca cctctttcga aagaagtcgg ggaagcgtt gcaaacgct 4080

tccatcttc agggatacga caaggatat ggctcactga gactacatca gctattctga 4140

ttacaccga ggggatgat aaaccggcg cgtcggtaa agttgttcca tttttgaag	4200
cgaagttgt ggatctggat accgggaaaa cgtgggcgt taatcagaga gccaattat	4260
gtgtcagagg acctatgatt atgtccggtt atgtaaaca tccggaagcg accaacgcct	4320
tgattgaaa ggatggatgg ctacattctg gagacatagc ttactgggac gaagacgaac	4380
acttcttcat agttgaccgc ttgaagtctt taattaata caaaggatat caggtggccc	4440
ccgtgaatt ggaatcgata ttgttacaac accccaacat cttcgacgcg ggcgtggcag	4500
gtcttcccga cgatgacgcc ggtgaacttc ccgcccgct tgttgtttg gagcacgaa	4560
agacgatgac ggaaaaagag atcgtggatt acgtgccag tcaagtaaca accgcgaaaa	4620
agttgcgcg aggagtttg tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc ggaaaactcg	4680
acgaagaaa aatcagagag atcctcataa aggccaagaa gggcggaaag tccaaattgt	4740
agctcgagtc tagagggcc gtttaaa	4767