



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0107926
 (43) 공개일자 2012년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/08 (2006.01) *C07K 14/33* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7006552
 (22) 출원일자(국제) 2010년08월13일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2012년03월13일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/045516
 (87) 국제공개번호 WO 2011/020052
 국제공개일자 2011년02월17일
 (30) 우선권주장
 61/233,930 2009년08월14일 미국(US)

(71) 출원인
알러간, 인코포레이티드
 미합중국92612
 캘리포니아얼바인두폰트드라이브2525
 (72) 발명자
재키, 버짓, 피., 에스.
 미합중국 캘리포니아주 92617, 롱 비치, 이. 5번
 스트리트 4112
가라이, 패튼, 이.
 미합중국 캘리포니아주 90808, 롱 비치, 이. 패전
 트리 스트리트 5503
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
최경준

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **오피오이드 대표적화된 엔드펩티다아제를 사용하여 암을 치료하는 방법**

(57) 요약

본 명세서는 TVEMP, 그와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물 및 그와 같은 TVEMP 조성물을 사용하여 포유동물의 암을 치료하는 방법을 개시한다.

(72) 발명자

폴리나, 야니라

미합중국 캘리포니아주 92780, 투스틴, 힐스보로
플레이스 14781

스타썬키스, 딘, 지.

미합중국 캘리포니아주 92614, 얼바인, 스위트
600, 메인 스트리트 1900

프란시스, 조셉

미합중국 캘리포니아주 92656, 알리소 비에조, 라
미라지 씨티. 45

아오키, 케이, 로저

미합중국 캘리포니아주 92679, 코토 데 카자, 진저
릴리 코트 2

페르난데즈-살라스, 에스터

미합중국 캘리포니아주 92831, 풀러튼, 록키 로드
1710

헌트, 테렌스 제이.

미합중국 캘리포니아주 92882, 코로나, 이. 패트리
어트 웨이 2262

간샤니, 산지브

미합중국 캘리포니아주 92603, 얼비, 로즈 트렐리
스 20

스튜워드, 랜스, 이.

미합중국 캘리포니아주 92614, 얼바인, 스위트 레
인 35

특허청구의 범위

청구항 1

치료가 필요한 포유동물에게 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 및 외인성 프로테아제 절단 부위를 포함하는 TVEMP를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 포유동물의 암의 치료 방법으로서, 상기 조성물의 투여는 암과 연관된 증상을 감소시키는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 TVEMP는 1) 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 표적화 도메인, 2) 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 3) 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 4) 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 5) 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 효소 도메인 및 표적화 도메인, 또는 6) 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 표적화 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인의 순서로 선형 아미노-대-카복실 단일 폴리펩타이드를 포함하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 표적화 도메인은 오피오이드 펩타이드 표적화 도메인인 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 오피오이드 펩타이드 표적화 도메인은 엔케팔린, 소 부신수질-22 (BAM22) 펩타이드, 엔도모르핀, 엔도르핀, 다이노르핀, 노시셉틴, 또는 헤모르핀인 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 엔케팔린 펩타이드 표적화 도메인은 Leu-엔케팔린, Met-엔케팔린, Met-엔케팔린 MRGL, 또는 Met-엔케팔린 MRF인 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 엔케팔린 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 84, 또는 서열번호: 85를 포함하는 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐암, 신경모세포종, 또는 크롬친화세포종인 방법.

청구항 8

청구항 4에 있어서, 상기 소 부신수질-22 펩타이드 표적화 도메인은 BAM22 펩타이드 표적화 도메인은 BAM22 펩타이드 (1-12), BAM22 펩타이드 (6-22), BAM22 펩타이드 (8-22), 또는 BAM22 펩타이드 (1-22)를 포함하는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 소 부신수질-22 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 86의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 87의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 88의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 89의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 90의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22, 또는 서열번호: 91의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22를 포함하는 방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암, 만성 골수성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수성, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐 암종, 신경모세포종, 위암, 결장암, 악성 흑색종, 교모세포종, 구강 편평세포암종, 간암, 크롬친화세포종, 또는 기형암종인 방법.

청구항 11

청구항 4에 있어서, 상기 엔도모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 엔도모르핀-1 또는 엔도모르핀-2인 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 엔도모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 92 또는 서열번호: 93을 포함하는 방법.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암, 만성 골수성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수성, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐 암종, 신경모세포종, 위암, 결장암, 악성 흑색종, 교모세포종, 구강 편평세포암종, 간암, 또는 기형암종인 방법.

청구항 14

청구항 4에 있어서, 상기 엔도르핀 펩타이드 표적화 도메인은 엔도르핀- α , 네오엔도르핀- α , 엔도르핀- β , 네오엔도르핀- β , 또는 엔도르핀- γ 인 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 엔도르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 94, 서열번호: 95, 서열번호: 96, 서열번호: 97, 서열번호: 98, 또는 서열번호: 99을 포함하는 방법.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암, 만성 골수성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수성, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐 암종, 신경모세포종, 위암, 결장암, 악성 흑색종, 교모세포종, 구강 편평세포암종, 간암, 크롬친화세포종, 또는 기형암종인 방법.

청구항 17

청구항 4에 있어서, 상기 다이노르핀 펩타이드 표적화 도메인은 다이노르핀 A, 다이노르핀 B (류모르핀), 또는 리모르핀인 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 다이노르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 100, 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 104, 서열번호: 105, 서열번호: 106, 서열번호: 107, 서열번호: 108, 서열번호: 109, 서열번호: 110, 서열번호: 111, 서열번호: 112, 서열번호: 113, 서열번호: 114, 서열번호: 115, 서열번호: 116, 서열번호: 117, 서열번호: 118, 서열번호: 119, 서열번호: 120, 서열번호: 121, 서열번호: 122, 서열번호: 123, 서열번호: 124, 서열번호: 125, 서열번호: 126, 서열번호: 127, 서열번호: 128, 서열번호: 129, 또는 서열번호: 130을 포함하는 방법.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암, 만성 골수성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 림프종, 다발성 골수성, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐 암종, 비인두 암종, 신경모세포종, 위암, 결장암, 악성 흑색종, 교모세포종, 구강 편평세포암종, 간암, 크롬친화세포종, 또는 기형암종인 방법.

청구항 20

청구항 4에 있어서, 상기 노시셉틴 펩타이드 표적화 도메인은 노시셉틴 RK, 노시셉틴, 뉴로펩타이드 1, 뉴로펩

타이드 2, 또는 뉴로펩타이드 3인 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 노시셉틴 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 131, 서열번호: 132, 서열번호: 133, 서열번호: 134, 서열번호: 135, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140을 포함하는 방법.

청구항 22

청구항 20에 있어서, 상기 암은 폐 암종 및 폐 선종인 방법.

청구항 23

청구항 4에 있어서, 상기 헤모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 LVVH7, VVH7, VH7, H7, LVVH6, LVVH5, VVH5, LVVH4, 및 LVVH3인 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 헤모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 141, 서열번호: 142, 서열번호: 143, 서열번호: 144, 서열번호: 145, 서열번호: 146, 서열번호: 147, 서열번호: 148, 또는 서열번호: 149을 포함하는 방법.

청구항 25

청구항 23에 있어서, 상기 암은 폐 암종 또는 고환 암종인 방법.

청구항 26

청구항 1에 있어서, 상기 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BoNT/A 전위 도메인, BoNT/B 전위 도메인, BoNT/C1 전위 도메인, BoNT/D 전위 도메인, BoNT/E 전위 도메인, BoNT/F 전위 도메인, BoNT/G 전위 도메인, TeNT 전위 도메인, BaNT 전위 도메인, 또는 BuNT 전위 도메인인 방법.

청구항 27

청구항 1에 있어서, 상기 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BoNT/A 효소 도메인, BoNT/B 효소 도메인, BoNT/C1 효소 도메인, BoNT/D 효소 도메인, BoNT/E 효소 도메인, BoNT/F 효소 도메인, BoNT/G 효소 도메인, TeNT 효소 도메인, BaNT 효소 도메인, 또는 BuNT 효소 도메인인 방법.

청구항 28

청구항 1에 있어서, 상기 외인성 프로테아제 절단 부위는 식물 파파인 절단 부위, 곤충 파파인 절단 부위, 갑각류 파파인 절단 부위, 엔테로키나아제 절단 부위, 인간 라이노바이러스 3C 프로테아제 절단 부위, 인간 엔테로바이러스 3C 프로테아제 절단 부위, 담배 식각 바이러스 프로테아제 절단 부위, 담배 엽맥 모틀 (Tobacco Vein Mottling) 바이러스 절단 부위, 서브틸리신(subtilisin) 절단 부위, 히드록실아민 절단 부위, 또는 카스파제 (Caspase) 3 절단 부위인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 특허출원은 35 U.S.C. § 119(e)에 따라 미국 가특허출원 시리즈 번호 61/233,930 (2009년 8월 14일 출원)에 대한 우선권을 주장하며, 상기 출원은 그 전체가 참고로 통합되어 있다.

배경기술

[0002] 암은 세포군이 제어되지 않는 성장(정상 한계를 벗어난 세포 분열)을 나타내는 100여개를 초과하는 질환군이다. 대부분의 경우에 있어서, 암 세포는 종양이라고 불리는 세포 덩어리를 형성하지만, 백혈병과 같은 일부 암에서

는 세포가 종양을 형성하지 않는다. 종양은 전이성 또는 양성일 수 있다. 게다가 전이성 종양(또는 암)은 비정상적 유전 물질을 갖는 세포를 포함하며, 통상 급격한 제어되지 않는 세포 성장을 하여 인접 조직을 침습하고 파괴하며, 때때로 림프 또는 혈액을 통해 신체 내의 다른 위치로 퍼진다(즉 전이). 신체에 걸친 암 세포의 침습 및 전이가 중단되지 않는 경우 암 세포가 필수 기관을 침습하여 기관의 기능 장애 및 궁극적으로 사망을 일으킬 것이므로, 암은 고빈도의 사망물에 연관된다. 암의 전이성 특성은 통상 느리게 자라고 스스로 제한되며 침습 또는 전이하지 않아서 일반적으로 생명을 위협하지 않는 양성 종양과 구별된다. 국소, 지역 또는 원거리 단계에서의 암은 침습성인 것으로 간주된다. 원 위치 암으로 불리는 매우 적은 세포층에서만 발견되는 조기 암은 비침습성인 것으로 간주된다.

[0003] 암은 이들의 원인 및 생리가 크게 다른 다양한 질환군이다. 암은 단독으로 또는 조합으로 작용하는 다양한 요인에 의해 야기된다. 일부 암은 담배, 식이, 특정 화학물질, 방사선 및 바이러스와 같은 외인성 요인에 의해 야기된다. 다른 암은 호르몬, 면역 상태, 및 유전된 유전적 돌연변이와 같은 내인성 요인에 의해 야기된다. 통상 암을 일으키는 요인으로서의 노출과 질환의 검출 사이에는 10년 이상이 소요된다.

[0004] 암은 일반적으로 종양과 닮은 세포 유형, 따라서 종양의 기원으로 추정되는 조직에 의해 분류된다. 암종은 상피 세포에서 유래하는 전이성 종양이다. 이 군이 일반적인 형태의 유방암, 전립선암, 폐암 및 결장암을 포함하는 가장 일반적인 암을 나타낸다. 육종은 연결 조직, 또는 간엽 세포에서 유래하는 전이성 종양이다. 모세포종은 통상 미성숙 또는 태아 조직과 닮은 전이성 종양이다. 이들 종양의 다수는 어린이에서 가장 일반적이다. 림프종 및 백혈병은 조혈(혈액-형성) 세포에서 유래하는 전이암이다. 마지막으로 배엽 세포 종양은 전능 세포에서 유래하는 종양이다. 성인에서는 정소 및 난소에서 가장 자주 발견되며; 태아, 유아 및 영아에서는 신체 중심선, 특히 꼬리뼈 말단에서 가장 자주 발견된다.

[0005] 암은 1998년에 1,228,600건의 신규 사례와 564,800건의 사망률을 가진 미국에서 2번째로 높은 사망 원인이다. 지난 50년간, 흡연으로 인한 폐암 사망률의 큰 증가를 주원인으로 하여 암으로 인한 사망률은 계속 증가해 왔다. 암은 전 연령 계층에서 발생하지만, 그 발생률은 45세 초과 인구에서 크게 증가한다. 그러나 암은 35 내지 65세 인구에 대해 미국 내의 주요 사망 원인이며, 또한 15세 미만 미국 어린이 가운데 비사고 사망의 주요 원인이기도 하다. 남성이 여성 보다 암으로 인한 사망률이 높고, 흑인이 주요 인종군 가운데 가장 높은 암 사망률을 갖는다. 미국에서, 남성은 일생 중 약 1/2의 암 발생 위험성을 가지며 여성은 일생 중 약 1/3의 위험성을 갖는다. 심장병 및 뇌졸중으로 인한 사망의 지속되는 감소를 예상컨대, 암이 2010년쯤에는 전체 미국인 인구의 전체적으로 가장 높은 사망 원인이 될 것이다.

[0006] 암의 진단에는 통상 병리학자에 의한 조직 생검 표본의 조직학적 검사가 필요하지만, 전이성의 최초 표시는 증상 또는 방사선 이미지의 비정상성일 수 있다. 일단 진단되면, 암은 보통 수술, 화학치료법, 방사선치료법, 또는 면역치료법, 호르몬 치료법, 또는 혈관신생 저해제 치료법과 같은 표적화 치료법으로 치료한다. 치료법의 선택은 종양의 위치 및 등급 그리고 질환 단계 뿐만 아니라 환자의 일반 상태(수행 상태)에 의존한다. 또한 암의 유형 및 단계에 따라, 2개 이상의 암 치료 유형을 동시에 조합하거나 또는 차례로 이용할 수 있다. 신체의 나머지 지에 손상 없는 암의 전체적 제거가 치료 목표임에도, 암을 치료하는 현재의 접근법은 제한된 성공만을 거두고 있다. 수술에 관해, 이는 부분적으로 개별 또는 소수의 암 세포가 인접 조직을 침습하거나 다른 부위로 전이하여 국소 수술 치료의 유효성을 제한하는 경향성에 기인한다. 화학치료법 및 방사선치료법의 유효성은 종종 신체 내 정상 조직의 손상 또는 독성에 의해 제한된다. 이들의 이름에서 시사되는 바와 같이 표적화 치료법을 기대할 수 있으나, 이들 치료는 통상 하나의 특정 암 유형에 특이적이다. 따라서 모든 암 세포를 이들의 위치와 무관하게 표적화할 수 있는 화합물 및 방법이 암 치료를 위해 매우 바람직할 것이다. 또한 현재 표적화 치료법이 없는 특정 유형의 암을 표적화할 수 있는 화합물 및 방법이 또한 매우 바람직할 것이다.

[0007] 클로스트리듐의 독소, 예컨대 보툴리눔 신경독소(BoNT), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F 및 BoNT/G, 및 테타누스 신경독소(TeNT)의 신경신호 전달을 저해하는 능력은 광범위한 치료 및 화장 용도로 개발되었다(예로 William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of BOTULINUM Toxin(Slack, Inc., 2004)을 참고하라). 약제학적 조성물로 시판되는 클로스트리듐의 독소에는 BoNT/A 제조물, 예컨대 BOTOX®(Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®(Beaufour Ipsen, Porton Down, England), NEURONOX®(Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, South Korea), BTX-A(Lanzhou Institute Biological Products, China) 및 XEOMIN®(Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Germany); 및 BoNT/B 제조물, 예컨대 MYOBLOC™/NEUROBLOC™(Solstice Neurosciences, Inc. San Francisco, CA)이 포함된다. 예로서, BOTOX®는 현재 하기 적응증들에 대해 하나 이

상의 국가에서 허가되어 있다: 이완불능, 성인성 강직, 항문 열창, 요통, 안검연축, 이갈기, 경부근 긴장이상증, 본태떨림, 미간선 또는 운동과다 안면선, 두통, 반얼굴연축, 방광의 과다활동, 다한증, 소아 뇌성 마비, 다발성 경화증, 근클로누스 장애, 비순선, 연축발성 장애, 사시 및 VII 신경 장애.

[0008] 클로스트리듐 독소 처리는 신경전달물질을 시냅스 틈새 내로 분비하는데 이용되는 세포외 배출 절차를 손상시켜 신경전달물질 방출을 저해한다. 이 손상은 궁극적으로 세포외 배출 절차에 필수적인 SNARE 단백질을 절단하는 효소 도메인을 포함하는 클로스트리듐 독소 경쇄의 세포내 전달로 달성된다. 약학 산업에서는 클로스트리듐 독소 치료법의 용도를 그 현재의 근이완제 용도를 넘어서 다른 병, 예컨대 다양한 종류의 만성 통증, 신경성 염증 및 비노생식기 장애와 같은 감각 신경 기반 병 뿐만 아니라 비-신경 기반 장애, 예컨대 체장염 및 암의 치료로 확대하기를 강력히 희망하고 있다. 클로스트리듐 독소-기반 치료법을 확대하려고 현재 개발 중인 하나의 접근법에는 개질 독소가 비-클로스트리듐 독소 표적 세포에 대해 변형된 세포 표적화능을 갖도록 하는 클로스트리듐 독소의 개질이 관여된다. 이러한 재-표적화 역량은 클로스트리듐 독소의 천연 생성 표적화 도메인을 비-클로스트리듐 독소 표적 세포에 존재하는 비-클로스트리듐 독소 수용체에 대해 선택적 결합 활성을 나타내는 표적화 도메인으로 대체하여 달성된다. 표적화 도메인에 대한 상기 개질은 비-클로스트리듐 독소 표적 세포에 존재하는 비-클로스트리듐 독소 수용체(표적 수용체)에 선택적으로 결합할 수 있는(재-표적화) 개질 독소를 만들어 낸다. 비-클로스트리듐 독소 표적 세포에 대한 표적화 활성을 갖는 개질 클로스트리듐 독소는 비-클로스트리듐 독소 표적 세포에 존재하는 수용체에 결합하여, 세포질 내로 전위하고, 비-클로스트리듐 독소 표적 세포의 SNARE 복합체에 그 단백분해 효과를 발휘할 수 있다. 본질적으로 효소 도메인을 포함하는 클로스트리듐 독소 경쇄는 적절한 표적화 도메인을 선택함으로써 임의의 원하는 세포로 세포내 전달된다.

[0009] 본 명세서는 표적화 세포외 배출 조정 단백질(TVEMP)로 불리는 비-클로스트리듐 독소 수용체로 재표적화된 일군의 개질 클로스트리듐 독소, TVEMP를 포함하는 조성물, 및 암을 겪는 개인의 치료 방법을 개시한다. TVEMP는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 및 전위 도메인, 그리고 표적화 도메인을 포함하는 재조합적으로 제조되는 단백질이다. 표적화는 관심 표적 암 세포 상에 존재하는 수용체에 결합하는 그 능력에 대해 선택된다. 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 및 효소 도메인은 그 인지체 SNARE 기질을 절단하는 표적 세포의 세포질 내로 효소 도메인을 전달하는 작용을 한다. SNARE 단백질 절단은 세포내 소포 중에 함유된 물질이 소포막과 외부 세포막의 융합에 의해 세포로부터 방출되는 세포성 분비 또는 배출 절차인 세포외 배출을 손상시킨다. 이 손상은 세포-표면 수용체 및 신호 전달 단백질을 포함하는 막통과 단백질의 삽입; 세포외 기질 단백질의 세포외 공간 내로의 수송; 성장 인자, 혈관신생 인자, 신경전달물질, 호르몬 분비 및 세포성 커뮤니케이션에 관여하는 임의의 다른 분자를 포함하는 단백질의 분비; 및 노폐물, 대사체, 및 기타 원치 않거나 해로운 분자의 방출을 비제한적으로 포함하는 세포의 여러 본질적 절차를 예방한다. 이와 같이, 세포외 배출 손상은 세포성 대사 및 궁극적으로는 세포 생활성에 심각한 영향을 미친다. 따라서 세포의 세포외 배출을 감소시키거나 저해하는 치료 분자는 세포의 생존력을 감소시킨다. 이러한 전제에 근거하여, 본 명세서에 개시된 TVEMP는 암 세포를 표적화하도록 고안되며, 여기서 효소 도메인의 후속 전위가 SNARE 단백질 절단에 의해 세포외 배출을 손상시켜 암 세포의 생존력을 감소시킨다.

[0010] 따라서 본 발명의 측면에서는 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함하는 TVEMP를 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 조성물의 개발에 유용한 TVEMP는 예로 [Steward, L.E. 등, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, 미국 특허 출원 번호 11/776,075(2007.07.11.); Dolly, J.O. 등, *Activatable Clostridial Toxins*, 미국 특허 출원 번호 11/829,475(2007.07.27.); Foster, K.A. 등, *Fusion Proteins*, 국제 특허 공보 WO 2006/059093(2006.06.08.); 및 Foster, K.A. 등, *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, 국제 특허 공보 WO 2006/059105(2006.06.08.)]에 기재되어 있으며, 그 각각의 전문이 참조로 도입된다. TVEMP를 포함하는 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 TVEMP에 부가하여, 약제학적 담체, 약제학적 성분, 또는 둘 다를 포함할 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 측면에서는 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함하는 TVEMP를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 이를 필요로 하는 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 포유류에서의 암 치료 방법을 제공하며, 여기서 조성물의 투여는 암에 연관된 증상을 감소시킨다. 예로 [Steward, 상기(2007); Dolly, 상기(2007); Foster, 상기, WO 2006/059093(2006); 및 Foster, 상기, WO 2006/059105(2006.06.08.)]에 개시된 것들을 포함하여 본 명세서에 개시된 임의의 TVEMP를 사용할 수 있음이 계획된다. 개시된 방법은 암 치료를 위해 안전하고 저렴한 외래 환자 기반 치료를 제공한다.

[0012] 본 발명의 다른 측면에서는 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인, 클로스트리듐 독소의 효소 도메

인, 및 외인성 프로테아제 절단 부위를 포함하는 TVEMP를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 이를 필요로 하는 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 포유류에서의 암 치료 방법을 제공하며, 여기서 상기 조성물의 투여는 암에 관련된 증상을 감소시킨다. 예로 [Steward, 상기(2007); Dolly, 상기(2007); Foster, 상기, WO 2006/059093(2006); 및 Foster, 상기, WO 2006/059105(2006.06.08.)]에 개시된 것들을 포함하여 본 명세서에 개시된 임의 TVEMP를 사용할 수 있음이 계획된다.

[0013] 본 발명의 또 다른 측면에서는 이를 필요로 하는 포유류에서의 암 치료용 약제 제조에서의 TVEMP의 용도를 제공하며, 여기서 TVEMP는 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인, 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함하고, 포유류에 대한 치료적 유효량의 약제 투여는 암에 관련된 증상을 감소시킨다. 예로 [Steward, 상기(2007); Dolly, 상기(2007); Foster, 상기, WO 2006/059093(2006); 및 Foster, 상기, WO 2006/059105(2006.06.08.)]에 개시된 것들을 포함하여 본 명세서에 개시된 임의 TVEMP를 사용할 수 있음이 계획된다.

[0014] 본 발명의 또 다른 측면에서는 치료적 유효량의 TVEMP를 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 포유류에서의 암 치료에서의 TVEMP의 용도를 제공하며, 여기서 TVEMP는 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인, 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함하고, TVEMP의 투여는 암에 관련된 증상을 감소시킨다. 예로 [Steward, 상기(2007); Dolly, 상기(2007); Foster, 상기, WO 2006/059093(2006); 및 Foster, 상기, WO 2006/059105(2006.06.08.)]에 개시된 것들을 포함하여 본 명세서에 개시된 임의 TVEMP를 사용할 수 있음이 계획된다.

도면의 간단한 설명

[0015] **도 1**은 중추 및 말초 신경에서 신경전달물질 방출 및 클로스트리듐 독소 중독의 현재 패러다임의 모식도를 나타낸다. **도 1a**는 중추 및 말초 신경의 신경전달물질 방출 기전에 대한 모식도를 나타낸다. 방출 절차는 두 단계를 포함하는 것으로 설명할 수 있다: 1) 소포 결합(여기서, 신경전달물질 분자를 함유하는 소포의 소포-결합 SNARE 단백질이 형성막에 위치하는 막-결합 SNARE 단백질에 연합된다); 및 2) 신경전달물질 방출(여기서, 상기 소포가 형성막과 융합하고 신경전달물질 분자가 세포의 배출된다). **도 1b**는 중추 및 말초 신경에서의 테타누스 및 보툴리눔 독소 활성을 위한 중독 기전의 모식도를 나타낸다. 이 중독 절차는 4 단계를 포함하는 것으로 설명할 수 있다: 1) 수용체 결합(여기서, 클로스트리듐 독소는 클로스트리듐의 수용체 시스템에 결합하여 중독 절차가 개시된다); 2) 복합체 내부화(여기서 독소 결합 후, 독소/수용체 시스템 복합체를 함유하는 소포가 세포 내로 세포내 섭취된다); 3) 경쇄 전위(여기서, 예로 소포의 내부 pH 변화, 클로스트리듐 독소 중쇄의 HN 도메인을 포함하는 채널 개구의 형성, 중쇄로부터 클로스트리듐 독소의 경쇄 분리, 및 활성 경쇄의 방출을 포함하는 여러 사건이 일어나는 것으로 생각된다) 및 4) 효소적 표적 개질(여기서, 클로스트리듐 독소의 경쇄 활성화는 그 표적 SNARE 기질, 예컨대 SNAP-25, VAMP 또는 신택신을 단백질분해적으로 절단하여 소포 결합 및 신경전달물질 방출을 방지한다).

도 2는 천연 생성 클로스트리듐의 독소의 도메인 구성을 나타낸다. 단쇄 형태는 효소 도메인, 전위 도메인, 및 표적화 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 선형 구성을 나타낸다. 전위 및 효소 도메인 사이에 위치하는 이중쇄 루프 영역은 이중 SS 각괄호로 나타낸다. 이 영역은 천연 생성 프로테아제, 예컨대 환경 중에 생성된 천연 생성 프로테아제 또는 내인성 클로스트리듐 독소 프로테아제로의 단백질분해 절단 시 독소의 단쇄 형태를 이중쇄 형태로 전환시키는 내인성 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 단쇄 형태 위에, 클로스트리듐 독소 결합 도메인의 HCC 영역을 나타낸다. 이 영역은 α-주름, β4/β5 헤어핀 회전체, β-주름, β8/β9 헤어핀 회전체 및 γ 주름의 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 선형 구성을 포함하는 β 트레포일 도메인을 포함한다.

도 3은 아미노 말단에 위치한 표적화 도메인을 갖는 TVEMP를 나타낸다. **도 3a**는 표적화 도메인, 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위(P)를 포함하는 이중쇄 루프 영역, 및 효소 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단의 선형 구성을 갖는 TVEMP의 단쇄 폴리펩타이드 형태를 나타낸다. P 프로테아제에 의한 단백질분해 절단 시, 독소의 단쇄 형태는 이중쇄 형태로 전환된다. **도 3b**는 표적화 도메인, 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위(P)를 포함하는 이중쇄 루프 영역, 및 전위 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단의 선형 구성을 갖는 TVEMP의 단일 폴리펩타이드 형태를 나타낸다. P 프로테아제에 의한 단백질분해 절단 시, 독소의 단쇄 형태는 이중쇄 형태로 전환된다.

도 4는 다른 두 도메인 사이에 위치한 표적화 도메인을 갖는 TVEMP를 나타낸다. **도 4a**는 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위(P)를 포함하는 이중쇄 루프 영역, 표적화 도메인 및 전위 도메인을 포함하는 아미노 말단

에서 카르복실 말단의 선형 구성을 갖는 TVEMP의 단일 폴리펩타이드 형태를 나타낸다. P 프로테아제로의 단백질 분해 절단 시, 독소의 단쇄 형태는 이중쇄 형태로 전환된다. 도 4b는 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위(P)를 포함하는 이중쇄 루프 영역, 표적화 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단의 선형 구성을 갖는 TVEMP의 단일 폴리펩타이드 형태를 나타낸다. P 프로테아제로의 단백질 분해 절단 시, 독소의 단쇄 형태는 이중쇄 형태로 전환된다. 도 4c는 효소 도메인, 표적화 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위(P)를 포함하는 이중쇄 루프 영역, 및 전위 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단의 선형 구성을 갖는 TVEMP의 단일 폴리펩타이드 형태를 나타낸다. P 프로테아제로의 단백질 분해 절단 시, 독소의 단쇄 형태는 이중쇄 형태로 전환된다. 도 4d는 전위 도메인, 표적화 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위(P)를 포함하는 이중쇄 루프 영역, 및 효소 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단의 선형 구성을 갖는 TVEMP의 단일 폴리펩타이드 형태를 나타낸다. P 프로테아제로의 단백질 분해 절단 시, 독소의 단쇄 형태는 이중쇄 형태로 전환된다.

도 5는 카르복실 말단에 위치한 표적화 도메인을 갖는 TVEMP를 나타낸다. 도 5a는 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위(P)를 포함하는 이중쇄 루프 영역, 전위 도메인 및 표적화 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단의 선형 구성을 갖는 TVEMP의 단일 폴리펩타이드 형태를 나타낸다. P 프로테아제로의 단백질 분해 절단 시, 독소의 단쇄 형태는 이중쇄 형태로 전환된다. 도 5b는 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위(P)를 포함하는 이중쇄 루프 영역, 효소 도메인 및 표적화 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단의 선형 구성을 갖는 TVEMP의 단일 폴리펩타이드 형태를 나타낸다. P 프로테아제로의 단백질 분해 절단 시, 독소의 단쇄 형태는 이중쇄 형태로 전환된다.

상세한 설명

암은 포유류 신체에서 세포의 제어되지 않는 성장을 나타내며, 이에 따라 신체가 세포 성장을 조절하기 위해 이용하는 조절 기전에 영향을 미치는 근본적 질환이다. 정상 세포가 암 세포로 전환되기 위해서는 세포 성장 및 분화를 조절하는 유전자가 변형되어야 한다. 유전적 변화는 전체 염색체의 획득 또는 소실로부터 단일 DNA 뉴클레오티드에 영향을 미치는 돌연변이에 이르기까지 여러 수준에서 일어날 수 있다. 매우 다양한 암 세포 유형은 전이성 성장을 총체적으로 지시하는 세포 생리에서의 6가지 본질적 변형의 발현이다: 1) 성장 신호의 자가 충분성; 2) 성장-저해(성장억제) 신호에 대한 불감성; 3) 프로그램화 세포사(아포토시스)의 회피; 4) 무제한 복제능; 5) 지속되는 혈관신생; 및 6) 조직 침습 및 전이. [Hanahan 및 Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*, *Cell* 100(1): 57-70(2000)].

암 세포가 성장 신호에 자가 충분성을 나타내는 하나의 방법은 종양유전자의 발현에 의한 것이다. 종양유전자는 부적절하게 고수준으로 발현되는 정상 유전자일 수도 있고, 또는 신규한 특성을 가진 변형 유전자일 수도 있다. 어느 경우에도, 이들 유전자의 발현은 다양한 방식을 통해 암 세포가 나타내는 세포 성장의 전이성 표현형을 촉진한다. 다수가 유사 분열을 권장하는 호르몬과 같은 세포 간 분비 인자를 생성할 수 있으며, 그 효과는 수용 조직 또는 세포의 신호 전달에 근거한다. 따라서 수용 세포 상의 호르몬 수용체가 자극되면, 세포 표면으로부터 세포 핵으로 핵 수준에서 유전자 전사 조절에 일부 변화를 일으키는 신호가 전달된다. 일부 종양유전자는 신호 전달계 자체의 일부, 또는 세포 및 조직 내 신호 수용체 자체이어서, 상기 호르몬에 대한 감수성을 조절한다. 종양유전자는 종종 유사분열물질을 생성하거나 단백질 합성에서의 DNA 전사에 관여되며, 이는 세포가 이용하고 상호작용하는 산물 및 생화학물질을 생성하는데 관여하는 단백질을 및 효소를 생성한다. 정상적으로는 종양유전자의 정지 대응물인 원-종양유전자의 돌연변이는 이들의 발현 및 기능을 변형하여 산물 단백질의 양 또는 활성을 증가시킬 수 있다. 이것이 일어나면 원-종양유전자가 종양유전자가 되고, 이 전이가 세포 내 세포 주기 조절의 정상 균형을 망가트려 제어되지 않는 성장이 가능하게 만든다. 게놈으로부터 원-종양유전자의 제거에 의해 암이 될 확률을 감소시키는 것은 이것이 가능한 경우에도 이들이 개체의 성장, 보수 및 항상성에 있어서 결정적이기 때문에 불가능하다. 성장을 위한 신호가 과다해지는 것은 이들이 돌연변이되는 경우일 때만이다. 따라서, 암 세포에서 세포 성장 신호를 저해하는 치료 전략은 종양유전자 발현으로 인해 성장 신호에 자가 충분성을 나타내는 암의 치료에 강력한 도구를 제공할 수 있다. 또한 여러 암 세포는 성장 인자 수용체 및 이들 수용체를 활성화하는 리간드(자가분비 루프)를 발현한다. 정상 조직에 있어서는, 한 유형의 세포가 성장 인자 수용체를 발현하고 또 다른 유형이 리간드를 발현하여(주변분비 루프) 항상성을 유지하는 역할을 한다. 암 세포는 리간드 및 수용체를 발현함으로써 성장을 위한 자가 충분성을 획득한다.

암 세포가 성장 저해(성장억제) 신호에 불감성을 나타내는 하나의 방법은 종양 억제제 유전자의 발현 저해에 의한 것이다. 종양 억제제 유전자는 암 세포의 세포 분열, 생존, 또는 다른 특성을 저해하는 유전자이다. 종양 억제제 유전자는 종종 암이 촉진하는 유전적 변화에 의해 불능화된다. 전형적으로 정상 세포가 암 세포로 전환되는 데에는 여러 유전자의 변화가 필요하다. 일반적으로 종양 억제제는 세포성 스트레스 또는 DNA 손상에 의해

활성화되는 전사 인자이다. 종종 DNA 손상은 자유로이 떠도는 유전 물질 뿐만 아니라 다른 신호의 존재 하에 야기될 것이며, 중앙 억제제 유전자의 활성화를 일으키는 효소 및 경로를 촉진할 것이다. 상기 유전자의 기능은 DNA를 보수하기 위해 세포 주기의 진행을 정지시켜 돌연변이가 딸 세포로 전달되는 것을 방지하는 것이다. 따라서 암 세포에서 세포 분열 신호를 저해하는 치료 전략은 중앙 억제제 유전자 발현의 억제로 인해 성장-저해 신호에 대해 불감성을 나타내는 암을 치료하는 강력한 도구를 제공할 수 있다.

암 세포가 프로그램화 세포사(아포토시스)를 탈피하는 하나의 방법은 세포 생존 신호(항아포토시스 신호)로의 연속 노출에 의한 것이다. 세포 생존 또는 세포사를 유도하는 신호는 형질막 내 센서(즉, 사멸 수용체)에 의해 그리고 세포의 건강을 감시하는 세포내 센서에 의하며, DNA 손상, 중앙유전자 활동, 생존 인자 불충분 또는 저산소증과 같은 비정상적 검출에 반응하여 이들이 사멸 경로를 활성화한다. 따라서 암 세포는 이들이 DNA 손상, 활성화된 중앙유전자, 또는 저산소증을 중앙 중심에 가지게 됨에 따라 아포토시스를 겪어야 한다. 일부 유형의 암 세포는 이들 세포에 존재하는 DNA 손상에 의해 유발되는 아포토시스 신호에 역행하는 자가분비 루프에 의해 전달되는 생존 신호에 의존한다. 이들 자가분비 루프는 성장 인자 리간드 및 이들의 인지체 수용체의 발현을 통해 암 세포에 의해 구축된다. 따라서 암 세포에 의한 세포 생존 신호의 수용을 저해하는 치료 전략은 항아포토시스 신호의 과활성화를 갖는 암을 치료하는 강력한 도구를 제공할 수 있다. 사실상, 문헌에는 호르몬 및/또는 성장 인자 제거가 생존 및 아포토시스 신호 간의 균형을 복구함에 따라 암 세포에서 아포토시스를 일으킬 수 있다는 증거가 제시되었다.

암 세포의 또 다른 획득 역량은 중앙 세포의 무제한 복제능이다. 암 세포는 텔로미어를 침식하는 계속적 증식에서 야기되는 위기 상태를 회피하고 텔로미어의 완전성을 유지함으로써 증식의 제한을 극복한다. 암 세포는 텔로미어의 크기를 유지하고 무제한 복제능을 가능케 하는 효소 텔로머라아제를 과발현한다. 그러나 또 다른 중요 단계는 유사분열 절차를 종료하기 위해 막을 형질막으로 전달하는 능력이다.

세포가 중앙 내에서 증식함에 따라, 이들은 아포토시스를 유도할 산소 및 영양분의 공급 제한 등과 같은 다른 문제에 또한 직면하게 된다. 따라서 성장 및 증식을 지속할 수 있기 위해서는 중앙이 기존 혈관 뿐만 아니라 성숙 조직에서 고도로 조절되는 절차인 새로운 혈관의 성장을 촉진해야 한다. 암 세포는 혈관신생촉진 인자를 분비하여 내피 세포 내의 수용체를 활성화한다. 또한 세포의 기질에 격리된 혈관신생촉진 인자가 중앙 세포에 의해 분비되는 프로테아제가 수행하는 기질의 소화에 의해 방출될 수 있다. 혈관신생의 저해는 몇몇 허가된 약물이 암 및 다른 혈관신생촉진 질환을 위한 치료로 이 경로를 표적으로 삼음에 따라 실증된 치료 표적이다.

마지막으로, 중앙 세포는 인접 조직을 침습하고 다른 부위로 전이하는 역량을 획득한다. 이를 달성하기 위해, 중앙 세포는 먼저 부착 단백질 및 인테그린의 발현을 변형시켜 이들의 부착능을 변화시킬 수 있다. 보다 중요하게는 이동할 수 있도록 하기 위해 암 세포는 이들을 둘러싼 세포의 기질을 분해할 수 있어야 한다. 암 세포는 분비 인자로서 또는 막 부착 프로테아제로서 기질 분해 프로테아제를 과발현하며, 프로테아제 저해제의 발현을 하향조절한다.

제어되지 않는 세포 성장은 모든 암의 내재 원인이며, 이러한 제어되지 않는 세포 성장을 감소시키거나 예방할 수 있는 화합물 및 방법은 암 치료에 효과적일 것이다. 본 명세서는 암 세포가 나타내는 제어되지 않는 세포 성장을 감소시키거나 예방할 수 있는 화합물 및 방법을 개시한다. 신규한 재표적화된 엔도랩티다아제는 부분적으로 결합 도메인 및 효소 도메인을 포함한다. 결합 도메인은 결합 도메인에 대한 인지체 수용체를 발현하는 특정 암 세포 유형으로 재표적화된 엔도랩티다아제를 보낸다. 효소 도메인의 엔도랩티다아제 활성화는 적절한 표적 SNARE 단백질을 절단함으로써 수용체 및 막의 형질막으로의 전달 및 세포의 배출을 손상시킨다. 암 세포에서의 세포의 배출의 예방은 손상이 예로, 1) 암 세포가 유사 분열을 조장하는 분비 성장 인자의 방출을 예방하거나; 또는 2) 암 촉진 신호의 수신, 예컨대 성장 촉진 신호 또는 세포 생존 신호를 수신하는 암 세포의 능력을 방해할 암 세포의 형질막으로의 수용체 전달을 예방하거나(후자는 암 세포의 아포토시스 쪽으로 균형을 변경시켜 암 세포를 제거하는데 유용할 것이다); 3) 막의 형질막으로의 전달을 예방하여 딸 세포를 생성하기 위한 막의 전체적 획득과 함께만 일어날 수 있는 유사분열 절차를 중단시키거나; 4) 중앙 세포 또는 세포의 기질에 의해 혈관신생촉진 인자의 방출을 저해함으로써 혈관신생을 감소시키거나; 5) 프로테아제의 방출 저해에 의해 및 부착 단백질 및 인테그린의 스위치로 방해함으로써 침습 및 전이를 저해할 것이므로 치료적으로 유용하다.

따라서 현재 시장 내의 암 치료제가 한 번에 단 하나의 경로를 표적으로 하고, 이에 따라 부분적으로만 유효하며 암 세포가 치료에 대해 내성을 획득할 수 있는 반면, 세포의 배출, 수용체 전달, 및 막 전달의 저해에 의한 TEVMP-기반 치료법은 중앙 세포에 더 강력한 펀치를 전달하는 단일 약물과 함께 여러 경로를 표적화하여 보다 효과적일 것이다. 또한 정상 세포는 증식하지 않고 생존 신호에 크게 의존하지 않으므로, 이들은 상기 치료법에

의해 영향받지 않는다.

본 발명의 측면에서는 부분적으로 TVEMP를 제공한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "TVEMP"란 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함하는 임의 분자를 의미한다. 본 발명의 실시 측면에서 유용한 예시적인 TVEMP는 예로 [Steward, 상기, (2007); Dolly, 상기, (2007); Foster, 상기, WO 2006/059093(2006); Foster, 상기, WO 2006/059105(2006.06.08.)]에 개시된다.

클로스트리듐 독소는 각각 천연 생성 프로테아제에 의해 디설피드 루프 내에서 단백질 분해 절단에 의해 후속 절단되는 대략 150kDa의 단쇄 폴리펩타이드로 번역된다(도 1). 이 절단은 디설피드 가교를 형성하는 두 시스테인 잔기 사이에서 생성되는 별도의 이중쇄 루프 영역 내에서 일어난다. 상기 번역 후 처리로 두 사슬 간 단일 디설피드 결합 및 비-공유 상호작용에 의해 함께 유지되는 대략 50kDa의 경쇄(LC) 및 대략 100kDa의 중쇄(HC)를 포함하는 이중쇄 분자가 산출된다. 단쇄 분자를 이중쇄로 전환시키는데 사용되는 천연 생성 프로테아제는 현재 공지되어 있지 않다. 일부 혈청형, 예컨대 BoNT/A에 있어서, 천연 생성 프로테아제는 박테리아 혈청형에 의해 내인성으로 생성되며, 절단은 독소가 환경 내로 방출되기 전에 세포 내에서 일어난다. 그러나 다른 혈청형, 예컨대 BoNT/E에 있어서, 박테리아 균주는 독소의 단쇄 형태를 이중쇄 형태로 전환시킬 수 있는 내인성 프로테아제를 생성하지 않는 것으로 나타난다. 이러한 상황 하에서, 독소는 단쇄 독소로 방출되며, 이후 환경 중에서 발견되는 천연 생성 프로테아제에 의해 이중쇄 형태로 전환된다.

각각의 성숙 이중쇄 분자는 3개의 기능적으로 상이한 도메인을 포함한다: 1) 신경전달물질 방출 기구의 코어 성분을 특이적으로 표적화하는 아연 의존성 엔도펩티다아제 활성을 함유하는 메탈로프로테아제 영역을 포함하는 LC 내에 위치한 효소 도메인; 2) 표적 세포의 세포내 소포로부터 세포질 내로의 LC 방출을 촉진하는 HC의 아미노-말단 절반(H_N) 내에 함유되는 전위 도메인; 및 3) 표적 세포의 표면에 위치하는 수용체 복합체에 대한 독소의 결합 활성 및 결합 특이성을 결정하는 HC의 카복실-말단 절반(H_C) 내에서 발견되는 결합 도메인[D. B. Lacy 및 R. C. Stevens, Sequence Homology and Structural Analysis of the Clostridial Neurotoxins, J. Mol. Biol. 291: 1091-1104 (1999)]. H_C 도메인은 대략 동일한 크기이고 α-나선으로 구분되며 H_{CN} 및 H_{CC} 서브도메인으로 명명되는 두 개의 상이한 구조적 특징부를 포함한다. 표 1은 예시적인 클로스트리듐의 독소에서 발견되는 각각의 도메인 및 서브도메인에 대한 대략적 경계 영역을 나타낸다.

표 1. 클로스트리듐 독소 참조 서열 및 영역

독소	서열 번호:	LC	이중쇄 루프	H _N	H _C		
					H _{CN}	α-링커	H _{CC}
BoNT/A	1	M1/P2-L429	C430-C454	I455-I873	I874-N1080	E1081-Q1091	S1092-L1296
BoNT/B	6	M1/P2-M436	C437-C446	I447-I860	L861-S1067	Q1068-Q1078	S1079-E1291
BoNT/C1	11	M1/P2-F436	C437-C453	R454-I868	N869-D1081	G1082-L1092	Q1093-E1291
BoNT/D	13	M1/T2-V436	C437-C450	I451-I864	N865-S1069	N1069-Q1079	I1080-E1276
BoNT/E	15	M1/P2-F411	C412-C426	I427-I847	K848-D1055	E1056-E1066	P1067-K1252
BoNT/F	18	M1/P2-F428	C429-C445	I446-I865	K866-D1075	K1076-E1086	P1087-E1274
BoNT/G	21	M1/P2-M435	C436-C450	I451-I865	S866-N1075	A1076-Q1086	S1087-E1297
TeNT	22	M1/P2-L438	C439-C467	I468-L881	K882-N1097	P1098-Y1108	L1109-D1315
BaNT	23	M1/P2-L420	C421-C435	I436-I857	I858-D1064	K1065-E1075	P1076-E1268
BuNT	24	M1/P2-F411	C412-C426	I427-I847	K848-D1055	E1056-E1066	P1067-K1251

이들 세 기능적 도메인의 결합, 전위, 및 효소 활성이 모두 독성을 위해 필요하다. 이 절차의 모든 상세 내용이 아직 정확히 알려지지는 않았으나, 클로스트리듐 독소가 신경에 들어가서 신경전달물질 방출을 저해하는 전체적인 세포 중독 기전은 혈청형 또는 서브타입과 무관하게 유사하다. 본 출원인들이 하기 설명에 제한하려는 의도는 아니지만, 중독 기전은 적어도 4개 단계를 포함하는 것으로 설명할 수 있다: 1) 수용체 결합, 2) 복합체 내부화, 3) 경쇄 전위, 및 4) 효소적 표적 개질(도 3). 상기 절차는 클로스트리듐 독소의 H_C 도메인이 표적 세포의 형질막 표면 상에 위치한 독소-특이적 수용체 시스템에 결합하는 경우 개시된다. 수용체 복합체의 결합 특이성은 부분적으로는 각각의 클로스트리듐 독소의 수용체 복합체를 상이하게 포함하는 것으로 나타나는 특정 조합

의 갱글리오시드 및 단백질 수용체에 의해 달성될 것으로 생각된다. 일단 결합하면 독소/수용체 복합체는 세포 내 섭취에 의해 내부화되며, 내부화된 소포가 특정 세포내 경로로 배열된다. 전위 단계는 소포 구획의 산성화에 의해 유발되는 것으로 나타난다. 상기 절차는 소수성을 증가시키고 독소의 이중쇄 형태 형성을 촉진하는 2가지 중요한 pH 의존적 구조 재배열을 개시하는 것으로 보인다. 활성화되면 독소의 경쇄 엔도펩티다아제가 세포내 소포로부터 신경전달물질 방출 기구의 3가지 공지된 코어 성분 중 하나를 특이적으로 표적화하는 것으로 나타나는 세포질 내로 방출된다. 이들 코어 단백질인 소포-연관 막 단백질(VAMP)/시냅토프레빈, 25kDa의 시냅토프-연관 단백질(SNAP-25) 및 신택신은 신경 말단에서 시냅스의 소포 결합 및 융합을 위해 필요하며, 가용성 α -에틸말레이미드-민감성 인자-부착 단백질-수용체(SNARE) 패밀리 멤버를 이룬다. BoNT/A 및 BoNT/E는 SNAP-25를 카르복실-말단 영역에서 절단하여 각각 9개 및 26개 아미노산 절편을 방출하며, BoNT/C1은 또한 SNAP-25를 카르복실-말단 근처에서 절단한다. 보툴리눔 혈청형 BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F 및 BoNT/G, 및 테타누스 독소는 VAMP의 보존된 중심부에 작용하여, VAMP의 아미노-말단부를 세포질 내로 방출한다. BoNT/C1은 신택신을 세포질 막 표면 근처 단일 부위에서 절단한다. 시냅스 SNARE의 선택적 단백질분해는 생체 내에서 클로스트리듐 독소에 의해 야기되는 신경전달물질 방출 차단을 설명해준다. 클로스트리듐 독소의 SNARE 단백질 표적은 다양한 비-신경 유형에서의 세포의 배출에 일반적이며; 이들 세포에서는 신경에서와 마찬가지로 경쇄 펩티다아제 활성이 세포의 배출을 저해한다. 예로 [Yann Humeau 등, *How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release*, 82(5) *Biochimie*. 427-446 (2000); Kathryn Turton 등, *Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility*, 27(11) *Trends Biochem. Sci.* 552-558. (2002); Giovanna Lalli 등, *The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons*, 11(9) *Trends Microbiol.* 431-437, (2003)]를 참고하라.

본 명세서의 측면에서는 부분적으로 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함하는 TVEMP를 제공한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "클로스트리듐 독소의 효소 도메인"이라는 용어는 중독 절차의 효소적 표적 개질 단계를 수행할 수 있는 임의의 클로스트리듐 독소의 폴리펩타이드를 나타낸다. 따라서 클로스트리듐 독소의 효소 도메인은 클로스트리듐 독소의 기질을 특이적으로 표적화하며 클로스트리듐 독소의 기질, 예컨대 SNAP-25 기질과 같은 SNARE 단백질, VAMP 기질, 및 신택신 기질의 단백질 분해 절단을 포함한다. 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 비제한적 예에는 예로 BoNT/A 효소 도메인, BoNT/B 효소 도메인, BoNT/C1 효소 도메인, BoNT/D 효소 도메인, BoNT/E 효소 도메인, BoNT/F 효소 도메인, BoNT/G 효소 도메인, TeNT 효소 도메인, BaNT 효소 도메인, 및 BuNT 효소 도메인이 포함된다.

클로스트리듐 독소의 효소 도메인에는 천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체, 예컨대 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 이소형 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 서브타입; 및 비천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체, 예컨대 보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체, 비-보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체, 이들의 활성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 절편, 또는 이들의 임의 조합이 비제한적으로 포함된다.

본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "클로스트리듐 독소 효소 도메인 변이체"는, 천연 생성 또는 비천연 생성 이든지, 개시된 참조 서열 (표 1)의 상응하는 영역으로부터의 적어도 하나의 아미노산 변화를 가지며 참조 서열의 상응하는 영역에 대해 동일성 퍼센트로 기재될 수 있는 클로스트리듐 독소 효소 도메인을 의미한다. 명백히 지시되지 않으면, 개시된 구현예를 실시하는데 유용한 클로스트리듐 독소 효소 도메인 변이체는 인독시케이션 (intoxication) 공정의 효소 표적 변형 단계를 실행하는 변이체이다. 비제한적인 예로서, BoNT/A 효소 도메인 변이체는 서열번호: 1의 아미노산 1/2-429와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/B 효소 도메인 변이체는 서열번호: 6의 아미노산 1/2-436와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/C1 효소 도메인 변이체는 서열번호: 11의 아미노산 1/2-436와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/D 효소 도메인 변이체는 서열번호: 13의 아미노산 1/2-436와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/E 효소 도메인 변이체는 서열번호: 15의 아미노산 1/2-411와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/F 효소 도메인 변이체는 서열번호: 18의 아미노산 1/2-428와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/G 효소 도메인 변이체는 서열번호: 21의 아미노산 1/2-438와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; TeNT 효소 도메인 변이체는 서열번호: 22의 아미노산 1/2-438와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BaNT 효소 도메인 변이체는 서열번호: 23의 아미노산 1/2-420와 비교하여 예를

들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BuNT 효소 도메인 변이체는 서열번호: 24의 아미노산 1/2-411와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이다.

당해분야 숙련자는 클로스트리듐 독소의 각각의 혈청형 내에서 이들의 아미노산 서열 및 또한 이들 단백질을 인코딩하는 핵산이 일부 상이한 천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체가 존재할 수 있다는 것을 인지한다. 예를 들어 서열 번호: 1의 BoNT/A 효소 도메인에 비해 약 80% 내지 95% 아미노산 동질성을 나타내는 특정 효소 도메인 서브타입을 갖는 5개의 BoNT/A 서브타입 BoNT/A1, BoNT/A2, BoNT/A3, BoNT/A4, 및 BoNT/A5가 현재 존재한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체"라는 용어는 대안적으로 스플라이스된 전사체로부터 생성된 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 이소형, 자발적 돌연변이에 의해 생성된 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 이소형 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 서브타입을 비제한적으로 포함하는, 천연 생성 절차에 의해 생성되는 임의의 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 나타낸다. 천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체는 천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체가 기준으로 하는 참조 클로스트리듐 독소의 효소 도메인과 실질적으로 동일한 방식으로 기능할 수 있으며, 본 명세서의 임의 측면에서 참조 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 대체할 수 있다.

천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체의 비제한적 예로는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 이소형, 예컨대 BoNT/A 효소 도메인 이소형, BoNT/B 효소 도메인 이소형, BoNT/C1 효소 도메인 이소형, BoNT/D 효소 도메인 이소형, BoNT/E 효소 도메인 이소형, BoNT/F 효소 도메인 이소형, BoNT/G 효소 도메인 이소형, TeNT 효소 도메인 이소형, BaNT 효소 도메인 이소형, 및 BuNT 효소 도메인 이소형이 있다. 천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체의 또 다른 비제한적 예로는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 서브타입, 예컨대 서브타입 BoNT/A1, BoNT/A2, BoNT/A3, BoNT/A4, 또는 BoNT/A5의 효소 도메인; 서브타입 BoNT/B1, BoNT/B2, BoNT/Bbv, 또는 BoNT/Bnp의 효소 도메인; 서브타입 BoNT/C1-1 또는 BoNT/C1-2의 효소 도메인; 서브타입 BoNT/E1, BoNT/E2 및 BoNT/E3의 효소 도메인; 서브타입 BoNT/F1, BoNT/F2, 또는 BoNT/F3의 효소 도메인; 및 서브타입 BuNT-1 또는 BuNT-2의 효소 도메인이 있다.

본 명세서에서 사용된 바와 같이, "비천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체"라는 용어는 무작위 돌연변이화 또는 합리적 설계를 이용한 유전자 조작에 의해 제조되는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 및 화학적 합성으로 제조되는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 비제한적으로 포함하는 인간 조작의 도움으로 제조된 임의의 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 나타낸다. 비천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체의 비제한적 예에는 예로 보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체, 비-보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 키메라성 변이체, 및 활성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 절편이 포함된다.

본 명세서에서 사용된 바와 같이, "보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체"라는 용어는 참조 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 서열(표 1)의 원래 아미노산의 특성과 유사한 적어도 하나의 특성을 갖는 또 다른 아미노산 또는 아미노산 유사체로 치환된 적어도 하나의 아미노산을 갖는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 나타낸다. 특성의 예에는 유사한 크기, 국소형태, 전하, 소수성, 친수성, 친유성, 공유-결합능, 수소-결합능, 물리화학적 특성 등이나 또는 이들의 임의 조합이 비제한적으로 포함된다. 보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체는 보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체가 기준으로 하는 참조 클로스트리듐 독소의 효소 도메인과 실질적으로 동일한 방식으로 기능할 수 있으며, 본 명세서의 임의 측면에서 참조 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 치환할 수 있다. 보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체의 비제한적 예에는 예로 보존적 BoNT/A 효소 도메인 변이체, 보존적 BoNT/B 효소 도메인 변이체, 보존적 BoNT/C1 효소 도메인 변이체, 보존적 BoNT/D 효소 도메인 변이체, 보존적 BoNT/E 효소 도메인 변이체, 보존적 BoNT/F 효소 도메인 변이체, 보존적 BoNT/G 효소 도메인 변이체, 보존적 TeNT 효소 도메인 변이체, 보존적 BaNT 효소 도메인 변이체, 및 보존적 BuNT 효소 도메인 변이체가 포함된다.

본 명세서에서 사용된 바와 같이, "비보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체"라는 용어는 다음과 같은 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 나타낸다: 1) 적어도 하나의 아미노산이 비-보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체가 기준으로 하는 참조 클로스트리듐 독소의 효소 도메인에서 결실되거나; 2) 적어도 하나의 아미노산이 비-보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인이 기준으로 하는 참조 클로스트리듐 독소의 효소 도메인에 부가되거나; 또는 3) 적어도 하나의 아미노산이 참조 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 서열(표 1)의 원래 아미노산의 특성과 유사한 임의 특성을 공유하지 않는 또 다른 아미노산 또는 아미노산 유사체로 치환됨. 비-보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체는 비-보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체가 기준으로

로 하는 참조 클로스트리듐 독소의 효소 도메인과 실질적으로 동일한 방식으로 기능할 수 있고, 본 명세서의 임의 측면에서 참조 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 치환할 수 있다. 비-보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체의 비제한적 예에는 예로 비-보존적 BoNT/A 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/B 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/C1 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/D 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/E 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/F 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/G 효소 도메인 변이체, 및 비-보존적 TeNT 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BaNT 효소 도메인 변이체, 및 비-보존적 BuNT 효소 도메인 변이체가 포함된다.

본 명세서에서 사용된 바와 같이, "활성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 절편"이라는 용어는 이들 효소 도메인 절편이 신경전달물질 방출 기구의 코어 성분을 특이적으로 표적화하여 클로스트리듐 독소가 기질을 단백분해하여 절단하는 전체적인 세포성 기전 수행에 참여할 수 있는 한, 본 명세서의 측면에서 유용할 수 있는 효소 도메인을 포함하는 임의의 다양한 클로스트리듐 독소의 절편을 나타낸다. 클로스트리듐 독소의 효소 도메인은 대략 420-460개 아미노산 길이며 효소 도메인을 포함한다(표 1). 연구를 통해 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 전체 길이가 효소 도메인의 효소 활성화에 필요한 것은 아니라는 것이 나타났다. 비제한적 예로서, BoNT/A 효소 도메인의 최초 8개 아미노산은 효소 활성을 위해 필요하지 않다. 또 다른 비제한적 예로서, TeNT 효소 도메인의 최초 8개 아미노산은 효소 활성을 위해 필요하지 않다. 마찬가지로 효소 도메인의 카르복실-말단은 활성을 위해 필요하지 않다. 비제한적 예로서, BoNT/A 효소 도메인의 마지막 32개 아미노산은 효소 활성을 위해 필요하지 않다. 또 다른 비제한적 예로서, TeNT 효소 도메인의 마지막 31개 아미노산은 효소 활성을 위해 필요하지 않다. 따라서 본 구현예의 측면에는 예로 적어도 350, 375, 400, 425, 또는 450개 아미노산 길이의 효소 도메인을 포함하는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인이 포함된다. 본 구현예의 다른 측면에는 예로 최대 350, 375, 400, 425, 또는 450개 아미노산 길이의 효소 도메인을 포함하는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인이 포함된다.

전반적 방법, 국소 방법 및 하이브리드 방법, 예컨대 절편 접근 방법을 비제한적으로 포함하는 임의의 다양한 서열 정렬 방법을 이용하여 동질성 백분율을 결정할 수 있다. 동질성 백분율을 결정하는 프로토콜은 당해분야 숙련자의 범위 내에서 및 본원의 교시로부터 일상적인 절차이다.

전반적 방법은 분자 시작부터 말단까지 서열을 정렬하고, 개별 잔기쌍의 스코어를 추가하고 갭 페널티를 적용하여 최적 정렬을 결정한다. 비제한적 방법에는 다음이 계획된다: 예로 CLUSTAL W, 예로 [Julie D. Thompson 등, *CLUSTAL W: Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice*, 22(22) *Nucleic Acids Research* 4673-4680 (1994)] 참고; 및 반복적 정렬, 예로 [Osamu Gotoh, *Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments*, 264(4) *J. Mol. Biol.* 823-838 (1996)] 참고하라.

국소 방법은 모든 입력 서열이 공유하는 하나 이상의 보존된 모티프를 동정하여 서열을 정렬한다. 비제한적 방법에는 다음이 계획된다: 예로 매치박스, 예로 [Eric Depiereux 및 Ernest Feytmans, *Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences*, 8(5) *CABIOS* 501-509 (1992)] 참고; 깃스 샘플링, 예로 [C. E. Lawrence 등, *Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment*, 262(5131) *Science* 208-214 (1993)] 참고; 정렬-M, 예로 [Ivo Van Walle 등, *Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences*, 20(9) *Bioinformatics*,:1428-1435 (2004)] 참고하라.

하이브리드 방법은 전반적 및 국소 정렬 방법 모두의 기능적 측면을 조합한다. 비제한적 방법에는 다음이 계획된다: 예로 절편-대-절편 비교, 예로 [Burkhard Morgenstern 등, *Multiple DNA and Protein Sequence Alignment Based On Segment-To-Segment Comparison*, 93(22) *Proc. Natl. Acad. Sci. 미국A*. 12098-12103(1996)] 참고; T-커피, 예로 [Cedric Notredame 등, *T-Coffee: A Novel Algorithm for Multiple Sequence Alignment*, 302(1) *J. Mol. Biol.* 205-217(2000)] 참고; MUSCLE, 예로 [Robert C. Edgar, *MUSCLE: Multiple Sequence Alignment With High Score Accuracy and High Throughput*, 32(5) *Nucleic Acids Res.* 1792-1797(2004)] 참고; 및 DIALIGN-T, 예로 [Amarendran R Subramanian 등, *DIALIGN-T: An Improved Algorithm for Segment-Based Multiple Sequence Alignment*, 6(1) *BMC Bioinformatics* 66(2005)] 참고하라.

본 명세서는 한 개의 아미노산이 또 다른 것으로 치환된 다양한 폴리펩타이드 변이체, 예컨대 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체, 표적화 도메인 변이체, 및 프로테아제 절단 부위 변이체를 기재하고 있다. 치환은 다양한 요인, 예컨대 치환된 아미노산의 물리적 특성(표 2) 또는 원래

아미노산이 치환을 얼마나 관용할 수 있는지(표 3)에 의해 평가할 수 있다. 폴리펩타이드 내에서 또 다른 아미노산으로 치환할 수 있는 아미노산의 선택은 당업자에게 공지되어 있다.

표 2. 아미노산 특성	
특성	아미노산
지방족	G, A, I, L, M, P, V
방향족	F, H, W, Y
C-베타 분기쇄	I, V, T
소수성	C, F, I, L, M, V, W
작은 크기, 극성	D, N, P
작은 크기, 비극성	A, C, G, S, T
큰 크기, 극성	E, H, K, Q, R, W, Y
큰 크기, 비극성	F, I, L, M, V
하전	D, E, H, K, R
비하전	C, S, T
음전하	D, E
양전하	H, K, R
산성	D, E
염기성	K, R
아미드	N, Q

표 3. 아미노산 치환

아미노산	선호 치환	중성 치환	비선호 치환
A	G, S, T	C, E, I, K, M, L, P, Q, R, V	D, F, H, N, Y, W
C	F, S, Y, W	A, H, I, M, L, T, V	D, E, G, K, N, P, Q, R
D	E, N	G, H, K, P, Q, R, S, T	A, C, I, L
E	D, K, Q	A, H, N, P, R, S, T	C, F, G, I, L, M, V, W, Y
F	M, L, W, Y	C, I, V	A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T
G	A, S	D, K, N, P, Q, R	C, E, F, H, I, L, M, T, V, W, Y
H	N, Y	C, D, E, K, Q, R, S, T, W	A, F, G, I, L, M, P, V
I	V, L, M	A, C, T, F, Y	D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, W
K	Q, E, R	A, D, G, H, M, N, P, S, T	C, F, I, L, V, W, Y
L	F, I, M, V	A, C, W, Y	D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T
M	F, I, L, V	A, C, R, Q, K, T, W, Y	D, E, G, H, N, P, S
N	D, H, S	E, G, K, Q, R, T	A, C, F, I, L, M, P, V, W, Y
P	—	A, D, E, G, K, Q, R, S, T	C, F, H, I, L, M, N, V, W, Y
Q	E, K, R	A, D, G, H, M, N, P, S, T	C, F, I, L, V, W, Y
R	K, Q	A, D, E, G, H, M, N, P, S, T	C, F, I, L, V, W, Y
S	A, N, T	C, D, E, G, H, K, P, Q, R, T	F, I, L, M, V, W, Y
T	S	A, C, D, E, H, I, K, M, N, P, Q, R, V	F, G, L, W, Y
V	I, L, M	A, C, F, T, Y	D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, W
W	F, Y	H, L, M	A, C, D, E, G, I, K, N, P, Q, R, S, T, V
Y	F, H, W	C, I, L, M, V	A, D, E, G, K, N, P, Q, R, S, T

Matthew J. Betts 및 Robert, B. Russell, Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions, pp. 289-316, In Bioinformatics for Geneticists, (eds Michael R. Barnes, Ian C. Gray, Wiley, 2003).

따라서 일 구현예에서, 본 명세서에 개시된 TVEMP는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함한다. 본 구현예의 한 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인은 천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체, 예컨대 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 이소형 또는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 서브타입을 포함한다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인은 비천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체, 예컨대 보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체, 비-보존적 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 변이체, 활성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 절편, 또는 이들의 임의 조합을 포함한다.

또 다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 폴리펩타이드 사슬 내 하나의 특정 위치의 소수성 아미노산은 또 다른 소수성 아미노산으로 치환될 수 있다. 소수성 아미노산의 예에는 예로 C, F, I, L, M, V 및 W가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 폴리펩타이드 사슬 내 하나의 특정 위치의 지방족 아미노산은 또 다른 지방족 아미노산으로 치환될 수 있다. 지방족 아미노산의 예에는 예로 A, I, L, P, 및 V가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 폴리펩타이드 사슬 내 하나의 특정 위치의 방향족 아미노산은 또 다른 방향족 아미노산으로 치환될 수 있다. 방향족 아미노산의 예에는 예로 F, H, W 및 Y가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 폴리펩타이드 사슬 내 하나의 특정 위치의 스테킹 아미노산은 또 다른 스테킹 아미노산으로 치환될 수 있다. 스테킹 아미노산의 예에는 예로 F, H, W 및 Y가 포함된다. 본 구현예의 추가적 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 폴리펩타이드 사슬 내 하나의 특정 위치의 극성 아미노산은 또 다른 극성 아미노산으로 치환될 수 있다. 극성 아미노산의 예에는 예로 D, E, K, N, Q, 및 R이 포함된다. 본 구현예의 추가적 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 폴리펩타이드 사슬 내 하나의 특정 위치의 극성이

더 적거나 중간적인 아미노산은 또 다른 극성이 더 적거나 중간적인 아미노산으로 치환될 수 있다. 극성이 더 적거나 중간적인 아미노산의 예에는 예로 A, H, G, P, S, T, 및 Y가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 추가적 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 폴리펩타이드 사슬 내 하나의 특정 위치의 양으로 하전된 아미노산은 또 다른 양으로 하전된 아미노산으로 치환될 수 있다. 양으로 하전된 아미노산의 예에는 예로 K, R, 및 H가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 폴리펩타이드 사슬 내 하나의 특정 위치의 음으로 하전된 아미노산은 또 다른 음으로 하전된 아미노산으로 치환될 수 있다. 음으로 하전된 아미노산의 예에는 예로 D 및 E가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 폴리펩타이드 사슬 내 하나의 특정 위치의 작은 크기의 아미노산은 또 다른 작은 크기의 아미노산으로 치환될 수 있다. 크기가 작은 아미노산의 예에는 예로 A, D, G, N, P, S, 및 T가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인의 폴리펩타이드 사슬 내 하나의 특정 위치의 C-베타 분기형 아미노산은 또 다른 C-베타 분기형 아미노산으로 치환될 수 있다. C-베타 분기형 아미노산의 예에는 예로 I, T 및 V가 포함된다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BoNT/A 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 서열번호: 1의 아미노산 1/2-429를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 천연 생성 BoNT/A 효소 도메인 변이체, 예를 들어, BoNT/A 아이소형으로부터의 효소 도메인 또는 BoNT/A 서브타입으로부터의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 천연 생성 BoNT/A 효소 도메인 변이체, 예를 들어, BoNT/A 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/A 서브타입 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 서열번호: 1의 천연 생성 BoNT/A 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-429, 예를 들어, BoNT/A 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/A 서브타입 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 비천연 생성 BoNT/A 효소 도메인 변이체, 예를 들어, 보존적 BoNT/A 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/A 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/A 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 비천연 생성 BoNT/A 효소 도메인 변이체의 효소 도메인, 예를 들어, 보존적 BoNT/A 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/A 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/A 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/A 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/A 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/A 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 1의 비천연 생성 BoNT/A 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-429를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 효소 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 효소 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 1의 아미노산 1/2-429에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 1의 아미노산 1/2-429에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은, 예를 들어, 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 1의 아미노산 1/2-429에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 1의 아미노산 1/2-429에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 효소 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 효소 도메인에 대해 최대

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/A 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 1의 아미노산 1/2-429에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 1의 아미노산 1/2-429에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BoNT/B 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 서열번호: 6의 아미노산 1/2-436을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 천연 생성 BoNT/B 효소 도메인 변이체, 예를 들어, BoNT/B 아이소형으로부터의 효소 도메인 또는 BoNT/B 서브타입으로부터의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/B 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/B 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 천연 생성 BoNT/B 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/B 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/B 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 6의 천연 생성 BoNT/B 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-436을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/B 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/B 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/B 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/B 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/B 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/B 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/B 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 비천연 생성 BoNT/B 효소 도메인 변이체의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/B 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/B 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/B 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 6의 비천연 생성 BoNT/B 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-436을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 효소 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 효소 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6의 아미노산 1/2-436에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 6의 아미노산 1/2-436에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6의 아미노산 1/2-436에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 효소 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/B 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6의 아미노산 1/2-436에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 6의 아미노산 1/2-436에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BoNT/C1 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 서열번호: 11의 아미노산 1/2-436을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/C1 아이소형으로부터의 효소 도메인 또는 BoNT/C1 서브타입으로부터의 효소 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/C1 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/C1 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/C1 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 천연 생성 BoNT/C1 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/C1 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/C1 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/C1 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/C1 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/C1 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/C1 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/C1 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 비천연 생성 BoNT/C1 효소 도메인 변이체의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/C1 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/C1 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/C1 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 11의 비천연 생성 BoNT/C1 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-436을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 효소 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 효소 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 11의 아미노산 1/2-436에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 11의 아미노산 1/2-436에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 11의 아미노산 1/2-436에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 11의 아미노산 1/2-436에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/C1 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 11의 아미노산 1/2-436에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 11의 아미노산 1/2-436에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BoNT/D 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 서열번호: 13의 아미노산 1/2-436을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/D 아이소형으로부터의 효소 도메인 또는 BoNT/D 서브타입으로부터의 효소 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/D 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/D 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/D 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 천연 생성 BoNT/D 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/D 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/D 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 13의 천

연 생성 BoNT/D 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-436을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/D 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/D 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/D 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/D 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/D 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/D 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/D 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 비천연 생성 BoNT/D 효소 도메인 변이체의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/D 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/D 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/D 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 13의 비천연 생성 BoNT/D 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-436을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 효소 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 효소 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13의 아미노산 1/2-436에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 13의 아미노산 1/2-436에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13의 아미노산 1/2-436에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 13의 아미노산 1/2-436에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 효소 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/D 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13의 아미노산 1/2-436에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 13의 아미노산 1/2-436에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BoNT/E 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 서열번호: 15의 아미노산 1/2-411을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/E 아이소형으로부터의 효소 도메인 또는 BoNT/E 서브타입으로부터의 효소 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/E 효소 도메인 변이체. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은, 예를 들어, BoNT/E 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/E 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 천연 생성 BoNT/E 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/E 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/E 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 15의 천연 생성 BoNT/E 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-411를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/E 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/E 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/E 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/E 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/E 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/E 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/E 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 비천연 생성 BoNT/E 효소 도메인 변이체의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/E 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/E 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/E 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 15의 비천연 생성 BoNT/E 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-411을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 효소 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 효소 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15의 아미노산 1/2-411에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 15의 아미노산 1/2-411에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15의 아미노산 1/2-411에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 효소 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/E 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15의 아미노산 1/2-411에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 15의 아미노산 1/2-411에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BoNT/F 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 서열번호: 18의 아미노산 1/2-428을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/F 아이소형으로부터의 효소 도메인 또는 BoNT/F 서브타입으로부터의 효소 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/F 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/F 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/F 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 천연 생성 BoNT/F 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/F 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/F 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/F 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/F 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/F 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/F 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/F 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 비천연 생성 BoNT/F 효소 도메인 변이체의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/F 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/F 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/F 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 18의 비천연 생성 BoNT/F 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-428을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 효소 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 효소 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18의 아미노산 1/2-428에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 18의 아미노산 1/2-428에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18의 아미노산 1/2-428에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 효소 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/F 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18의 아미노산 1/2-428에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 18의 아미노산 1/2-428에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BoNT/G 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 서열번호: 21의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 서열번호: 21의 아미노산 1/2-4435를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/G 아이소형으로부터의 효소 도메인 또는 BoNT/G 서브타입으로부터의 효소 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/G 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/G 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/G 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 21의 천연 생성 BoNT/G 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예를 들어, BoNT/G 아이소형 효소 도메인 또는 BoNT/G 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 21의 천연 생성 BoNT/G 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-4435를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/G 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/G 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/G 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/G 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/G 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/G 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/G 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 21의 비천연 생성 BoNT/G 효소 도메인 변이체의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/G 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/G 효소 도메인 변이체, 활성 BoNT/G 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 21의 비천연 생성 BoNT/G 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-4435를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 21의 효소 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 21의 효소 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 21의 아미노산 1/2-4435에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 21의 아미노산 1/2-4435에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 21의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 21의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 21의 아미노산 1/2-4435에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 21의 아미노산 1/2-4435에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예

를 들어, 서열번호: 21의 효소 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 21의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/G 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 21의 아미노산 1/2-4435에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 21의 아미노산 1/2-4435에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 TeNT 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, TeNT 효소 도메인은 서열번호: 22의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 서열번호: 22의 아미노산 1/2-438을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, TeNT 아이소형으로부터의 효소 도메인 또는 TeNT으로부터의 효소 도메인 서브타입 과 같은 천연 생성 TeNT 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, TeNT 아이소형 효소 도메인 또는 TeNT 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 22의 천연 생성 TeNT 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, TeNT 아이소형 효소 도메인 또는 TeNT 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 22의 천연 생성 TeNT 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-438을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 TeNT 효소 도메인 변이체, 비-보존적 TeNT 효소 도메인 변이체, 활성 TeNT 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 TeNT 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 TeNT 효소 도메인 변이체, 비-보존적 TeNT 효소 도메인 변이체, 활성 TeNT 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 22의 비천연 생성 TeNT 효소 도메인 변이체의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 TeNT 효소 도메인 변이체, 비-보존적 TeNT 효소 도메인 변이체, 활성 TeNT 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 22의 비천연 생성 TeNT 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-438을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 효소 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 22의 효소 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 아미노산 1/2-438에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 22의 아미노산 1/2-438에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 22의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 아미노산 1/2-438에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 22의 아미노산 1/2-438에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 효소 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 22의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, TeNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 아미노산 1/2-438에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 22의 아미노산 1/2-438에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BaNT 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BaNT 효소 도메인은 서열번호: 23의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 서열번호: 23의 아미노산 1/2-420을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, BaNT 아이소형으로부터의 효소 도메인 또는 BaNT 서브타입으로부터의 효소 도메인과 같은 천연 생성 BaNT 효소 도메

인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, BaNT 아이소형 효소 도메인 또는 BaNT 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 23의 천연 생성 BaNT 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, BaNT 아이소형 효소 도메인 또는 BaNT 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 23의 천연 생성 BaNT 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-420을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BaNT 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BaNT 효소 도메인 변이체, 활성 BaNT 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BaNT 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BaNT 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BaNT 효소 도메인 변이체, 활성 BaNT 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 23의 비천연 생성 BaNT 효소 도메인 변이체의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BaNT 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BaNT 효소 도메인 변이체, 활성 BaNT 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 23의 비천연 생성 BaNT 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-420을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 효소 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 23의 효소 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 아미노산 1/2-420에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 23의 아미노산 1/2-420에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 23의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 아미노산 1/2-420에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 23의 아미노산 1/2-420에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 효소 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 23의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BaNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 아미노산 1/2-420에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 23의 아미노산 1/2-420에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BuNT 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BuNT 효소 도메인은 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 서열번호: 24의 아미노산 1/2-411을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 예를 들어, BuNT 아이소형으로부터의 효소 도메인 또는 BuNT 서브타입으로부터의 효소 도메인과 같은 천연 생성 BuNT 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 예를 들어, BuNT 아이소형 효소 도메인 또는 BuNT 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 천연 생성 BuNT 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은, 예를 들어, BuNT 아이소형 효소 도메인 또는 BuNT 서브타입 효소 도메인과 같은 서열번호: 24의 천연 생성 BuNT 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-411을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BuNT 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BuNT 효소 도메인 변이체, 활성 BuNT 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BuNT 효소 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BuNT 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BuNT 효소 도메인 변이체, 활성 BuNT 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 비천연 생성 BuNT 효소 도메인 변이체의 효소 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 예를 들어, 보존적 BuNT 효소 도메인 변이체, 비-보존적 BuNT 효소 도메인 변이체, 활성 BuNT 효소 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은

서열번호: 24의 비천연 생성 BuNT 효소 도메인 변이체의 아미노산 1/2-411를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 효소 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 효소 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 1/2-411에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 1/2-411에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 1/2-411에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 1/2-411에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 효소 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 효소 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BuNT 효소 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 1/2-411에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 1/2-411에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

"전위 도메인"은 전위 활성을 갖는 클로스트리듐 신경독소 중쇄의 일부분이다. "전위"은 소포막을 통해 폴리펩타이드의 수송을 촉진하는 능력을 의미하고, 이로써 폴리펩타이드의 일부 또는 모두를 세포질에 노출하게된다. 다양한 보툴리눔에서 신경독소 전위는 엔도솜 내의 pH의 감소에 의해 야기되는 중쇄의 알로스테릭(allosteric) 구조 변화를 수행한다. 이러한 구조 변화는 중쇄의 N 말단 반을 수반하고, 그에 의해 매개되며 소포막에서의 기공의 형성으로 귀결되는 것으로 보이며; 이러한 변화는 엔도솜 소포 내로부터 세포질로 단백질 경쇄의 이동을 허용한다. 예를 들어, Lacy, 등, *Nature Struct. Biol.* 5:898-902 (October 1998) 참고하라.

보툴리눔 신경독소 중쇄의 전위 매개 부분의 아미노산 서열은 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있고; 추가로, 전위 활성을 부여하는데 본질적인 것으로 공지된 상기 일부분 내의 아미노산 잔기는 또한 공지되어 있다. 따라서, 예를 들어, 전위 도메인으로서 다양한 파상풍균(*Clostridium tetanus*) 또는 클로스트리듐(*Clostridium*) 보툴리눔 신경독소 서브타입 중 어떤 것의 중쇄의 천연 생성 N-말단 펩타이드 반을 이용하고, 또는 다양한 중쇄의 N-말단 반의 일차 서열을 정렬하고 다양한 중쇄 및 서열들 사이의 보존된 아미노산, 극성, 입체 및 소수성 특징을 기반으로 하는 공통 일차 전위 서열을 선택하여 유사 전위 도메인을 설계하는 것은 당해 분야의 숙련가의 능력 내에 있다.

본 발명의 측면은 부분적으로, 클로스트리듐 독소 전위 도메인을 포함하는 TVEMP을 제공한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "클로스트리듐 독소 전위 도메인"은 클로스트리듐 독소 경쇄 전위를 매개하는 인독시케이션 공정의 전위 단계를 실행할 수 있는 임의의 클로스트리듐 독소 폴리펩타이드를 의미한다. 따라서, 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 막을 관통하는 클로스트리듐 독소 경쇄의 운동을 촉진하고, 세포내 소포에서 세포질로의, 막을 통한 클로스트리듐 독소 경쇄의 운동을 포함한다. 클로스트리듐 독소 전위 도메인의 비제한적인 예는, 예를 들어, BoNT/A 전위 도메인, BoNT/B 전위 도메인, BoNT/C1 전위 도메인, BoNT/D 전위 도메인, BoNT/E 전위 도메인, BoNT/F 전위 도메인, BoNT/G 전위 도메인, TeNT 전위 도메인, BaNT 전위 도메인, 및 BuNT 전위 도메인을 포함한다.

클로스트리듐 독소 전위 도메인은, 비제한적으로, 예를 들어, 클로스트리듐 독소 전위 도메인 아이소형 및 클로스트리듐 독소 전위 도메인 서브타입; 비천연 생성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체, 예를 들어, 보존적

클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체, 비-보존적 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체, 그의 활성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 천연 생성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체를 포함한다.

본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체"는, 천연 생성 또는 비천연 생성이든지, 개시된 참조 서열 (표 1)의 상응하는 영역으로부터의 적어도 하나의 아미노산 변화를 가지며 참조 서열의 상응하는 영역에 대한 동일성이 %로 기재될 수 있는 클로스트리듐 독소 전위 도메인을 의미한다. 명백히 지시되지 않으면, 개시된 구현예를 실시하는데 유용한 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체는 클로스트리듐 독소 경쇄 전위를 증대하는 인독시케이션(intoxication) 공정의 전위 단계를 실행하는 변이체이다. 비제한적인 예로서, BoNT/A 전위 도메인 변이체는 서열번호: 1의 아미노산 455-873와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/B 전위 도메인 변이체는 서열번호: 6의 아미노산 447-860와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/C1 전위 도메인 변이체는 서열번호: 11의 아미노산 454-868과 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/D 전위 도메인 변이체는 서열번호: 13의 아미노산 451-864와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/E 전위 도메인 변이체는 서열번호: 15의 아미노산 427-847와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/F 전위 도메인 변이체는 서열번호: 18의 아미노산 446-865와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BoNT/G 전위 도메인 변이체는 서열번호: 21의 아미노산 451-865와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; TeNT 전위 도메인 변이체는 서열번호: 22의 아미노산 468-881와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; BaNT 전위 도메인 변이체는 서열번호: 23의 아미노산 436-857와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이고; 및 BuNT 전위 도메인 변이체는 서열번호: 24의 아미노산 427-847와 비교하여 예를 들어, 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 같은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가질 것이다.

클로스트리듐 독소의 각 혈청형 내에, 아미노산 서열 및 및 또한 이들 단백질을 인코딩하는 핵산과 어느 정도 차이가 있는 천연 생성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체가 있을 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련가에 의해 인식된다. 예를 들어, 현재 5개의 BoNT/A 서브타입, BoNT/A1, BoNT/A2, BoNT/A3, BoNT/A4, 및 BoNT/A5가 있고, 특정 전위 도메인 서브타입은, 서열번호: 1의 BoNT/A 전위 도메인 서브타입과 비교할 때, 약 85-87% 아미노산 동일성을 보여준다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "천연 생성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체"는 천연 생성 공정으로부터 생성된 임의의 클로스트리듐 독소 전위 도메인을 의미하고, 이 도메인은 비제한적으로, 대안적으로 스플라이싱된 트랜스크립트(transcript)로부터 생성된 클로스트리듐 독소 전위 도메인 아이소형, 자연발생 돌연변이에 의해 생성된 클로스트리듐 독소 전위 도메인 아이소형 및 클로스트리듐 독소 전위 도메인 서브타입을 포함한다. 천연 생성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체는 천연 생성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체가 기반으로 하는 참조 클로스트리듐 독소 전위 도메인과 동일한 방식으로 실질적으로 기능할 수 있고, 본 명세서의 임의 측면에서 참조 클로스트리듐 독소 전위 도메인으로 치환될 수 있다.

천연 생성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체의 비제한적인 예는 예를 들어, BoNT/A 전위 도메인 아이소형, BoNT/B 전위 도메인 아이소형, BoNT/C1 전위 도메인 아이소형, BoNT/D 전위 도메인 아이소형, BoNT/E 전위 도메인 아이소형, BoNT/F 전위 도메인 아이소형, BoNT/G 전위 도메인 아이소형, TeNT 전위 도메인 아이소형, BaNT 전위 도메인 아이소형, 및 BuNT 전위 도메인 아이소형과 같은 클로스트리듐 독소 전위 도메인 아이소형이다. 천연 생성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체의 다른 비제한적인 예는 예를 들어, 서브타입 BoNT/A1, BoNT/A2, BoNT/A3, BoNT/A4, 및 BoNT/A5로부터의 전위 도메인; 바이발런트(bivalent) 서브타입 BoNT/B1, BoNT/B2, BoNT/B 및 비단백 BoNT/B로부터의 전위 도메인; 서브타입 BoNT/C1-1 및 BoNT/C1-2; 서브타입 BoNT/E1, BoNT/E2 및 BoNT/E3으로부터의 전위 도메인; 서브타입 BoNT/F1, BoNT/F2, BoNT/F3으로부터의 전위 도메인; 및 서브타입 BuNT-1 및 BuNT-2로부터의 전위 도메인과 같은 클로스트리듐 독소 전위 도메인 서브타입이다.

본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "비천연 생성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체"는 돌연변이유발 또는 합리적 설계를 사용하는 유전 공학에 의해 생성된 클로스트리듐 독소 전위 도메인 및 화학 합성에 의해 생성된 클로스트리듐 독소 전위 도메인을 비제한적으로 포함하는 인간 조작의 도움으로 생성된 임의의 클로스트리듐 독소 전위 도메인을 의미한다. 비천연 생성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체의 비제한적인 예는 예를 들

어, 보존적 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체, 비-보존적 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체, 및 활성 클로스트리듐 독소 전위 도메인 단편을 포함한다.

본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "보존적 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체"는 참조 클로스트리듐 독소 전위 도메인 서열 (표 1)로부터 최초 아미노산의 특성과 유사한 적어도 하나의 특성을 갖는 아미노산 유사체 또는 또 다른 아미노산에 의해 치환되는 적어도 하나의 아미노산을 갖는 클로스트리듐 독소 전위 도메인을 의미한다. 물성의 예는, 비제한적으로, 유사 크기, 형태학, 변화, 소수성, 친수성, 친지질성, 공유결합 능력, 수소결합 능력, 물리화학적 물성 등, 또는 이의 임의 조합을 포함한다. 보존적 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체는 보존적 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체가 기반으로 하는 참조 클로스트리듐 독소 전위 도메인과 동일한 방식으로 실질적으로 기능할 수 있고, 명세서의 임의의 측면에서 참조 클로스트리듐 독소 전위 도메인으로 치환될 수 있다. 보존적 클로스트리듐 독소 전위 도메인 변이체의 비제한적인 예는, 예를 들어, 보존적 BoNT/A 전위 도메인 변이체, 보존적 BoNT/B 전위 도메인 변이체, 보존적 BoNT/C1 전위 도메인 변이체, 보존적 BoNT/D 전위 도메인 변이체, 보존적 BoNT/E 전위 도메인 변이체, 보존적 BoNT/F 전위 도메인 변이체, 보존적 BoNT/G 전위 도메인 변이체, 보존적 TeNT 전위 도메인 변이체, 보존적 BaNT 전위 도메인 변이체, 및 보존적 BuNT 전위 도메인 변이체를 포함한다.

본 명세서에서 사용된 바와 같이, "비보존적 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체"라는 용어는 하기와 같은 클로스트리듐 독소의 전위 도메인을 나타낸다: 1) 적어도 하나의 아미노산이 비-보존적 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체가 기준으로 하는 참조 클로스트리듐 독소의 전위 도메인에서 결실되거나; 2) 적어도 하나의 아미노산이 비-보존적 클로스트리듐 독소의 전위 도메인이 기준으로 하는 참조 클로스트리듐 독소의 전위 도메인에 추가되거나; 또는 3) 적어도 하나의 아미노산이 참조 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 서열(표 1)의 원래 아미노산의 특성과 유사한 임의의 특성을 공유하지 않는 또 다른 아미노산 또는 아미노산 유사체로 치환됨. 비-보존적 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체는 비-보존적 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체가 기준으로 하는 참조 클로스트리듐 독소의 전위 도메인과 실질적으로 동일한 방식으로 기능할 수 있으며, 본 명세서의 임의의 측면에서 참조 클로스트리듐 독소의 전위 도메인을 치환할 수 있다. 비-보존적 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체의 비제한적 예에는 예로 비-보존적 BoNT/A 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/B 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/C1 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/D 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/E 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/F 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/G 전위 도메인 변이체, 및 비-보존적 TeNT 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BaNT 전위 도메인 변이체, 및 비-보존적 BuNT 전위 도메인 변이체가 포함된다.

본 명세서에서 사용된 바와 같이, "활성 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 절편"이라는 용어는 이들 활성 절편이 표적 세포의 세포내 소포로부터 세포질 내로 LC 방출을 촉진하여 클로스트리듐 독소가 기질을 단백분해하여 절단하는 전체적인 세포성 기전의 실행에 참여할 수 있는 한, 본 명세서의 측면에서 유용할 수 있는 전위 도메인을 포함하는 임의의 다양한 클로스트리듐 독소의 절편을 나타낸다. 클로스트리듐 독소 중쇄의 전위 도메인은 대략 410-430개 아미노산 길이이며, 전위 도메인을 포함한다(표 1). 연구를 통해 클로스트리듐 독소 중쇄의 전위 도메인의 전체 길이가 전위 도메인의 전위 활성화에 필요한 것은 아니라는 것이 나타났다. 즉, 본 구현예의 측면에는 예로 적어도 350, 375, 400, 또는 425개 아미노산 길이의 클로스트리듐 독소의 전위 도메인이 포함된다. 본 구현예의 다른 측면에는 예로 최대 350, 375, 400, 또는 425개 아미노산 길이의 클로스트리듐 독소의 전위 도메인이 계획된다.

전반적 방법, 국소 방법 및 하이브리드 방법, 예컨대 절편 접근 방법을 비제한적으로 포함하는 임의의 다양한 서열 정렬 방법을 이용하여 천연 생성 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체 및 비천연 생성 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체의 동질성 백분율을 결정할 수 있다. 동질성 백분율을 결정하는 프로토콜은 당해분야 숙련자의 범위 내에서 및 본원의 교시로부터 일상적인 절차이다.

따라서 일 구현예에서, 본 명세서에 개시된 TVEMP는 클로스트리듐 독소의 전위 도메인을 포함한다. 본 구현예의 한 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인은 천연 생성 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체, 예컨대 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 이소형 또는 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 서브타입을 포함한다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인은 비천연 생성 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체, 예컨대 보존적 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체, 비-보존적 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 변이체, 활성 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 절편, 또는 이들의 임의 조합을 포함한다.

또 다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인의 폴리펩타이드 사슬에서 하나의 특정 위치의 소수성 아

미노산은 또 다른 소수성 아미노산으로 치환될 수 있다. 소수성 아미노산의 예에는 예로 C, F, I, L, M, V 및 W가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인의 폴리펩타이드 사슬에서 하나의 특정 위치의 지방족 아미노산은 또 다른 지방족 아미노산으로 치환될 수 있다. 지방족 아미노산의 예에는 예로 A, I, L, P, 및 V가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인의 폴리펩타이드 사슬에서 하나의 특정 위치의 방향족 아미노산은 또 다른 방향족 아미노산으로 치환될 수 있다. 방향족 아미노산의 예에는 예로 F, H, W 및 Y가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인의 폴리펩타이드 사슬에서 하나의 특정 위치의 스테킹 아미노산은 또 다른 스테킹 아미노산으로 치환될 수 있다. 스테킹 아미노산의 예에는 예로 F, H, W 및 Y가 포함된다. 본 구현예의 추가적 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인의 폴리펩타이드 사슬에서 하나의 특정 위치의 극성 아미노산은 또 다른 극성 아미노산으로 치환될 수 있다. 극성 아미노산의 예에는 예로 D, E, K, N, Q, 및 R이 포함된다. 본 구현예의 추가적 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인의 폴리펩타이드 사슬에서 하나의 특정 위치의 극성이 더 적거나 중간적인 아미노산은 또 다른 극성이 더 적거나 중간적인 아미노산으로 치환될 수 있다. 극성이 더 적거나 중간적인 아미노산의 예에는 예로 A, H, G, P, S, T, 및 Y가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 추가적 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인의 폴리펩타이드 사슬에서 하나의 특정 위치의 양으로 하전된 아미노산은 또 다른 양으로 하전된 아미노산으로 치환될 수 있다. 양으로 하전된 아미노산의 예에는 예로 K, R, 및 H가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인의 폴리펩타이드 사슬에서 하나의 특정 위치의 음으로 하전된 아미노산은 또 다른 음으로 하전된 아미노산으로 치환될 수 있다. 음으로 하전된 아미노산의 예에는 예로 D 및 E가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인의 폴리펩타이드 사슬에서 하나의 특정 위치의 작은 크기의 아미노산은 또 다른 작은 크기의 아미노산으로 치환될 수 있다. 작은 크기의 아미노산의 예에는 예로 A, D, G, N, P, S, 및 T가 포함된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인의 폴리펩타이드 사슬에서 하나의 특정 위치의 C-베타 분기형 아미노산은 또 다른 C-베타 분기형 아미노산으로 치환될 수 있다. C-베타 분기형 아미노산의 예에는 예로 I, T 및 V가 포함된다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BoNT/A 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 서열번호: 1의 아미노산 455-873을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/A 아이소형으로부터의 전위 도메인 또는 BoNT/A 서브타입으로부터의 전위 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/A 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/A 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/A 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 천연 생성 BoNT/A 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/A 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/A 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 1의 천연 생성 BoNT/A 전위 도메인 변이체의 아미노산 455-873을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/A 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/A 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/A 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/A 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은, 예를 들어, 보존적 BoNT/A 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/A 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/A 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 비천연 생성 BoNT/A 전위 도메인 변이체의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은, 예를 들어, 보존적 BoNT/A 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/A 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/A 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 1의 비천연 생성 BoNT/A 전위 도메인 변이체의 아미노산 455-873을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 전위 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 전위 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 1의 아미노산 455-873에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 1의 아미노산 455-873에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 전위 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 1의 아미노산 455-873에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

호: 4, 또는 서열번호: 5의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 1의 아미노산 455-873에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 1의 아미노산 455-873에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 전위 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/A 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 1의 아미노산 455-873에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 1의 아미노산 455-873에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BoNT/B 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 서열번호: 6의 아미노산 447-860. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/B 아이소형으로부터의 전위 도메인 또는 BoNT/B 서브타입으로부터의 전위 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/B 전위 도메인 변이체. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/B 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/B 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 천연 생성 BoNT/B 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/B 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/B 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 6의 천연 생성 BoNT/B 전위 도메인 변이체의 아미노산 447-860을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/B 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/B 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/B 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/B 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/B 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/B 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/B 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 비천연 생성 BoNT/B 전위 도메인 변이체의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/B 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/B 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/B 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 6의 비천연 생성 BoNT/B 전위 도메인 변이체의 아미노산 447-860을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 전위 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 전위 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6의 아미노산 447-860에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 6의 아미노산 447-860에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6의 아미노산 447-860에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 6의 아

미노산 447-860에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 전위 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 6, 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 9, 또는 서열번호: 10의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/B 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 6의 아미노산 447-860에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 6의 아미노산 447-860에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BoNT/C1 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 서열번호: 11의 아미노산 454-868을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/C1 아이소형으로부터의 전위 도메인 또는 BoNT/C1 서브타입으로부터의 전위 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/C1 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/C1 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/C1 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 천연 생성 BoNT/C1 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/C1 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/C1 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 11의 천연 생성 BoNT/C1 전위 도메인 변이체의 아미노산 454-868을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/C1 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/C1 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/C1 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/C1 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/C1 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/C1 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/C1 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 비천연 생성 BoNT/C1 전위 도메인 변이체의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/C1 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/C1 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/C1 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 11의 비천연 생성 BoNT/C1 전위 도메인 변이체의 아미노산 454-868을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 전위 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 전위 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 11의 아미노산 454-868에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 11의 아미노산 454-868에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 11의 아미노산 454-868에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 11의 아미노산 454-868에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 전위 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 11 또는 서열번호: 12의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/C1 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 11의 아미노산 454-868에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 11의 아미노산 454-868에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100

개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BoNT/D 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 서열번호: 13의 아미노산 451-864을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/D 아이소형으로부터의 전위 도메인 또는 BoNT/D 서브타입으로부터의 전위 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/D 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/D 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/D 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 천연 생성 BoNT/D 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/D 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/D 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 13의 천연 생성 BoNT/D 전위 도메인 변이체의 아미노산 451-864를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/D 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/D 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/D 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/D 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/D 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/D 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/D 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 비천연 생성 BoNT/D 전위 도메인 변이체의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/D 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/D 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/D 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 13의 비천연 생성 BoNT/D 전위 도메인 변이체의 아미노산 451-864을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 전위 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 전위 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13의 아미노산 451-864에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 13의 아미노산 451-864에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13의 아미노산 451-864에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 13의 아미노산 451-864에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 전위 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 13 또는 서열번호: 14의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/D 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 13의 아미노산 451-864에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 13의 아미노산 451-864에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BoNT/E 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 서열번호: 15의 아미노산 427-847을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/E 아이소형으로부터의 전위 도메인 또는 BoNT/E 서브타입으로부터의 전위 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/E 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/E 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/E 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 천연 생성 BoNT/E 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/E 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/E 서브타입 전위

도메인과 같은 서열번호: 15의 천연 생성 BoNT/E 전위 도메인 변이체의 아미노산 427-847를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/E 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/E 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/E 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/E 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/E 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/E 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/E 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 비천연 생성 BoNT/E 전위 도메인 변이체의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/E 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/E 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/E 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 15의 비천연 생성 BoNT/E 전위 도메인 변이체의 아미노산 427-847을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 전위 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 전위 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15의 아미노산 427-847에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 15의 아미노산 427-847에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15의 아미노산 427-847에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15, 서열번호: 16, 또는 서열번호: 17의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/E 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 15의 아미노산 427-847에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 15의 아미노산 427-847에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BoNT/F 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 서열번호: 18의 아미노산 446-865을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/F 아이소형으로부터의 전위 도메인 또는 BoNT/F 서브타입으로부터의 전위 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/F 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/F 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/F 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 천연 생성 BoNT/F 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/F 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/F 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 18의 천연 생성 BoNT/F 전위 도메인 변이체의 아미노산 446-865를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/F 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/F 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/F 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/F 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/F 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/F 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/F 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 비천연 생성 BoNT/F 전위 도메인 변이체의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/F 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/F 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/F 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과

같은 서열번호: 18의 비천연 생성 BoNT/F 전위 도메인 변이체의 아미노산 446-865를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 전위 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 전위 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18의 아미노산 446-865에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 18의 아미노산 446-865에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18의 아미노산 446-865에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 18의 아미노산 446-865에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 전위 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 18, 서열번호: 19, 또는 서열번호: 20의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/F 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 18의 아미노산 446-865에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 18의 아미노산 446-865에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BoNT/G 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 서열번호: 21의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 서열번호: 21의 아미노산 451-865을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/G 아이소형으로부터의 전위 도메인 또는 BoNT/G 서브타입으로부터의 전위 도메인과 같은 천연 생성 BoNT/G 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/G 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/G 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 21의 천연 생성 BoNT/G 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, BoNT/G 아이소형 전위 도메인 또는 BoNT/G 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 21의 천연 생성 BoNT/G 전위 도메인 변이체의 아미노산 451-865를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/G 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/G 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/G 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BoNT/G 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/G 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/G 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/G 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 21의 비천연 생성 BoNT/G 전위 도메인 변이체의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BoNT/G 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BoNT/G 전위 도메인 변이체, 활성 BoNT/G 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 21의 비천연 생성 BoNT/G 전위 도메인 변이체의 아미노산 451-865를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 21의 전위 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 21의 전위 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 21의 아미노산 451-865에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 21의 아미노산 451-865에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 21의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 21의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 21의 아미노산 451-865에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 21의 아미노산 451-865에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 21의 전위 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 21의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BoNT/G 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 21의 아미노산 451-865에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 21의 아미노산 451-865에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 TeNT 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, TeNT 전위 도메인은 서열번호: 22의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 서열번호: 22의 아미노산 468-881을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, TeNT 아이소형으로부터의 전위 도메인 또는 TeNT 서브타입으로부터의 전위 도메인과 같은 천연 생성 TeNT 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, TeNT 아이소형 전위 도메인 또는 TeNT 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 22의 천연 생성 TeNT 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, TeNT 아이소형 전위 도메인 또는 TeNT 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 22의 천연 생성 TeNT 전위 도메인 변이체의 아미노산 468-881을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 TeNT 전위 도메인 변이체, 비-보존적 TeNT 전위 도메인 변이체, 활성 TeNT 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 TeNT 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 TeNT 전위 도메인 변이체, 비-보존적 TeNT 전위 도메인 변이체, 활성 TeNT 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 22의 비천연 생성 TeNT 전위 도메인 변이체의 아미노산 468-881을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 TeNT 전위 도메인 변이체, 비-보존적 TeNT 전위 도메인 변이체, 활성 TeNT 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 22의 비천연 생성 TeNT 전위 도메인 변이체의 아미노산 468-881을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 전위 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 22의 전위 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 아미노산 468-881에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 22의 아미노산 468-881에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 22의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 아미노산 468-881에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 22의 아미노산 468-881에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 전위 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 22의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, TeNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 22의 아미노산 468-881에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는

치환; 또는 서열번호: 22의 아미노산 468-881에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BaNT 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BaNT 전위 도메인은 서열번호: 23의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 서열번호: 23의 아미노산 436-857을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, BaNT 아이소형으로부터의 전위 도메인 또는 BaNT 서브타입으로부터의 전위 도메인 과 같은 천연 생성 BaNT 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, BaNT 아이소형 전위 도메인 또는 BaNT 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 23의 천연 생성 BaNT 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, BaNT 아이소형 전위 도메인 또는 BaNT 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 23의 천연 생성 BaNT 전위 도메인 변이체의 아미노산 436-857을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BaNT 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BaNT 전위 도메인 변이체, 활성 BaNT 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BaNT 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BaNT 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BaNT 전위 도메인 변이체, 활성 BaNT 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 23의 비천연 생성 BaNT 전위 도메인 변이체의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BaNT 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BaNT 전위 도메인 변이체, 활성 BaNT 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 23의 비천연 생성 BaNT 전위 도메인 변이체의 아미노산 436-857을 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 전위 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 23의 전위 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 아미노산 436-857에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 23의 아미노산 436-857에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 23의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 아미노산 436-857에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 23의 아미노산 436-857에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 전위 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 23의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BaNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 23의 아미노산 436-857에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 23의 아미노산 436-857에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BuNT 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 측면에서, BuNT 전위 도메인은 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 전위 도메인을 포함한다. 이 구현예의 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 서열번호: 24의 아미노산 427-847을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, BuNT 아이소형으로부터의 전위 도메인 또는 BuNT 서브타입으로부터의 전위 도메인 과 같은 천연 생성 BuNT 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, BuNT 아이소형 전위 도메인 또는 BuNT 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 천연 생성 BuNT 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, BuNT 아이소형 전위 도메인 또는 BuNT 서브타입 전위 도메인과 같은 서열번호: 24의 천연 생성 BuNT 전위 도메인 변이체의 아미노산 427-847을 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, 보존적

BuNT 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BuNT 전위 도메인 변이체, 활성 BuNT 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 비천연 생성 BuNT 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BuNT 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BuNT 전위 도메인 변이체, 활성 BuNT 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 비천연 생성 BuNT 전위 도메인 변이체를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, 보존적 BuNT 전위 도메인 변이체, 비-보존적 BuNT 전위 도메인 변이체, 활성 BuNT 전위 도메인 단편, 또는 이의 임의 조합과 같은 서열번호: 24의 비천연 생성 BuNT 전위 도메인 변이체의 아미노산 427-847를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 전위 도메인에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 전위 도메인에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 427-847에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 427-847에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90%, 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

이 구현예의 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 427-847에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 427-847에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 전위 도메인에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 전위 도메인에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 추가 다른 측면에서, BuNT 전위 도메인은 예를 들어, 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 427-847에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 24 또는 서열번호: 25의 아미노산 427-847에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

본 명세서의 측면은, 부분적으로, 표적화 도메인을 포함하는 TVEMP을 제공한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "표적화 도메인"은 "결합 도메인", "리간드", 또는 "표적화 모이어티"와 유사어이고, 아미노산 서열 영역은 바람직하게는, 생리적 조건 하에서 표적 세포를 특징으로 하는, 수용체와 같은 세포 표면 마커에 결합한다. 상기 세포 표면 마커는 폴리 펩타이드, 다당류, 지질, 당단백질, 지질단백질을 포함할 수 있고, 또는 이들 중 하나 이외의 구조 특징을 가질 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "바람직하게는 작용하는"은 다른 비-표적 세포 표면 마커에 대해 통계적으로 상당히 큰 정도로, 생리적 조건, 또는 거의 실질적 생리적 조건인 시험관내 조건 하에서 표적 세포 표면 마커에 결합할 수 있는 분자를 의미한다. 본 명세서에 개시된 표적화 도메인에 대해, 다른 수용체에 대한 동족 수용체에 대한 표적화 도메인의 차별적인 결합이 있다. 결합 도메인의 예는 하기에 기재되어 있다: 예를 들어, Steward, L.E. 등, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capability and Enhanced Targeting Activity, 미국 특허 출원 No. 11/776,043 (Jul. 11, 2007); Steward, L.E. 등, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells, 미국 특허 출원 No. 11/776,052 (Jul. 11, 2007); 및 Steward, L.E. 등, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, 미국 특허 출원 No. 11/776,075 (Jul. 11, 2007), 이들 각각은 그 전체가 참고로 통합되어 있다.

구현예에서, 표적 수용체에 선택적으로 결합하는 결합 도메인은, 예를 들어 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 1000, 적어도 10,000, 또는 적어도 100,000배까지 비-표적 수용체에 대해 표적 수용체를 위해 더 큰 해리평형상수 (K_D)를 갖는다.

본 명세서에 개시된 표적화 도메인의 예는 오피오이드(opioid) 펩타이드 표적화 도메인이다. 오피오이드 펩타이드 표적화 도메인의 비제한적인 예는 엔케팔린(enkephalin), 소 부신수질(adrenomedullary)-22(BAM22) 펩타이드, 엔도모르핀(endomorphin), 엔도르핀(endorphin), 다이노르핀(dynorphin), 노시셉틴(nociceptin) 또는 헤모르핀(hemorphin)을 포함한다.

오피오이드는 혈관형성을 조절하는 것으로 알려져 왔다(전체가 참조로써 통합되어 있는 Y. L. Chen, et al., *The Other Side of the Opioid Story: Modulation of Cell Growth and Survival Signaling Current Medicinal Chemistry*, 15: 772-778 (2008)). 예를 들어, 오피오이드는 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR)-매개 신호전달 경로를 통해 세포 증식을 조절하는 것으로 보인다. 오피오이드 효능제(agonist)에 의한 MOR의 자극은 혈관형성에서의 두 개의 핵심 요소인, 인간 내피 세포(EC) 증식 및 이동에 영향을 미친다. 또한, μ -오피오이드 효능제는 간세포-유래 암 세포주 HepG2로부터 세포 증식을 억제하고 세포에서의 세포사멸을 유도한다. 오피오이드-매개 세포 증식 및 생존은 아마도 MAPK 및 PI3K/Akt 신호전달 경로의 오피오이드 수용체-매개 직접적 활성화를 통해 조절된다. 예를 들어, 오피오이드는 오피오이드 뿐만 아니라 다른 막-수용체 시스템과의 상호작용을 통해, 유방, 전립선, 폐, 신장, 및 내장을 포함하는 다양한 시스템에서 세포 증식을 감소시킨다.

엔케팔린은 전구체 단백질 프로엔케팔린으로부터 유래되는 오피오이드 펩타이드 계열이다. met-엔케팔린 펩타이드 역시 전구체 엔도르핀(즉, POMC)으로부터 유래되며, leu-엔케팔린 펩타이드 역시 프로다이노르핀으로부터 유래된다. 엔케팔린 펩타이드에 대한 G-단백질-결합된 수용체는 δ -오피오이드 수용체(DOR)이다.

소 부신수질 22(BAM22) 펩타이드는 DOR, MOR 및 Mas-관련 G-단백질 결합된 수용체 멤버 X1 및 X7(MrgX1 및 MergX7)로도 알려진 감각 뉴런-특이적 G 단백질-결합된 수용체 3 및 4(SNSR3 및 SNSR4)에 대해 높은 친화성을 갖는다(Lembo, et al., *Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs*, *Nat. Neurosci.* 5: 210-209 (2002)). BAM 12는 엔도텔린-전환 효소-2(ECE-2)에 의하여 BAM22로부터 생성된다. BAM 12는 BAM22의 MOR 선택성과는 대조를 보이는 KOR 선택성을 나타낸다(N. Mzhavia, et al. *Characterization of endothelin-converting enzyme-2. Implication for a role in the nonclassical processing of regulatory peptides*. *J. Biol. Chem.* 278(17): 14704-14711 (2003)).

엔도모르핀은 테트라펩타이드 엔도모르핀-1(Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) 및 엔도모르핀-2를 포함하는 오피오이드 펩타이드의 계열이다. 엔도모르핀은 μ 오피오이드 수용체(MOR)에 대해 높은 친화성 및 특이성을 나타낸다.

엔도르핀은 또한 부신피질자극 호르몬(ACTH)에 대한 전구체 호르몬인 전구체 단백질 프로-오피오멜라노코르틴(pro-opiomelanocortin, POMC)으로부터 유래된 오피오이드 펩타이드 계열이다. 엔도르핀은 엔도르핀- α , 네오엔도르핀- α , 엔도르핀- β , 네오엔도르핀- β 또는 엔도르핀- γ 를 포함한다. β -엔도르핀은 μ 1 오피오이드 수용체(MOR1)에 대해 가장 높은 친화성을 가지며, μ 2(MOR2) 및 δ 오피오이드 수용체(DOR)에 대해 약간 더 낮은 친화성을 가지고, κ 1 오피오이드 수용체(KOR1)에 대해 낮은 친화성을 갖는다.

다이노르핀은 전구체 단백질 프로다이노르핀으로부터 유래된 오피오이드 펩타이드의 계열이다. 프로다이노르핀이 전구단백질 전환효소 2(PC2)에 의해 가공 중에 절단될 때, 많은 활성 펩타이드가 방출된다: 다이노르핀 A, 다이노르핀 B, 및 α/β -네오-엔도르핀(Day R, Lazure C, Basak A, Boudreault A, Limperis P, Dong W, Lindberg I (January 1998). "Prodynorphin processing by proprotein convertase 2. Cleavage at single basic residues and enhanced processing in the presence of carboxypeptidase activity". *J. Biol. Chem.* 273 (2): 829-36). 때때로, 프로다이노르핀은 완전히 가공되지 않아 "큰 다이노르핀"을 방출시킨다. 이러한 32-아미노산 분자는 다이노르핀 A 및 다이노르핀 B으로 구성된다(Nyberg F, Hallberg M (2007). "Neuropeptides in hyperthermia". *Prog. Brain Res.* 162: 277-93). 다이노르핀은 G-단백질-결합된 수용체인 κ -오피오이드 수용체(KOR)를 통해 주로 효과를 발휘한다. KOR의 두 가지 하위유형이 확인되었다: K1 및 K2. KOR은 모든 다이노르핀에 대한 일차적인 수용체임에도 불구하고, 상기 펩타이드는 μ -오피오이드 수용체(MOR), δ -오피오이드 수용체(DOR), N-메틸-D-아스파르트산(NMDA)-타입 글루타메이트 수용체에 대해 약간의 친화도를 갖는다. 상이한 다이노르핀들이 상이한 수용체 선택성 및 수용체에서의 효능을 나타낸다. 큰 다이노르핀 및 다이노르핀 A는 인간 KOR에 대해 동일한 선택성을 갖지만, 다이노르핀 A는 큰 다이노르핀과 비교하여 MOR 및 DOR보다 KOR에 대해 더 선택적이다. 큰 다이노르핀은 다이노르핀 A보다 KOR에서 더 강력하다. 큰 다이노르핀 및 다이노르핀 A 모두 다이노르핀 B보다 더 강력하고 더 선택적이다.

노시셉틴은 전구체 단백질 프레프로노시셉틴(prepronociceptin)으로부터 유래된 오피오이드 펩타이드의 계열이다. 노시셉틴은 노시셉틴을 포함한다(orphanin FQ, nocistatin, and NocII. Okuda-Ashitaka E, Minami T, Tachibana S, Yoshihara Y, Nishiuchi Y, Kimura T, Ito S. "Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin

action in pain transmission." *Nature*. 1998 Mar 19; 392(6673):286-289). 노시셉틴은 주로 오피오이드-수용체 유사 1(OPRL1) G-단백질-결합된 수용체를 통하여 효과를 발휘한다.

헤모르핀 펩타이드는 안지오텐신 AT4 수용체(AT4R) 및 G-단백질 결합된 수용체 붐베신 수용체 하위유형 3(hBRS-3)에 특이적으로 결합한다. 예컨대, 문헌[I. Moeller, et al., The globin fragment LVV-hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT4 receptor in the brain, *J. Neurochem.* 68(6): 2530-2537 (1997)]을 참조한다.

오피오이드 수용체는 몇 가지 상이한 유형의 암세포의 표면상에서 검출되어 왔다. 예를 들어, MOR은 전립선암, 유방암, 만성 골수성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 급성 골수아구성 백혈병, 다발성 골수종, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐암, 신경아세포종, 위암, 결장암, 악성 흑색종, 교아종, 구강 편평세포암, 간암, 및 기형암종에서 발현된다. 예컨대, 문헌[M. Kampa, et al., Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 335: 255-265 (1997); K. Gupta, et al., Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth, *Cancer Res.* 62(15): 4491-4498 (2002); I. Tegeder, et al., G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation, *Cancer Res.* 63(8): 1846-1852 (2003); G.G. Page, et al., Morphine attenuates surgery-induced enhancement of metastatic colonization in rats, *Pain* 54(4): 21-28 (1993); M.G. Sergeeva, et al., Morphine effect on proliferation of normal and tumor cells of immune origin, *Immunol. Lett.* 36(2): 215-218 (1993); N. Sueoka, et al., Anti-cancer effects of morphine through inhibition of tumour necrosis factor- α release and mRNA expression, *Carcinogenesis* 17(11): 2337-2341 (1996); E. Sueoka, et al., Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF- κ B activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252(3): 566-570 (1998); C. Kerros, et al., Reduction of cell proliferation and potentiation of Fas-induced apoptosis by the selective kappa-opioid receptor agonist U50 488 in the multiple myeloma LP-1 cells, *J. Neuroimmunol.* 220(1-2): 69-78 (2010); M.F. Melzig, et al., Beta-endorphin stimulates proliferation of small cell lung carcinoma cells in vitro via nonopioid binding sites, *Exp. Cell Res.* 219(2): 471-476 (1995); R. Maneckjee and J.D. Minna, Nonconventional opioid binding sites mediate growth inhibitory effects of methadone on human lung cancer cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 89(4): 1169-1173 (1992); C. Fimiani, et al., Mu3 opiate receptor expression in lung and lung carcinoma: ligand binding and coupling to nitric oxide release, *Cancer Lett* 146(1): 45-51 (1999); R. Maneckjee and J.D. Minna, Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(9):3294-3298 (1990); I. Madar, et al., Imaging delta- and mu-opioid receptors by PET in lung carcinoma patients, *J. Nucl. Med.* 48(2): 207-213 (2007); M. Iglesias, et al., Mu-opioid receptor activation prevents apoptosis following serum withdrawal in differentiated SH-SY5Y cells and cortical neurons via phosphatidylinositol 3-kinase, *Neuropharmacology* 44:482-492 (2003); T. Ono, et al., Positive transcriptional regulation of the human micro opioid receptor gene by poly(ADP-ribose) polymerase-1 and increase of its DNA binding affinity based on polymorphism of G-172 \rightarrow T, *J. Biol. Chem.* 284(30): 20175-20183 (2009); C.S. Kim, et al., Neuron-restrictive silencer factor (NRSF) functions as a repressor in neuronal cells to regulate the mu opioid receptor gene, *J. Biol. Chem.* 279(45): 46464-46473 (2004); M.P. Yeager and T.A. Colacchio, Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer in vivo, *Arch. Surg.* 126(4): 454-456 (1991); Y. Harimaya, et al., Potential ability of morphine to inhibit the adhesion, invasion and metastasis of metastatic colon 26-L5 carcinoma cells, *Cancer Lett.* 187(1-2): 121-127 (2002); T. Sasamura, et al., Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation, *Eur. J. Pharmacol.* 441(3): 185-191 (2002); I. Onoprishvili, et al., Interaction between the mu opioid receptor and filamin A is involved in receptor regulation and trafficking, *Mol. Pharmacol.* 64(5): 1092-100 (2003); J. Barg, et al., Opioids inhibit endothelin-mediated DNA synthesis, phosphoinositide turnover, and Ca²⁺ mobilization in rat C6 glioma cells, *J. Neurosci.* 14(10): 5858-5864 (1994); M. Kawase, et al., Cell death-inducing activity of opiates in human oral tumor cell lines, *Anticancer Res.* 22(1A): 211-214 (2002); Y. L. Chen, et al., The other side of the opioid story: modulation of cell growth and

survival signaling, *Current Medicinal Chemistry* 15(8): 772-778 (2008); and Y. Li, et al., Morphine enhances hepatitis C virus (HCV) replicon expression, *Am. J. Pathol.* 163(3): 1167-1175 (2003)]을 참조한다

또 다른 예로서, KOR은 비인두암(nasopharyngeal carcinoma), 전립선암, 유방암, 림프종, 다발성 골수종, 소세포 폐암, 신경아세포종, 교아종, 및 간암에서 발현된다. 예컨대, 전체가 참조로써 통합되어 있는 문헌[N. Wong, et al., The overexpression of Bcl-2 antagonizes the proapoptotic function of the kappa-opioid receptor, *Ann. N.Y Acad. Sci.* 1010:358-360 (2003); T.D. Moon, The effect of opiates upon prostatic carcinoma cell growth, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 153(2): 722-727 (1988); M. Kampa, et al., Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 335: 255-265 (1997); P. Gharagozlou, et al., Pharmacological profiles of opioid ligands at kappa opioid receptors, *BMC Pharmacol.* 6(3): 1-7 (2006); M. Kampa, et al., Opioids are non-competitive inhibitors of nitric oxide synthase in T47D human breast cancer cells, *Cell Death Differ* 8(9): 943-952 (2001); R. Maneckjee, et al., Binding of opioids to human MCF-7 breast cancer cells and their effects on growth, *Cancer Res* 50(8): 2234-2238 (1990); V.P. Losick and R.R. Isberg, NF-kappaB translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*, *J. Exp. Med.* 203(9): 2177-2189 (2006); C. Kerros, et al., Reduction of cell proliferation and potentiation of Fas-induced apoptosis by the selective kappa-opioid receptor agonist U50 488 in the multiple myeloma LP-1 cells, *J. Neuroimmunol* 220(1-2): 69-78 (2010); R. Maneckjee and J.D. Minna, Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(9):3294-3298 (1990); F.J. Kim, et al., Sigma 1 receptor modulation of G-protein-coupled receptor signaling: potentiation of opioid transduction independent from receptor binding, *Mol. Pharmacol.* 77(4): 695-703 (2010); P. Onali, et al., Direct agonist activity of tricyclic antidepressants at distinct opioid receptor subtypes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332(1): 255-265 (2010); and G. Notas, et al., The inhibitory effect of opioids on HepG2 cells is mediated via interaction with somatostatin receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 555(1): 1-7 (2007)]을 참조한다.

또 다른 예로서, DOR은 전립선암, 유방암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐암, 신경아세포종 및 크롬 친화성 세포종에서 발현된다. 예컨대, 전체가 참조로써 통합되어 있는 문헌[M. Kampa, et al., Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 335: 255-265 (1997); R. Maneckjee, et al., Binding of opioids to human MCF-7 breast cancer cells and their effects on growth, *Cancer Res* 50(8): 2234-2238 (1990); M.J. Campa, et al., Characterization of delta opioid receptors in lung cancer using a novel nonpeptidic ligand, *Cancer Res.* 56(7):1695-1701 (1996); R. Maneckjee and J.D. Minna, Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(9):3294-3298 (1990); I. Madar, et al., Imaging delta- and mu-opioid receptors by PET in lung carcinoma patients, *J. Nucl. Med.* 48(2): 207-213 (2007); G. Wang, et al., Transcriptional regulation of mouse delta-opioid receptor gene by CpG methylation: involvement of Sp3 and a methyl-CpG-binding protein, MBD2, in transcriptional repression of mouse delta-opioid receptor gene in Neuro2A cells, *J. Biol. Chem.* 278(42): 40550-40556 (2003); Q. Wang, et al., Differential modulation of mu- and delta-opioid receptor agonists by endogenous RGS4 protein in SH-SY5Y cells, *J. Biol. Chem.* 284(27): 18357-18367 (2009); I. Lecoq, et al., Different regulation of human delta-opioid receptors by SNC-80 [(+)-4-[(alphaR)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide] and endogenous enkephalins, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310(2): 666-677 (2004); and J.S. Guan, et al., Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia, *Cell* 122(4): 619-631 (2005)]을 참조한다.

또 다른 예로서, OPRL1은 폐암 및 폐선종에서 발현된다. 예컨대, 전체가 참조로써 통합되어 있는 문헌[K. Iwanaga, et al., Pten inactivation accelerates oncogenic K-ras-initiated tumorigenesis in a mouse model of lung cancer, *Cancer Res.* 68(4): 1119-1127 (2008); and A.E. Bonner, et al., Molecular profiling of mouse lung tumors: association with tumor progression, lung development, and human lung

adenocarcinomas, *Oncogene* 23(5): 1166-1176 (2004)]을 참조한다.

추가적 예로서, BRS3 및 AT4R은 폐암 및 고환암에서 발현된다. 예컨대, 전체가 참조로써 통합되어 있는 문헌[H-P, Lammerich, et al., Identification and functional characterization of hemorphins VV-H-8 and LVV-H-7 as low-affinity agonists for the orphan bombesin receptor subtype 3, *Br. J. Pharmacol.* 138: 1431-1440 (2003); and J. Lee, et al., Structure-activity study of LVV-Hemorphin-7: Angiotensin AT4 receptor ligand and inhibitor of insulin-regulated aminopeptidase, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305(1): 205-211 (2003)]을 참조한다.

그와 같이, 오피오이드 펩타이드 표적화 도메인을 포함하는 TVEMP는 전립선암, 유방암, 만성 골수성 백혈병, 전 골수구성 백혈병, 급성 골수아구성 백혈병, 림프종, 다발성 골수종, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐암, 폐선종, 비인두암, 신경아세포종, 크롬 친화성 세포종, 위암, 결장암, 악성 흑색종, 교아종, 구강 편평세포암, 간암, 및/또는 기형암종을 포함하는, 암을 치료하는데 효과적일 것이다.

따라서, 하나의 구현예에서, 표적화 도메인은 오피오이드 펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 오피오이드 펩타이드 표적화 도메인은 엔케팔린 펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 양상에서, 엔케팔린 펩타이드 표적화 도메인은 Leu-엔케팔린, Met-엔케팔린, Met-엔케팔린 MRGL 또는 Met-엔케팔린 MRF를 포함한다. 이 구현예의 다른 양상에서, 엔케팔린 표적화 도메인은 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 84 또는 서열번호: 85를 포함한다.

이 구현예의 다른 양상에서, 엔케팔린 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 84 또는 서열번호: 85에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 84 또는 서열번호: 85에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90% 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 양상에서, 엔케팔린 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 84 또는 서열번호: 85에 대해 적어도 1, 2, 또는 3개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 84 또는 서열번호: 85에 대해 최대 1, 2, 또는 3개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 양상에서, 엔케팔린 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 84 또는 서열번호: 85에 대해 적어도 1, 2, 또는 3개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 84 또는 서열번호: 85에 대해 최대 1, 2, 또는 3개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 오피오이드 펩타이드 표적화 도메인은 소 부신수질-22 (BAM22) 펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 양상에서, BAM22 펩타이드 표적화 도메인은 BAM22 펩타이드 (1-12), BAM22 펩타이드 (6-22), BAM22 펩타이드 (8-22) 또는 BAM22 펩타이드 (1-22)를 포함한다. 이 구현예의 다른 양상에서, BAM22 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 86의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 87의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 88의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 89의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 90의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22 또는 서열번호: 91의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22을 포함한다.

이 구현예의 다른 양상에서, BAM22 펩타이드 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 86의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 87의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 88의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 89의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 90의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22 또는 서열번호: 91의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 86의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 87의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 88의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 89의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 90의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22 또는 서열번호: 91의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90% 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 양상에서, 엔도르핀 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 94, 서열번호: 95, 서열번호: 96, 서열번호: 97, 서열번호: 98 또는 서열번호: 99에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 94, 서열번호: 95, 서열번호: 96, 서열번호: 97, 서열번호: 98 또는 서열번호: 99에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 오피오이드 펩타이드 다이노르핀 펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 양상에서, 다이노르핀 펩타이드 표적화 도메인은 다이노르핀 A, 다이노르핀 B (류모르핀) 또는 리모르핀을 포함한다. 이 구현예의 다른 양상에서, 다이노르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 100, 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 104, 서열번호: 105, 서열번호: 106, 서열번호: 107, 서열번호: 108, 서열번호: 109, 서열번호: 110, 서열번호: 111, 서열번호: 112, 서열번호: 113, 서열번호: 114, 서열번호: 115, 서열번호: 116, 서열번호: 117, 서열번호: 118, 서열번호: 119, 서열번호: 120, 서열번호: 121, 서열번호: 122, 서열번호: 123, 서열번호: 124, 서열번호: 125, 서열번호: 126, 서열번호: 127, 서열번호: 128, 서열번호: 129 또는 서열번호: 130를 포함한다.

이 구현예의 다른 양상에서, 다이노르핀 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 100, 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 109 또는 서열번호: 125에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 100, 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 109 또는 서열번호: 125에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90% 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 양상에서, 다이노르핀 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 100, 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 109 또는 서열번호: 125에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 100, 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 109 또는 서열번호: 125에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 양상에서, 다이노르핀 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 85, 서열번호: 94 또는 서열번호: 110에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 100, 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 109 또는 서열번호: 125에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 오피오이드 펩타이드 노시셉틴 펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 양상에서, 노시셉틴 펩타이드 표적화 도메인은 노시셉틴 RK, 노시셉틴, 뉴로펩타이드 1, 뉴로펩타이드 2 또는 뉴로펩타이드 3를 포함한다. 이 구현예의 다른 양상에서, 노시셉틴 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 131, 서열번호: 132, 서열번호: 133, 서열번호: 134, 서열번호: 135, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139 또는 서열번호: 140를 포함한다.

이 구현예의 다른 양상에서, 노시셉틴 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 131, 서열번호: 132, 서열번호: 138, 서열번호: 139 또는 서열번호: 140에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 131, 서열번호: 132, 서열번호: 138, 서열번호: 139 또는 서열번호: 140에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90% 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 양상에서, 노시셉틴 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 131, 서열번호: 132, 서열번호: 138, 서열번호: 139 또는 서열번호: 140에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 131, 서열번호: 132, 서열번호: 138, 서열번호: 139 또는 서열번호: 140에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 양상에서, 노시셉틴 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 131, 서열번호: 132, 서열번호: 138, 서열번호: 139 또는 서열번호: 140에 대해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 131, 서열번호: 132, 서열번호: 138, 서열번호: 139 또는 서열번호: 140에 대해 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다른 구현예에서, 오피오이드 펩타이드 헤모르핀 펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 양상에서, 헤모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 LVVH7, VVH7, VH7, H7, LVVH6, LVVH5, VVH5, LVVH4, 및 LVVH3를 포함한다. 이 구현예의 다른 양상에서, 헤모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 141, 서열번호: 142, 서열번호: 143, 서열번호:

144, 서열번호: 145, 서열번호: 146, 서열번호: 147, 서열번호: 148 또는 서열번호: 149를 포함한다.

이 구현예의 다른 양상에서, 헤모르핀 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 141, 서열번호: 142, 서열번호: 143, 서열번호: 144, 서열번호: 145, 서열번호: 146, 서열번호: 147, 서열번호: 148 또는 서열번호: 149에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%; 또는 서열번호: 141, 서열번호: 142, 서열번호: 143, 서열번호: 144, 서열번호: 145, 서열번호: 146, 서열번호: 147, 서열번호: 148 또는 서열번호: 149에 대해 최대 70%, 최대 75%, 최대 80%, 최대 85%, 최대 90% 또는 최대 95%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 양상에서, 헤모르핀 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 141, 서열번호: 142, 서열번호: 143, 서열번호: 144, 서열번호: 145, 서열번호: 146, 서열번호: 147, 서열번호: 148 또는 서열번호: 149에 대해 적어도 1, 2, 또는 3개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 141, 서열번호: 142, 서열번호: 143, 서열번호: 144, 서열번호: 145, 서열번호: 146, 서열번호: 147, 서열번호: 148 또는 서열번호: 149에 대해 최대 1, 2, 또는 3개의 비-인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 구현예의 또 다른 양상에서, 헤모르핀 표적화 도메인은 예를 들어, 서열번호: 141, 서열번호: 142, 서열번호: 143, 서열번호: 144, 서열번호: 145, 서열번호: 146, 서열번호: 147, 서열번호: 148 또는 서열번호: 149에 대해 적어도 1, 2, 또는 3개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환; 또는 서열번호: 141, 서열번호: 142, 서열번호: 143, 서열번호: 144, 서열번호: 145, 서열번호: 146, 서열번호: 147, 서열번호: 148 또는 서열번호: 149에 대해 최대 1, 2, 또는 3개의 인접 아미노산 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

클로스트리듐 독소는 각각 천연 생성 프로테아제에 의해 디설피드 루프 내에서 단백분해 절단에 의해 후속 절단되는 대략 150kDa의 단쇄 폴리펩타이드로 번역된다(도 18). 상기 절단은 디설피드 가교를 형성하는 2개의 시스테인 잔기 사이에 생성된 별개의 이중쇄 루프 영역 내에서 일어난다. 상기 번역 후 처리로 두 사슬 간의 단일 디설피드 결합 및 비-공유 상호작용으로 함께 유지되는 대략 50kDa의 경쇄(LC) 및 대략 100kDa의 중쇄(HC)를 포함하는 이중쇄 분자가 산출된다(도 2). TVEMP의 재조합 생성을 촉진하기 위해, 외인성 프로테아제 절단 부위를 이용하여 본 명세서에 개시된 TVEMP의 단쇄 폴리펩타이드 형태를 이중쇄 형태로 전환할 수 있다. 예로 각각의 전문가 본 명세서에 참조로 도입되는 [Steward, L.E. 등, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Targeting Capabilities For Endogenous Clostridial Toxin Receptor Systems*, 미국 특허 공보 번호 US 2008/0096248(2008.04.24.); Steward, L.E. 등, *Activatable Clostridial Toxins*, 미국 특허 공보 번호 US 2008/0032930(2008.02.07); Steward, 상기, (2007); Dolly, 상기, (2007); Foster, 상기, WO 2006/059093 (2006); 및 Foster, 상기, WO 2006/059105(2006)]를 참고하라.

내인성 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위 및 외인성 프로테아제 절단 부위를 비제한적으로 포함하는 임의의 모든 프로테아제 절단 부위를, 클로스트리듐 독소의 단쇄 폴리펩타이드 형태를 이중쇄 형태로 전환하는데 사용할 수 있음이 계획된다. 따라서 본 발명의 한 측면에 있어서, TVEMP는 부분적으로 이중쇄 루프 영역 내에 내인성 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, TVEMP는 부분적으로 이중쇄 루프 영역 내에 외인성 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "이중쇄 루프 영역"이라는 용어는 클로스트리듐 독소의 단쇄 형태를 이중쇄 형태로 전환하는데 사용되는 프로테아제 절단 부위를 함유하는 클로스트리듐 독소의 아미노산 서열을 의미한다. 클로스트리듐 독소의 이중쇄 루프 영역의 비제한적 예에는 서열번호: 1의 아미노산 430-454를 포함하는 BoNT/A의 이중쇄 루프 영역; 서열번호: 2의 아미노산 437-446을 포함하는 BoNT/B의 이중쇄 루프 영역; 서열번호: 3의 아미노산 437-453을 포함하는 BoNT/C1의 이중쇄 루프 영역; 서열번호: 4의 아미노산 437-450을 포함하는 BoNT/D의 이중쇄 루프 영역; 서열번호: 5의 아미노산 412-426을 포함하는 BoNT/E의 이중쇄 루프 영역; 서열번호: 6의 아미노산 429-445를 포함하는 BoNT/F의 이중쇄 루프 영역; 서열번호: 7의 아미노산 436-450을 포함하는 BoNT/G의 이중쇄 루프 영역; 및 서열번호: 8의 아미노산 439-467을 포함하는 TeNT의 이중쇄 루프 영역(표 4)이 포함된다.

표 4. 클로스트리듐 독소의 이중쇄 루프 영역		
독소	서열 번호:	천연 생성 프로테아제 절단 부위를 함유하는 이중쇄 루프 영역
BoNT/A	26	CVRGIITSKTKSLDKGVNK*----ALNDLC
BoNT/B	27	CKSVK*-----APGIC
BoNT/C1	28	CHKAIDGRSLYNK*-----TLDC
BoNT/D	29	CLRLTKNSR*-----DDSTC
BoNT/E	30	CKNIVSVKGIR*-----KSIC
BoNT/F	31	CKSVIPRKGTK*-----APRLC
BoNT/G	32	CKPVMYKNTGK*-----SEQC
TeNT	33	CKKIIPPTNIRENLNRTA*SLTDLGGELC
BaNT	34	CKS-IVSKKGTK*-----NSLC
BuNT	35	CKN-IVSVKGIR*-----KSIC

나타낸 아미노산 서열은 다음과 같다: BoNT/A, 서열 번호: 1의 잔기 430-454; BoNT/B, 서열 번호: 2의 잔기 437-446; BoNT/C1, 서열 번호: 3의 잔기 437-453; BoNT/D, 서열 번호: 4의 잔기 437-450; BoNT/E, 서열 번호: 5의 잔기 412-426; BoNT/F, 서열 번호: 6의 잔기 429-445; BoNT/G, 서열 번호: 7의 잔기 436-450; TeNT, 서열 번호: 8의 잔기 439-467; BaNT, 서열 번호: 9의 잔기 421-435; 및 BuNT, 서열 번호: 10의 잔기 412-426. 별표(*)는 클로스트리듐 독소 프로테아제에 의해 절단되는 펩티드 결합을 나타낸다.

본 명세서에서 사용된 바와 같이, "내인성 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위"라는 용어는 "천연 생성 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위"와 동의어이며, 천연 생성 클로스트리듐 독소의 이중쇄 루프 영역 내에서 발견되는 천연 생성 프로테아제 절단 부위를 의미하고, 비제한적으로 천연 생성 클로스트리듐 독소의 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위 변이체, 예컨대 클로스트리듐 독소의 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위 이소형 및 클로스트리듐 독소의 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위 서브타입이 포함된다. 내인성 프로테아제 절단 부위의 비제한적 예에는 예로 BoNT/A 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BoNT/B 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BoNT/C1 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BoNT/D 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BoNT/E 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BoNT/F 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BoNT/G 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위 및 TeNT 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위가 포함된다.

상기 언급된 바와 같이, 클로스트리듐 독소는 이후 천연 생성 프로테아제에 의해 디설피드 루프 내에서 단백분해 절단에 의해 절단되는 대략 150kDa의 단쇄 폴리펩타이드로 번역된다. 이 번역 후 처리로 단일 디설피드 결합 및 비공유 상호작용에 의해 함께 유지되는 대략 50kDa의 경쇄(LC) 및 대략 100kDa의 중쇄(HC)를 포함하는 이중쇄 분자가 산출된다. 프로테아제의 정체는 현재 밝혀져 있지 않으나, 여러 클로스트리듐 독소에 대한 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위가 결정되어 있다. BoNT에서, K448-A449에서의 절단은 BoNT/A의 단일 폴리펩타이드 형태를 이중쇄 형태로 전환하며; K441-A442에서의 절단은 BoNT/B의 단일 폴리펩타이드 형태를 이중쇄 형태로 전환하고; K449-T450에서의 절단은 BoNT/C1의 단일 폴리펩타이드 형태를 이중쇄 형태로 전환하고; R445-D446에서의 절단은 BoNT/D의 단일 폴리펩타이드 형태를 이중쇄 형태로 전환하고; R422-K423에서의 절단은 BoNT/E의 단일 폴리펩타이드 형태를 이중쇄 형태로 전환하고; K439-A440에서의 절단은 BoNT/F의 단일 폴리펩타이드 형태를 이중쇄 형태로 전환하고; K446-S447에서의 절단은 BoNT/G의 단일 폴리펩타이드 형태를 이중쇄 형태로 전환한다. A457-S458에서 TeNT의 단일 폴리펩타이드 형태의 단백분해 절단은 이중쇄 형태를 만든다. K431-N432에서 BaNT의 단일 폴리펩타이드 형태의 단백분해 절단은 이중쇄 형태를 만든다. R422-K423에서 BuNT의 단일 폴리펩타이드 형태의 단백분해 절단은 이중쇄 형태를 만든다. 상기 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위는 융합 단백질로서 TVEMP에 프레임이 맞게 작동가능하게 연결된다. 또한 이중쇄 루프 내 추가 절단 부위가 또한 절단되어 소실되는 작은 펩타이드 절편을 생성하는 것으로 나타난다는 것을 주지해야 한다. 비제한적 예로서, BoNT/A 단쇄 폴리펩타이드 절단은 궁극적으로 이중쇄 루프 내 10개 아미노산 절편의 소실을 일으킨다.

따라서, 내인성 클로스트리듐 독소의 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위를 포함하는 프로테아제 절단 부위를 사용하여 단쇄 독소를 이중쇄 형태로 전환한다. 상기 구현예의 측면에 있어서, 단백분해 절단에 의한 이중쇄 형태의 전환은 예로 BoNT/A 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BoNT/B 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BoNT/C1 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BoNT/D 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BoNT/E 이중쇄 루프 프

로테아제 절단 부위, BoNT/F 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BoNT/G 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, TeNT 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, BaNT 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위, 또는 BuNT 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위를 포함하는 부위에서 일어난다.

본 구현예의 다른 측면에 있어서, 단백질 절단에 의한 이중쇄 형태로의 전환은 예로 서열 번호: 1의 아미노산 430-454를 포함하는 BoNT/A의 이중쇄 루프 영역; 서열 번호: 2의 아미노산 437-446을 포함하는 BoNT/B의 이중쇄 루프 영역; 서열 번호: 3의 아미노산 437-453을 포함하는 BoNT/C의 이중쇄 루프 영역; 서열 번호: 4의 아미노산 437-450을 포함하는 BoNT/D의 이중쇄 루프 영역; 서열 번호: 5의 아미노산 412-426을 포함하는 BoNT/E의 이중쇄 루프 영역; 서열 번호: 6의 아미노산 429-445를 포함하는 BoNT/F의 이중쇄 루프 영역; 서열 번호: 7의 아미노산 436-450을 포함하는 BoNT/G의 이중쇄 루프 영역; 서열 번호: 8의 아미노산 439-467을 포함하는 TeNT의 이중쇄 루프 영역; 서열 번호: 9의 아미노산 421-435를 포함하는 BaNT의 이중쇄 루프 영역; 또는 서열 번호: 10의 아미노산 412-426을 포함하는 BuNT의 이중쇄 루프 영역을 포함하는 부위에서 일어난다.

외인성 프로테아제 절단 부위를 사용하여 본 명세서에 개시된 TVEMP의 단쇄 폴리펩타이드 형태를 이중쇄 형태로 전환할 수 있음이 계획된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "외인성 프로테아제 절단 부위"라는 용어는 "비천연 생성 프로테아제 절단 부위" 또는 "비천연 프로테아제 절단 부위"와 동의어이며, 외인성 프로테아제 절단 부위가 본 명세서에 개시된 활성화가능한 폴리펩타이드를 인코딩하는 구축물을 발현하는 숙주 세포 내에서 발현되는 프로테아제에 감수성인 프로테아제 절단 부위 또는 인간 프로테아제 절단 부위가 아닌 한, 천연 생성 클로스트리듐 독소 유래의 이중쇄 루프 영역에는 보통 존재하지 않는 프로테아제 절단 부위를 의미한다. 임의의 모든 외인성 프로테아제 절단 부위를 사용하여 클로스트리듐 독소의 단쇄 폴리펩타이드 형태를 본 발명의 실시 측면에 유용한 이중쇄 형태로 전환할 수 있음이 계획된다. 외인성 프로테아제 절단 부위의 비제한적 예에는 예로 식물 파파인 절단 부위, 곤충 파파인 절단 부위, 갑각류 파파인 절단 부위, 엔테로키나아제 절단 부위, 인간 리노바이러스 3C 프로테아제 절단 부위, 인간 엔테로바이러스 3C 프로테아제 절단 부위, 담배 에치 바이러스(TEV) 프로테아제 절단 부위, 담배맥 모틀링 바이러스(TMV) 절단 부위, 서브틸리신 절단 부위, 히드록실아민 절단 부위, 또는 카스파아제 3 절단 부위가 포함된다.

외인성 프로테아제 절단 부위가 그 각각의 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 한, 임의의 모든 길이의 외인성 프로테아제 절단 부위가 본 발명의 측면에 유용할 수 있다는 것이 포함된다. 따라서 상기 구현예의 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위의 길이는, 예로 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50개, 또는 적어도 60개 아미노산; 또는 최대 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50개, 또는 적어도 60개 아미노산일 수 있다.

일 구현예에서, 외인성 프로테아제 절단 부위는 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치한다. 상기 구현예의 측면에 있어서, TVEMP는 예로 식물 파파인 절단 부위, 곤충 파파인 절단 부위, 갑각류 파파인 절단 부위, 비인간 엔테로키나아제 프로테아제 절단 부위, 담배 에치 바이러스 프로테아제 절단 부위, 담배맥 모틀링 바이러스 프로테아제 절단 부위, 인간 리노바이러스 3C 프로테아제 절단 부위, 인간 엔테로바이러스 3C 프로테아제 절단 부위, 서브틸리신 절단 부위, 히드록실아민 절단 부위, SUMO/ULP-1 프로테아제 절단 부위, 및 비인간 카스파아제 3 절단 부위를 포함하는 외인성 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는 예로 개질 BoNT/A, 개질 BoNT/B, 개질 BoNT/C1, 개질 BoNT/D, 개질 BoNT/E, 개질 BoNT/F, 개질 BoNT/G, 개질 TeNT, 개질 BaNT, 또는 개질 BuNT의 이중쇄 루프 내에 위치한다.

본 구현예의 한 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 비인간 엔테로키나아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 소 엔테로키나아제 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는 서열 번호: 36을 포함하는 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 소 엔테로키나아제 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 소 엔테로키나아제 프로테아제 절단 부위는 예로 개질 BoNT/A, 개질 BoNT/B, 개질 BoNT/C1, 개질 BoNT/D, 개질 BoNT/E, 개질 BoNT/F, 개질 BoNT/G, 개질 TeNT, 개질 BaNT, 또는 개질 BuNT의 이중쇄 루프 내에 위치한다.

본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는 예로 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 담배 에치 바이러스 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는 예로 공통 서열 E-P5-P4-Y-P2-Q^{*}-G(서열 번호: 377) 또는 E-P5-P4-Y-P2-Q^{*}-S(서열 번호: 38)를 포함하는(여기서, P2, P4 및 P5는 임의 아미노산일 수 있다) TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 담배 에치

바이러스 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는 예로 서열 번호: 39, 서열 번호: 40, 서열 번호: 41, 서열 번호: 42, 서열 번호: 43, 서열 번호: 44, 서열 번호: 45, 서열 번호: 46, 서열 번호: 47 또는 서열 번호: 48을 포함하는 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 담배 예치 바이러스 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 담배 예치 바이러스 프로테아제 절단 부위는 예로 개질 BoNT/A, 개질 BoNT/B, 개질 BoNT/C1, 개질 BoNT/D, 개질 BoNT/E, 개질 BoNT/F, 개질 BoNT/G, 개질 TeNT, 개질 BaNT, 또는 개질 BuNT의 이중쇄 루프 내에 위치한다.

본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 담배맥 모듈링 바이러스 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 공통 서열 P6-P5-V-R-F-Q^{*}-G(서열 번호: 49) 또는 P6-P5-V-R-F-Q^{*}-S(서열 번호: 50)를 포함하는(여기서, P5 및 P6은 임의의 아미노산일 수 있다) TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 담배맥 모듈링 바이러스 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 서열 번호: 51, 서열 번호: 52, 서열 번호: 53, 또는 서열 번호: 54를 포함하는 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 담배맥 모듈링 바이러스 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 담배맥 모듈링 바이러스 프로테아제 절단 부위는 예로 개질 BoNT/A, 개질 BoNT/B, 개질 BoNT/C1, 개질 BoNT/D, 개질 BoNT/E, 개질 BoNT/F, 개질 BoNT/G, 개질 TeNT, 개질 BaNT, 또는 개질 BuNT의 이중쇄 루프 내에 위치한다.

본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는 예로 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 인간 리노바이러스 3C 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 공통 서열 P5-P4-L-F-Q^{*}-G-P(서열 번호: 55)를 포함하는(여기서, P4는 G, A, V, L, I, M, S 또는 T이며 P5는 임의의 아미노산일 수 있으나, D 또는 E가 바람직하다) TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 인간 리노바이러스 3C 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 서열 번호: 56, 서열 번호: 57, 서열 번호: 58, 서열 번호: 59, 서열 번호: 60 또는 서열 번호: 61을 포함하는 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 인간 리노바이러스 3C 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는 예로 PRESSION[®]에 의해 절단될 수 있는 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 인간 리노바이러스 3C 프로테아제를 포함할 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 인간 리노바이러스 3C 프로테아제 절단 부위는, 예로 개질 BoNT/A, 개질 BoNT/B, 개질 BoNT/C1, 개질 BoNT/D, 개질 BoNT/E, 개질 BoNT/F, 개질 BoNT/G, 개질 TeNT, 개질 BaNT, 또는 개질 BuNT의 이중쇄 루프 내에 위치한다.

본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 서브틸리신 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 공통 서열 P6-P5-P4-P3-H^{*}-Y(서열 번호: 62) 또는 P6-P5-P4-P3-Y-H^{*}(서열 번호: 63)를 포함하는(여기서, P3, P4 및 P5 및 P6은 임의의 아미노산일 수 있다) TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 서브틸리신 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 서열 번호: 64, 서열 번호: 65, 또는 서열 번호: 66을 포함하는 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 서브틸리신 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 GENENASE[®]에 의해 절단될 수 있는 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 서브틸리신 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 서브틸리신 절단 부위는, 예로 개질 BoNT/A, 개질 BoNT/B, 개질 BoNT/C1, 개질 BoNT/D, 개질 BoNT/E, 개질 BoNT/F, 개질 BoNT/G, 개질 TeNT, 개질 BaNT, 또는 개질 BuNT의 이중쇄 루프 내에 위치한다.

본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 히드록실아민 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 복수의 디펩타이드 N^{*}G를 포함하는 히드록실아민 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 서열 번호: 67, 또는 서열 번호: 68을 포함하는 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 히드록실아민 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 히드록실아민 절단 부위는, 예로 개질 BoNT/A, 개질 BoNT/B, 개질 BoNT/C1, 개질 BoNT/D, 개질 BoNT/E, 개질 BoNT/F, 개질 BoNT/G, 개질 TeNT, 개질 BaNT, 또는 개질 BuNT의 이중쇄 루프 내에 위치한다.

본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는

SUMO/ULP-1 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는 예로 공통 서열 G-G^{*}-P1'-P2'-P3'(서열 번호: 69)을 포함하는(여기서, P1', P2', 및 P3'은 임의의 아미노산일 수 있다) TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 SUMO/ULP-1 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 서열 번호: 70을 포함하는 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 SUMO/ULP-1 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, SUMO/ULP-1 프로테아제 절단 부위는, 예로 개질 BoNT/A, 개질 BoNT/B, 개질 BoNT/C1, 개질 BoNT/D, 개질 BoNT/E, 개질 BoNT/F, 개질 BoNT/G, 개질 TeNT, 개질 BaNT, 또는 개질 BuNT의 이중쇄 루프 내에 위치한다.

본 구현예의 한 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는 예로 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 비인간 카스파아제 3 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 마우스 카스파아제 3 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 공통 서열 D-P3-P2-D^{*}P1'(서열 번호: 71)을 포함하는(여기서, P3는 임의의 아미노산일 수 있으며 E가 바람직하고, P2는 임의의 아미노산일 수 있고, P1'은 임의의 아미노산일 수 있으며 G 또는 S가 바람직하다) TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 비인간 카스파아제 3 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, 외인성 프로테아제 절단 부위는, 예로 서열 번호: 72, 서열 번호: 73, 서열 번호: 74, 서열 번호: 75, 서열 번호: 76, 또는 서열 번호: 77을 포함하는 TVEMP의 이중쇄 루프 내에 위치하는 비인간 카스파아제 3 프로테아제 절단 부위를 포함할 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 소 엔테로키나아제 프로테아제 절단 부위는, 예로 개질 BoNT/A, 개질 BoNT/B, 개질 BoNT/C1, 개질 BoNT/D, 개질 BoNT/E, 개질 BoNT/F, 개질 BoNT/G, 개질 TeNT, 개질 BaNT, 또는 개질 BuNT의 이중쇄 루프 내에 위치한다.

이중쇄 루프 영역을 개질하여 외인성 프로테아제 절단 부위에 대한 천연 생성 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위를 대체한다. 상기 개질에 있어서, 천연 생성 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위는 작동불능으로 되며 이에 따라 그 프로테아제에 의해 절단될 수 없다. 외인성 프로테아제 절단 부위만이 그 대응 외인성 프로테아제로 절단될 수 있다. 이러한 유형의 개질에 있어서, 외인성 프로테아제 부위는 융합 단백질로서 TVEMP로 프레임에 맞춰 작동가능하게 연결되며, 상기 부위는 그 대응 외인성 프로테아제로 절단될 수 있다. 내인성 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위의 외인성 프로테아제 절단 부위로의 대체는 부위의 치환일 수 있으며, 여기서 외인성 부위를 내인성 부위의 절단 부위 위치에 인접한 위치로 조작한다. 내인성 이중쇄 루프 프로테아제 절단 부위의 외인성 프로테아제 절단 부위로의 대체는 외인성 부위의 부가일 수 있으며, 여기서 외인성 부위는 내인성 부위의 절단 부위 위치와 상이한 위치에서 조작되며, 내인성 부위는 작동불능으로 조작된다. 프로테아제 절단 부위의 위치 및 종류는 특정 표적화 도메인이 자유 아미노-말단 또는 카르복실-말단 아미노산을 필요로 하기 때문에 결정적일 수 있다. 예를 들어 펩타이드 표적화 도메인이 두 개의 다른 도메인 사이에 배치되는 경우(예로 도 4참고), 프로테아제 절단 부위의 선택 요인은 그 부위를 절단하는 프로테아제가 플러시 절단을 하여 표적화 도메인의 그 수용체로의 선택적 결합에 필요한 표적화 도메인의 자유 아미노 말단 또는 카르복실 말단을 노출하는지 여부일 수 있다.

천연 생성 프로테아제 절단 부위는 천연 생성 이중쇄 루프 프로테아제에 의해 절단되는 펩타이드 결합에 인접하는 두 아미노산 중 적어도 하나를 변형시켜 작동불능으로 만들 수 있다. 이중쇄 루프 영역의 두 시스테인 잔기가 온전하게 남아 있고 상기 영역이 여전히 디설피드 가교를 형성할 수 있는 한, 보다 광범위한 변형을 만들 수도 있다. 아미노산 변형의 비제한적 예에는 아미노산의 결실 또는 원래 아미노산의 상이한 아미노산으로의 대체가 포함된다. 따라서 일 구현예에서, 천연 생성 프로테아제 절단 부위는 천연 생성 프로테아제에 의해 절단되는 펩타이드 결합에 인접하는 두 아미노산 중 적어도 하나를 포함하는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20개 아미노산을 변형시켜 작동불능으로 된다. 또 다른 구현예에서, 천연 생성 프로테아제 절단 부위는 천연 생성 프로테아제에 의해 절단되는 펩타이드 결합에 인접하는 두 아미노산 중 적어도 하나를 포함하는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20개 아미노산을 변형시켜 작동불능으로 된다.

본 명세서에 개시된 TVEMP는 선택적으로 가요성 스페이서를 포함하는 가요성 영역을 추가로 포함할 수 있음이 이해된다. 가요성 스페이서를 포함하는 가요성 영역을 사용하여 폴리펩타이드의 특징, 기여 또는 특성을 최적화하기 위해 폴리펩타이드 영역의 길이를 조정할 수 있다. 비제한적 예로서, 하나 이상의 가요성 스페이서를 일렬로 포함하는 폴리펩타이드 영역을 사용하여 프로테아제 절단 부위를 더 잘 노출시킴으로써 프로테아제에 의한 상기 부위의 절단을 촉진할 수 있다. 또 다른 비제한적 예로서, 하나 이상의 가요성 스페이서를 일렬로 포함하는 폴리펩타이드 영역을 사용하여 펩타이드 표적화 도메인을 더 잘 제시함으로써 표적화 도메인의 그 수용체로

의 결합을 촉진할 수 있다.

펩타이드를 포함하는 가요성 공간은 적어도 1개 아미노산 길이이며, 작은 측쇄 R기를 갖는 비하전 아미노산, 예컨대 글리신, 알라닌, 발린, 류신 또는 세린을 포함한다. 따라서 일 구현예에서, 가요성 스페이서의 길이는, 예로 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 아미노산; 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 아미노산일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 가요성 스페이서는, 예로 1-3개 아미노산, 2-4개 아미노산, 3-5개 아미노산, 4-6개 아미노산, 또는 5-7개 아미노산일 수 있다. 가요성 스페이서의 비제한적 예에는 예로 G-스페이서, 예컨대 GGG, GGGG(서열 번호: 78), 및 GGGGS(서열 번호: 79) 또는 A-스페이서, 예컨대 AAA, AAAA(서열 번호: 80) 및 AAAAV(서열 번호: 81)가 포함된다. 상기 가요성 영역은 용합 단백질로서 TVEMP에 프레임에 맞춰 작동가능하게 연결된다.

따라서 일 구현예에서, 본 명세서에 개시된 TVEMP는 가요성 스페이서를 포함하는 가요성 영역을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 명세서에 개시된 TVEMP는 복수의 가요성 스페이서를 일렬로 포함하는 가요성 영역을 추가로 포함할 수 있다. 상기 구현예의 측면에 있어서, 가요성 영역은 일렬로, 예로 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 G-스페이서; 또는 최대 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 G-스페이서를 포함할 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 가요성 영역은 일렬로, 예로 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 A-스페이서; 또는 최대 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 A-스페이서를 포함할 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, TVEMP는 동일한 가요성 스페이서의 하나 이상의 사본, 상이한 가요성 스페이서 영역의 하나 이상의 사본 또는 이들의 임의 조합을 포함하는 가요성 영역을 포함할 수 있다.

본 구현예의 다른 측면에 있어서, 가요성 스페이서를 포함하는 TVEMP는, 예로 개질 BoNT/A, 개질 BoNT/B, 개질 BoNT/C1, 개질 BoNT/D, 개질 BoNT/E, 개질 BoNT/F, 개질 BoNT/G, 개질 TeNT, 개질 BaNT, 또는 개질 BuNT일 수 있다.

TVEMP가 중독 절차를 수행할 수 있는 한, 본 명세서에 개시된 TVEMP가 임의의 모든 위치에서 가요성 스페이서를 포함할 수 있음이 계획된다. 상기 구현예의 측면에 있어서, 가요성 스페이서는, 예로 효소 도메인 및 전위 도메인, 효소 도메인 및 펩타이드 표적화 도메인, 효소 도메인 및 외인성 프로테아제 절단 부위 사이에 위치한다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, G-스페이서는, 예로 효소 도메인 및 전위 도메인, 효소 도메인 및 펩타이드 표적화 도메인, 효소 도메인 및 외인성 프로테아제 절단 부위 사이에 위치한다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, A-스페이서는, 예로 효소 도메인 및 전위 도메인, 효소 도메인 및 펩타이드 표적화 도메인, 효소 도메인 및 외인성 프로테아제 절단 부위 사이에 위치한다.

본 구현예의 다른 측면에 있어서, 가요성 스페이서는, 예로 펩타이드 표적화 도메인 및 전위 도메인, 펩타이드 표적화 도메인 및 효소 도메인, 펩타이드 표적화 도메인 및 외인성 프로테아제 절단 부위의 사이에 위치한다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, G-스페이서는, 예로 펩타이드 표적화 도메인 및 전위 도메인, 펩타이드 표적화 도메인 및 효소 도메인, 펩타이드 표적화 도메인 및 외인성 프로테아제 절단 부위의 사이에 위치한다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, A-스페이서는, 예로 펩타이드 표적화 도메인 및 전위 도메인, 펩타이드 표적화 도메인 및 효소 도메인, 펩타이드 표적화 도메인 및 외인성 프로테아제 절단 부위의 사이에 위치한다.

본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, 가요성 스페이서는, 예로 전위 도메인 및 효소 도메인, 전위 도메인 및 펩타이드 표적화 도메인, 전위 도메인 및 외인성 프로테아제 절단 부위의 사이에 위치한다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, G-스페이서는, 예로 전위 도메인 및 효소 도메인, 전위 도메인 및 펩타이드 표적화 도메인, 전위 도메인 및 외인성 프로테아제 절단 부위의 사이에 위치한다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, A-스페이서는, 예로 전위 도메인 및 효소 도메인, 전위 도메인 및 펩타이드 표적화 도메인, 전위 도메인 및 외인성 프로테아제 절단 부위의 사이에 위치한다.

TVEMP가 중독 절차를 수행할 수 있는 한, 본 명세서에 개시된 TVEMP가 임의의 모든 위치에 펩타이드 표적화 도메인을 포함할 수 있음이 계획된다. 비제한적 예에는 TVEMP의 아미노 말단에서의 펩타이드 표적화 도메인 배치; TVEMP의 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 및 전위 도메인 사이에서의 펩타이드 표적화 도메인 배치; 및 TVEMP의 카르복실 말단에서의 펩타이드 표적화 도메인 배치가 포함된다. 다른 비제한적 예에는 TVEMP의 클로스트리듐 독소의 효소 도메인 및 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 사이에서의 펩타이드 표적화 도메인 배치가 포함된다. 천연 생성 클로스트리듐 독소의 효소 도메인은 천연 메티오닌 개시 코돈을 포함한다. 따라서 효소 도메인이 아미노-말단 위치에 있지 않은 도메인 구성에서 메티오닌 개시 코돈을 포함하는 아미노산 서열은 아미노-말단 도메인 앞에 놓여야 한다. 마찬가지로 펩타이드 표적화 도메인이 아미노-말단 위치에 있는 경우, 메티오닌 개시 코돈 및 프로테아제 절단 부위를 포함하는 아미노산 서열은 펩타이드 표적화 도메인이 자유 아미노 말단을 필요

로 하는 상황에서 작동가능하게 연결될 수 있다. 예로 그 전문이 본 명세서에 참조로 도입되는 [Shengwen Li 등, *Degradable Clostridial Toxins*, 미국 특허 출원 11/572,512(2007.01.23.)]를 참고하라. 또한 메티오닌 개시 코돈을 포함하는 또다른 폴리펩타이드의 아미노 말단에 작동가능하게 연결된 폴리펩타이드를 추가하는 경우, 원래 메티오닌 잔기가 결실될 수 있다는 것이 당해분야에 공지되어 있다.

따라서, 일 구현예에서, TVEMP는 펩타이드 표적화 도메인, 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위 및 효소 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다(도 3a). 본 구현예의 한 측면에 있어서, TVEMP는 펩타이드 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다.

또 다른 구현예에서, TVEMP는 펩타이드 표적화 도메인, 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 및 전위 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다(도 3b). 본 구현예의 한 측면에 있어서, TVEMP는 펩타이드 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소의 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다.

또 다른 구현예에서, TVEMP는 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 펩타이드 표적화 도메인, 및 전위 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다(도 4a). 본 구현예의 한 측면에 있어서, TVEMP는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 펩타이드 표적화 도메인, 및 클로스트리듐 독소의 전위 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다.

또 다른 구현예에서, TVEMP는 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 펩타이드 표적화 도메인, 및 효소 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다(도 4b). 본 구현예의 한 측면에 있어서, TVEMP는 클로스트리듐 독소의 전위 도메인, 펩타이드 표적화 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다.

또 다른 구현예에서, TVEMP는 효소 도메인, 펩타이드 표적화 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 및 전위 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다(도 4c). 본 구현예의 한 측면에 있어서, TVEMP는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인, 펩타이드 표적화 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다.

또 다른 구현예에서, TVEMP는 전위 도메인, 펩타이드 표적화 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위 및 효소 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다(도 4d). 본 구현예의 한 측면에 있어서, TVEMP는 클로스트리듐 독소의 전위 도메인, 펩타이드 표적화 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다.

또 다른 구현예에서, TVEMP는 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 전위 도메인, 및 펩타이드 표적화 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다(도 5a). 본 구현예의 한 측면에 있어서, TVEMP는 클로스트리듐 독소의 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인, 및 펩타이드 표적화 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다.

또 다른 구현예에서, TVEMP는 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 효소 도메인 및 펩타이드 표적화 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다(도 5b). 본 구현예의 한 측면에 있어서, TVEMP는 클로스트리듐 독소의 전위 도메인, 펩타이드 표적화 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함하는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로의 단일 폴리펩타이드 선형 순서를 포함할 수 있다.

본 발명에서 유용한 조성물은 일반적으로 TVEMP를 포함하는 약제학적으로 허용가능한 조성물로 투여된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한"이라는 용어는 개인에게 투여 시 역반응, 알러지성 반응 또는 다른 의도하지 않거나 원치않는 반응을 일으키지 않는 임의의 분자 단위체 또는 조성물을 의미한다. 본 명

세서에서 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 조성물"이라는 용어는 "약제학적 조성물"과 동의어이며, 활성 성분, 예컨대 본 명세서에 개시된 임의의 TVEMP의 치료 유효 농도를 의미한다. TVEMP를 포함하는 약제학적 조성물은 의약 및 수의학적 용도를 위해 유용하다. 약제학적 조성물은 단독으로 다른 보조 활성 성분, 제제, 약물 또는 호르몬과의 조합으로 투여될 수 있다. 약제학적 조성물은 통상적 혼합, 용해, 과립화, 당의정 제조, 분말화, 유화, 캡슐화, 트랩핑, 및 동결건조를 비제한적으로 포함하는 임의의 다양한 공정을 이용하여 제조될 수 있다. 약제학적 조성물은 멸균 용액, 현탁액, 에멀션, 동결건조품, 정제, 알약, 펠렛, 캡슐, 분말, 시럽, 엘릭서, 또는 투여에 적합한 임의의 다른 형태를 비제한적으로 포함하는 임의의 다양한 형태를 취할 수 있다.

본 발명의 측면에서는 부분적으로 TVEMP를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 명세서에 개시된 임의 조성물은 상기 조성물이 신경 염증에 연관된 증상을 예방하거나 감소시키는 한, 이를 필요로 하는 포유류에서의 신경 염증의 치료 방법에 유용할 수 있다는 것이 포함된다. TVEMP를 포함하는 조성물의 비제한적 예에는 펩타이드 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소의 전위 도메인 및 클로스트리듐 독소의 효소 도메인을 포함하는 TVEMP가 포함된다. 예로 [Steward, 상기, (2007); Dolly, 상기, (2007); Foster, 상기, WO 2006/059093(2006); Foster, 상기, WO 2006/059105(2006.06.08.)]를 포함하는 임의의 본 명세서에 개시된 TVEMP를 사용할 수 있다는 것이 포함된다. 둘 이상의 상이한 TVEMP를 개별 조성물로 또는 단일 조성물의 일부로 제공할 수 있다는 것도 이해된다.

또한 TVEMP를 포함하는 약제학적 조성물이 선택적으로 활성 성분의 약제학적으로 허용가능한 조성물로의 가공을 촉진하는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다는 것이 포함된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "약리학적으로 허용가능한 담체"라는 용어는 "약리학적 담체"와 동의어이며, 투여 시 장기적이거나 영구적인 유효 효과를 실질적으로 갖지 않는 임의 담체를 의미하고, "약리학적으로 허용가능한 전달체, 안정화제, 희석제, 첨가제, 보조제 또는 부형제"와 같은 용어가 포함된다. 상기 담체는 일반적으로 활성 화합물과 혼합되거나 또는 활성 화합물을 희석 또는 봉입할 수 있으며, 고체, 반고체 또는 액체 제제일 수 있다. 활성 성분이 원하는 담체 또는 희석제 중에 가용성일 수도 있고 또는 현탁액으로 전달될 수도 있다는 것이 이해된다. 수성 매질, 예컨대 물, 식염수, 글리신, 히알루론산 등; 고체 담체, 예컨대 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 활석, 셀룰로오스, 글루코오스, 수크로오스, 마그네슘 카보네이트 등; 용매; 분산 매질; 코팅; 항박테리아제 및 항진균제; 등장성 제제 및 흡수 지연 제제; 또는 임의의 다른 비활성 성분을 비제한적으로 포함하는 임의의 다양한 약제학적으로 허용가능한 담체를 사용할 수 있다. 약리학적으로 허용가능한 담체의 선택은 투여 방식에 의존할 수 있다. 임의의 약리학적으로 허용가능한 담체가 활성 성분과 비상용성이 아닌 한, 약제학적으로 허용가능한 조성물 중에서의 그 사용이 포함된다. 상기 약제학적 담체의 특정 용도의 비제한적 예는 [Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(Howard C. Ansel 등, eds., Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 7th ed. 1999); Remington: The Science and Practice of Pharmacy(Alfonso R. Gennaro ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 20th ed. 2000); Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics(Joel G. Hardman 등, eds., McGraw-Hill Professional, 10th ed. 2001); 및 Handbook of Pharmaceutical Excipients(Raymond C. Rowe 등, APhA 공보, 제4판, 2003)]에서 찾아볼 수 있다. 이들 프로토콜은 일상적 절차이며, 임의 변형은 당해분야 숙련자 및 본원의 교시 범위 내에 속한다.

또한 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물에는 선택적으로 완충액, 방부제, 긴장성 조정제, 염, 향산화제, 삼투압 조정제, 생리학적 물질, 약리학적 물질, 벌크화제, 유화제, 습윤제, 감미제 또는 향미제 등을 비제한적으로 포함하는 다른 약제학적으로 허용가능한 성분(또는 약제학적 성분)이 비제한적으로 포함될 수 있음이 계획된다. 생성 제조물이 약제학적으로 허용가능한 한, pH를 조정하기 위한 다양한 완충액 및 수단을 이용하여 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물을 제조할 수 있다. 상기 완충액에는 아세테이트 완충액, 시트레이트 완충액, 포스페이트 완충액, 중성 완충 식염수, 포스페이트 완충 식염수 및 보레이트 완충액이 비제한적으로 포함된다. 산 또는 염기를 사용하여 필요한 만큼 조성물의 pH를 조정할 수 있다는 것이 이해된다. 약제학적으로 허용가능한 향산화제에는 나트륨 메타비설파이트, 나트륨 티오설파이트, 아세틸시스테인, 부틸화 히드록시아니솔 및 부틸화 히드록시톨루엔이 비제한적으로 포함된다. 유용한 방부제에는 벤잘코늄 클로라이드, 클로로부탄올, 티메로살, 페닐머큐릭 아세테이트, 페닐머큐릭 니트레이트, 안정화 옥시 클로로 조성물 및 킬레이트제, 예컨대 DTPA 또는 DTPA-비스아미드, 칼슘 DTPA, 및 CaNaDTPA-비스아미드가 비제한적으로 포함된다. 약제학적 조성물에 유용한 긴장성 조정제에는 염, 예컨대 염화나트륨, 염화칼슘, 만니톨 또는 글리세린 및 기타 약제학적으로 허용가능한 긴장성 조정제가 비제한적으로 포함된다. 약제학적 조성물은 염의 형태로 제공될 수 있으며, 염산, 황산, 아세트산, 락트산, 타르타르산, 말산, 숙신산 등을 비제한적으로 포함하는 여러 산과 함께 형성될 수 있다. 염은 대응하는 자유 염기 형태에 비해 수성 또는 다른 프로톤성 용매 중에서 보다 가용적인 경향이 있다. 약리학 분야에

공지된 상기 및 다른 물질이 약제학적 조성물에 포함될 수 있다는 것이 이해된다.

일 구현예에서, TVEMP를 포함하는 조성물은 TVEMP를 포함하는 약제학적 조성물이다. 상기 구현예의 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 약제학적 조성물은 추가로 약리학적 담체, 약제학적 성분, 또는 약리학적 담체 및 약제학적 성분 둘 다를 포함한다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 약제학적 조성물은 추가로 적어도 하나의 약리학적 담체, 적어도 하나의 약제학적 성분, 또는 적어도 하나의 약리학적 담체 및 적어도 하나의 약제학적 성분을 포함한다.

본 발명의 실시형태는 부분적으로는 암을 제공한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "암"은 병리생리학 효과를 갖는 제어되지 않는 성장을 나타내는 세포를 의미한다. 본 명세서에 개시된 TVEMP, 조성물 및 방법은 TVEMP에 존재하는 표적화 도메인을 위한 동족 수용체를 발현하는 세포를 포함하는 임의의 암을 치료하는데 유용할 수 있는 것으로 예상된다. 예를 들어, 오피오이드 표적화 도메인을 포함하는 TVEMP는 오피오이드 수용체를 발현하는 암세포를 치료하는데 유용할 것이고, 엔케팔린 표적화 도메인을 포함하는 TVEMP는 엔케팔린 수용체를 발현하는 암세포를 치료하는데 유용할 것이며, 소 부신수질-22(BAM22) 펩타이드 표적화 도메인을 포함하는 TVEMP는 소 부신수질-22(BAM22) 수용체를 발현하는 암세포를 치료하는데 유용할 것이고, 엔도모르핀 펩타이드 표적화 도메인을 포함하는 TVEMP는 엔도모르핀 수용체를 발현하는 암세포를 치료하는데 유용할 것이며, 엔도르핀 펩타이드 표적화 도메인을 포함하는 TVEMP는 엔도르핀 수용체를 발현하는 암세포를 치료하는데 유용할 것이고, 다이노르핀 펩타이드 표적화 도메인을 포함하는 TVEMP는 다이노르핀 수용체를 발현하는 암세포를 치료하는데 유용할 것이며, 노시셉틴 펩타이드 표적화 도메인을 포함하는 TVEMP는 노시셉틴 수용체를 발현하는 암세포를 치료하는데 유용할 것이고, 헤모르핀 펩타이드 표적화 도메인을 포함하는 TVEMP는 헤모르핀 수용체를 발현하는 암세포를 치료하는데 유용할 것이다.

본 발명의 측면에서는 부분적으로 암에 연관된 증상의 감소를 제공한다. 하나의 측면에 있어서, 감소되는 증상은 암 세포의 성장 속도의 증가이다. 또 다른 측면에 있어서, 감소되는 증상은 암 세포의 세포 분할 속도의 증가이다. 또 다른 측면에 있어서, 감소되는 증상은 암 세포의 주변 조직 또는 기관 내로의 침습 정도의 증가이다. 또 다른 측면에 있어서, 감소되는 증상은 전이 정도의 증가이다. 또 다른 측면에 있어서, 감소되는 증상은 혈관신생의 증가이다. 또 다른 측면에 있어서, 감소되는 증상은 아폽토시스의 감소이다. 또 다른 측면에 있어서, 감소되는 증상은 세포 사멸 또는 세포 괴사의 감소이다. 즉 TVEMP 처리는 암 세포의 성장 속도를 감소시키고, 암 세포의 세포 분할 속도를 감소시키고, 암 세포의 주변 조직 또는 기관 내로의 침습 정도를 감소시키고, 전이 정도를 감소시키고, 혈관신생을 감소시키고, 아폽토시스를 증가시키고/시키거나 세포 사멸 및/또는 세포 괴사를 증가시킬 것이다.

본 발명의 측면에서는 부분적으로 포유류를 제공한다. 포유류에는 인간이 포함되며, 인간은 환자일 수 있다. 본 발명의 다른 측면에서는 부분적으로 개인을 제공한다. 개인에는 인간이 포함되며, 인간은 환자일 수 있다.

본 발명의 측면에서는 부분적으로 TVEMP를 포함하는 조성물의 투여를 제공한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "투여"라는 용어는 TVEMP를 포함하는 조성물을 임상적, 치료적 또는 실험적으로 유익한 결과를 얻을 가능성이 있는 환자에게 제공하는 임의의 전달 기전을 의미한다. TVEMP는 TVEMP가 세포내 전달되는 세포 섭취 접근 또는 TVEMP가 발현 벡터에서 발현되는 전구체 RNA에서 유래되어 발현되는 유전자 치료법 접근을 이용하여 환자에게 전달될 수 있다.

본 명세서에 개시된 바와 같이 TVEMP를 포함하는 조성물은 세포 섭취 접근을 이용하여 포유류에게 투여될 수 있다. 세포 섭취 접근을 이용한 TVEMP를 포함하는 조성물의 투여에는 임의의 허용가능한 형태의 경구 투여, 예컨대 정제, 액체, 캡슐, 분말 등; 임의의 허용가능한 형태의 국소 투여, 예컨대 점적, 스프레이, 크림, 젤 또는 연고; 임의의 허용가능한 형태의 정맥내 투여, 예컨대 정맥내 볼루스 주사, 정맥내 주입, 동맥내 볼루스 주사, 동맥내 주입 및 혈관 내로의 카테터 주입; 임의의 허용가능한 형태의 조직 주변 및 조직내 투여, 예컨대 복강내 주사, 근육내 주사, 피하 주사, 피하 주입, 안내 주사, 망막 주사 또는 망막하 주사 또는 경막 주사; 임의의 허용가능한 형태의 소포내 투여, 예컨대 카테터 주입; 및 설치 장치에 의한, 예컨대 이식, 패치, 펠렛, 카테터, 삼투압 펌프, 좌약, 생체 부식성 전달 시스템, 생체 비부식성 전달 시스템 또는 또 다른 이식된 연장 또는 서방형 시스템을 비제한적으로 포함하는 다양한 장관 또는 비경구 접근이 포함된다. 생체분해성 중합체의 예시적 목록 및 사용 방법은 예로 [*Handbook of Biodegradable Polymers*(Abraham J. Domb 등, eds., Overseas Publishers Association, 1997)]에 기재되어 있다.

TVEMP를 포함하는 조성물은 리포솜 내의 캡슐화, 이온이동법, 다른 전달체, 예컨대 히드로겔, 시클로덱스트린, 생체분해성 나노캡슐 및 생접착성 마이크로스피어 내로의 함입, 또는 단백질성 벡터를 비제한적으로 포함하는,

당해분야 숙련자에게 공지된 다양한 방법에 의해 포유류에게 투여될 수 있다. TVEMP를 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 직접적 기전은 예로 [Leonid Beigelman 등, *Compositions for the Delivery of Negatively Charged Molecules*, 미국 특허 6,395,713; 및 Achim Aigner, *Delivery Systems for the Direct Application of siRNAs to Induce RNA Interference (RNAi) in vivo*, 2006(716559) J. Biomed. Biotech. 1-15 (2006); *Controlled Drug Delivery: Designing Technologies for the Future* (Kinam Park & Randy J. Mersny eds., American Chemical Association, 2000); Vernon G. Wong & Mae W. L. Hu, *Methods for Treating Inflammation-mediated Conditions of the Eye*, 미국 특허 No. 6,726,918; David A. Weber 등, *Methods and Apparatus for Delivery of Ocular Implants*, 미국 특허 공보 번호. US2004/0054374; Thierry Nivaggioli 등, *Biodegradable Ocular Implant*, 미국 특허 공보 번호. US2004/0137059; Patrick M. Hughes 등, *Anti-Angiogenic Sustained Release Anti-Angiogenic Sustained Release Intraocular Implants and Related Methods*, 미국 특허 출원 11/364,687; 및 Patrick M. Hughes 등, *Sustained Release Intraocular Drug Delivery Systems*, 미국 특허 공보 2006/0182783]에 기재되어 있으며, 그 각각의 전문이 본 명세서에 참조로 통합된다.

본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물은 또한 암에 기여하는 신경 기반 병인을 드러내는 세포 내에서 TVEMP를 발현함으로써 유전자 치료법 접근을 이용하여 환자에게 투여될 수 있다. TVEMP는 발현 백터에 작동가능하게 연결된 핵산 분자로부터 발현될 수 있으며, 예로 [P. D. Good 등, *Expression of Small, Therapeutic RNAs in Human Cell Nuclei*, 4(1) Gene Ther. 45-54 (1997); James D. Thompson, *Polymerase III-based expression of therapeutic RNAs*, 미국 특허 6,852,535(2005.02.08.); Maciej Wiznerowicz 등, *Tuning Silence: Conditional Systems for RNA Interference*, 3(9) Nat. Methods 682-688m (2006); Ola Snoene 및 John J. Rossi, *Expressing Short Hairpin RNAi in vivo*, 3(9) Nat. Methods 689-698 (2006); 및 Charles X. Li 등, *Delivery of RNA Interference*, 5(18) Cell Cycle 2103-2109 (2006)]를 참고하라. 당업자는 임의 TVEMP가 적절한 발현 백터를 사용하여 진행 세포에서 발현될 수 있음을 인지할 것이다.

TVEMP를 발현할 수 있는 발현 백터는 암에 기여하는 신경 기반 병인을 드러내는 세포에서 TVEMP의 지속적 또는 안정적인 발현을 제공할 수 있다. 대안적으로, TVEMP를 발현할 수 있는 발현 백터는 암에 기여하는 신경 기반 병인을 드러내는 세포에서 TVEMP의 일시적 발현을 제공할 수 있다. 상기 일시적 발현 백터는 필요에 따라 반복 투여될 수 있다. TVEMP 발현 백터는 상기 논의된 전달 기전 및 투여 경로에 의해, 환자로부터 추출된 표적 세포에 투여 후 환자에게 재도입하여, 또는 원하는 표적 세포 내로 도입할 수 있는 임의의 다른 수단에 의해 투여될 수 있으며, 예로 [Larry A. Couture 및 Dan T. Stinchcomb, *Anti-gene Therapy: The Use of Ribozymes to Inhibit Gene Function*, 12(12) Trends Genet. 510-515 (1996)]을 참고하라.

TVEMP를 포함하는 조성물을 포유류에게 투여하는데 이용되는 실제 전달 기전은 당업자가 암의 유형, 암의 위치, 암의 원인, 암의 중증도, 원하는 경감 정도, 원하는 경감 기간, 사용하는 특정 TVEMP, 사용하는 TVEMP의 배출 속도, 사용하는 TVEMP의 약동력학, 조성물에 포함될 다른 화합물의 성질, 특정 투여 경로, 환자의 특정 특징, 병력 및 위험 요인, 예컨대 연령, 체중, 일반 건강 등이나 이들의 임의 조합을 비제한적으로 포함하는 요인들을 고려하여 결정할 수 있다.

일 구현예에서, TVEMP를 포함하는 조성물은 주사에 의해 치료될 부위로 투여된다. 상기 구현예의 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 주사는, 예로 근육내 주사, 기관내 주사, 피하 주사, 피내 주사 또는 TVEMP를 포함하는 조성물의 효과적 투여를 위한 임의의 다른 신체 부위 내로의 주사에 의한다. 상기 구현예의 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 주사는 종양으로 또는 종양 주변 부위 내로 수행된다.

TVEMP를 포함하는 조성물은 포유류에게 다양한 경로를 이용하여 투여될 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 암 치료 방법에 적합한 투여 경로에는 국소 및 전신 투여가 모두 포함된다. 국소 투여로 포유류의 전체 신체에 비해 특정 위치에 유의미하게 더 많은 조성물을 전달할 수 있는 반면, 전신 투여로 환자의 본질적으로 전체 신체에 조성물이 전달된다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 암 치료 방법에 적합한 투여 경로에는 또한 중추 및 말초 투여가 모두 포함된다. 중추 투여로는 본질적으로 환자의 중추 신경계에 조성물이 전달되며, 예로 경막내 투여, 경막의 투여 뿐만 아니라 두개 주사 또는 이식이 포함된다. 말초 투여로는 본질적으로 환자의 중추 신경계 외부의 임의 부위로 조성물이 전달되며, 척추 또는 뇌로의 직접적 투여를 제외한 임의 투여 경로가 포함된다. 포유류에서 사용되는 TVEMP를 포함하는 조성물의 실제 투여 경로는 당업자가 암의 유형, 암의 위치, 암의 원인, 암의 중증도, 원하는 경감 정도, 원하는 경감 기간, 사용하는 특정 TVEMP, 사용하는 TVEMP의 배출 속도, 사용하는 TVEMP의 약동력학, 조성물에 포함될 다른 화합물의 성질, 특정 투여 경로, 포유류의 특정 특징, 병력 및 위험 요인, 예컨대 연령, 체중, 일반 건강 등이나 이들의 임의 조합을 비제한적으로 포함하는 요인들을 고려하여

결정할 수 있다.

일 구현예에서, TVEMP를 포함하는 조성물은 포유류에 전신 투여된다. 또 다른 구현예에서, TVEMP를 포함하는 조성물은 포유류에 국소 투여된다. 본 구현예의 한 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물은 포유류의 종양에 투여된다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물은 포유류의 종양 주변 부위에 투여된다.

본 발명의 측면에서는 부분적으로 TVEMP를 포함하는 조성물의 치료적 유효량의 투여를 제공한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "치료적 유효량"이라는 용어는 "치료적 유효 용량"과 동의어이며, 암 치료에 관해 사용되는 경우 원하는 치료 효과를 달성하는데 필요한 TVEMP의 최소 용량을 의미하고, 암에 연관된 증상을 감소시키기 충분한 용량이 포함된다. 상기 구현예의 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 치료적 유효량은, 예로 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 100% 암에 연관된 증상을 감소시킨다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 치료적 유효량은, 예로 최대 10%, 최대 20%, 최대 30%, 최대 40%, 최대 50%, 최대 60%, 최대 70%, 최대 80%, 최대 90% 또는 최대 100% 암에 연관된 증상을 감소시킨다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 치료적 유효량은, 예로 약 10% 내지 약 100%, 약 10% 내지 약 90%, 약 10% 내지 약 80%, 약 10% 내지 약 70%, 약 10% 내지 약 60%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 40%, 약 20% 내지 약 100%, 약 20% 내지 약 90%, 약 20% 내지 약 80%, 약 20% 내지 약 70%, 약 20% 내지 약 60%, 약 20% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 40%, 약 30% 내지 약 100%, 약 30% 내지 약 90%, 약 30% 내지 약 80%, 약 30% 내지 약 70%, 약 30% 내지 약 60%, 또는 약 30% 내지 약 50% 암에 연관된 증상을 감소시킨다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "약"이라는 용어는 언급된 항목, 숫자, 백분율, 또는 기간의 값을 정량하는 경우 상기 언급된 항목, 백분율, 파라미터 또는 기간의 값의 플러스 또는 마이너스 10% 범위를 나타낸다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, TVEMP의 치료적 유효량은 예로 적어도 1주, 적어도 1달, 적어도 2달, 적어도 3달, 적어도 4달, 적어도 5달, 적어도 6달, 적어도 7달, 적어도 8달, 적어도 9달, 적어도 10달, 적어도 11달, 또는 적어도 12달 동안 신경 활성을 저해하기 충분한 투여량이다.

포유류에 투여될 TVEMP를 포함하는 조성물의 실제 치료적 유효량은 당업자가 암의 유형, 암의 위치, 암의 원인, 암의 중증도, 원하는 경감 정도, 원하는 경감 기간, 사용하는 특정 TVEMP, 사용하는 TVEMP의 배출 속도, 사용하는 TVEMP의 약동력학, 조성물에 포함될 다른 화합물의 성질, 특정 투여 경로, 환자의 특정 특징, 병력 및 위험 요인, 예전대 연령, 체중, 일반 건강 등이나 이들의 임의 조합을 비제한적으로 포함하는 요인들을 고려하여 결정할 수 있다. 추가적으로 TVEMP를 포함하는 조성물의 반복 투여를 이용하는 경우, TVEMP를 포함하는 조성물의 실제 유효량은 추가로 투여 빈도, TVEMP를 포함하는 조성물의 반감기 또는 이들의 임의 조합을 비제한적으로 포함하는 요인들에 근거할 것이다. TVEMP를 포함하는 조성물의 유효량은 인간으로의 투여 전 시험관 내 분석 및 동물 모델을 이용하는 생체 내 투여 연구로부터 추정할 수 있음은 당업자에게 공지되어 있다. 다양한 투여 경로의 상이한 효율의 관점에서 필요한 유효량에는 다양한 변형이 예측된다. 예를 들어 경구 투여는 일반적으로 정맥내 또는 유리질내 주사에 의한 투여 보다 더 높은 투여량 수준을 필요로 할 것으로 예측될 것이다. 이들 투여량 수준의 변화는 당업자에게 널리 공지된 표준 최적화 실험 방식을 이용하여 조정될 수 있다. 정확한 치료적 유효 투여량 수준 및 양식은 상기 확인된 요인들을 고려하여 주치의에 의해 바람직하게 결정된다.

비제한적 예로서 TVEMP를 포함하는 조성물을 포유류에게 투여하는 경우, 치료적 유효량은 일반적으로 약 1 fg 내지 약 3.0 mg 범위이다. 상기 구현예의 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 유효량은, 예로 약 100 fg 내지 약 3.0 mg, 약 100 pg 내지 약 3.0 mg, 약 100 ng 내지 약 3.0 mg, 또는 약 100 μ g 내지 약 3.0 mg일 수 있다. 본 구현예의 다른 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 유효량은, 예로 약 100 fg 내지 약 750 μ g, 약 100 pg 내지 약 750 μ g, 약 100 ng 내지 약 750 μ g, 또는 약 1 μ g 내지 약 750 μ g일 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 치료적 유효량은, 예로 적어도 1 fg, 적어도 250 fg, 적어도 500 fg, 적어도 750 fg, 적어도 1 pg, 적어도 250 pg, 적어도 500 pg, 적어도 750 pg, 적어도 1 ng, 적어도 250 ng, 적어도 500 ng, 적어도 750 ng, 적어도 1 μ g, 적어도 250 μ g, 적어도 500 μ g, 적어도 750 μ g, 또는 적어도 1 mg일 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 치료적 유효량은, 예로 최대 1 fg, 최대 250 fg, 최대 500 fg, 최대 750 fg, 최대 1 pg, 최대 250 pg, 최대 500 pg, 최대 750 pg, 최대 1 ng, 최대 250 ng, 최대 500 ng, 최대 750 ng, 최대 1 μ g, 적어도 250 μ g, 최대 500 μ g, 최대 750 μ g, 또는 최대 1 mg일 수 있다.

또 다른 비제한적 예로서, TVEMP를 포함하는 조성물을 포유류에 투여하는 경우, 치료적 유효량은 일반적으로 약 0.00001 mg/kg 내지 약 3.0 mg/kg 범위이다. 상기 구현예의 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 유효량

은, 예로 약 0.0001 mg/kg 내지 약 0.001 mg/kg, 약 0.03 mg/kg 내지 약 3.0 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 3.0 mg/kg, 또는 약 0.3 mg/kg 내지 약 3.0 mg/kg일 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 치료적 유효량은, 예로 적어도 0.00001 mg/kg, 적어도 0.0001 mg/kg, 적어도 0.001 mg/kg, 적어도 0.01 mg/kg, 적어도 0.1 mg/kg, 또는 적어도 1 mg/kg일 수 있다. 본 구현예의 또 다른 측면에 있어서, TVEMP를 포함하는 조성물의 치료적 유효량은, 예로 최대 0.00001 mg/kg, 최대 0.0001 mg/kg, 최대 0.001 mg/kg, 최대 0.01 mg/kg, 최대 0.1 mg/kg, 또는 최대 1 mg/kg일 수 있다.

용량은 단일 투여량일 수도 축적(연속 용량)일 수도 있으며, 당해분야 숙련자가 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들어, 암의 치료에는 TVEMP를 포함하는 조성물의 유효 용량의 1회 투여가 포함될 수 있다. 비제한적 예로서, TVEMP를 포함하는 조성물의 유효 용량은 환자에게 1회, 예로 단일 주사 또는 침적으로서 암 증상을 나타내는 부위 또는 근처에 투여될 수 있다. 대안적으로 암의 치료에는 여러 시간 범위, 예컨대 매일, 수일마다 1회, 매주, 매월 또는 매년에 걸쳐 수행되는 TVEMP를 포함하는 조성물의 유효 용량의 다회 투여가 포함될 수 있다. 비제한적 예로서, TVEMP를 포함하는 조성물은 포유류에 년 1회 또는 2회 투여될 수 있다. 투여 시점은 포유류 증상의 중증도와 같은 요인들에 근거하여 포유류 마다 다를 수 있다. 예를 들어, TVEMP를 포함하는 조성물의 유효 용량은 계속적으로 또는 환자가 더 이상 치료법을 필요로 하지 않을 때까지 매일 1회 포유류에 투여될 수 있다. 당업자는 포유류의 상태를 치료 과정에 걸쳐 모니터링할 수 있고, 투여되는 TVEMP를 포함하는 조성물의 유효량에 따라 조정할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물은 또한 다른 치료 화합물과 조합으로 포유류에 투여되어 치료의 전체적 치료 효과를 증가시킬 수 있다. 적응증을 치료하기 위한 복수 화합물의 사용은 유익한 효과를 증가시키면서 부작용의 존재를 감소시킬 수 있다.

본 발명의 다른 양상은 또한 하기와 같이 기재될 수 있다:

1. 치료가 필요한 포유동물에게 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인을 포함하는 TVEMP를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 포유동물의 암의 치료 방법으로서, 상기 조성물의 투여는 암과 연관된 증상을 감소시키는 방법.
2. 치료가 필요한 동물의 암을 치료하기 위한 의약의 제조에서의 TVEMP의 용도로서, 상기 TVEMP는 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인을 포함하고, 치료적 유효량의 의약의 포유동물에의 투여는 암과 연관된 증상을 감소시키는 용도.
3. 치료가 필요한 포유동물의 암을 치료하기 위한 TVEMP의 용도로서, 포유동물에게 치료적 유효량의 TVEMP를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 TVEMP는 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 클로스트리듐 독소 효소 도메인을 포함하며 상기 TVEMP의 투여는 암과 연관된 증상을 감소시키는 용도.
4. 포유동물의 암의 치료 방법으로서, 치료가 필요한 포유동물에게 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 및 외인성 프로테아제 절단 부위를 포함하는 TVEMP를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 조성물의 투여는 암과 연관된 증상을 감소시키는 방법.
5. 치료가 필요한 동물의 암을 치료하기 위한 의약의 제조에서의 TVEMP의 용도로서, 상기 TVEMP는 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 및 외인성 프로테아제 절단 부위를 포함하고, 치료적 유효량의 의약의 포유동물에의 투여는 암과 연관된 증상을 감소시키는 용도.
6. 치료가 필요한 포유동물의 암을 치료하기 위한 TVEMP의 용도로서, 포유동물에게 치료적 유효량의 TVEMP를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 TVEMP는 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 및 외인성 프로테아제 절단 부위를 포함하고, 상기 TVEMP의 투여는 암과 연관된 증상을 감소시키는 용도.
7. 상기 1-3에 있어서, 상기 TVEMP는 1) 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 표적화 도메인, 2) 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 3) 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 4) 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 5) 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 효소 도메인 및 표적화 도메인, 또는 6) 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 표적화 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인의 순서로 선형 아미노-대-카복

실 단일 폴리펩타이드를 포함하는 방법.

8. 상기 4-6에 있어서, 상기 TVEMP는 1) 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 표적화 도메인, 2) 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 3) 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 4) 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 5) 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 효소 도메인 및 표적화 도메인, 또는 6) 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 표적화 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인의 순서로 선형 아미노-대-카복실 단일 폴리펩타이드를 포함하는 방법.

9. 상기 1-8에 있어서, 상기 표적화 도메인은 오피오이드 펩타이드 표적화 도메인인 방법.

10. 상기 9에 있어서, 상기 오피오이드 펩타이드 표적화 도메인은 엔케팔린, 소 부신수질-22 (BAM22) 펩타이드, 엔도모르핀, 엔도르핀, 다이노르핀, 노시셉틴, 또는 헤모르핀인 방법.

13. 상기 9에 있어서, 상기 엔케팔린 펩타이드 표적화 도메인은 Leu-엔케팔린, Met-엔케팔린, Met-엔케팔린 MRGL, 또는 Met-엔케팔린 MRF인 방법.

11. 상기 10에 있어서, 상기 엔케팔린 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 84, 또는 서열번호: 85을 포함하는 방법.

12. 상기 10 또는 11에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐암, 신경모세포종, 또는 크롬친화세포종인 방법.

13. 상기 9에 있어서, 상기 소 부신수질-22 펩타이드 표적화 도메인은 BAM22 펩타이드 표적화 도메인은 BAM22 펩타이드 (1-12), BAM22 펩타이드 (6-22), BAM22 펩타이드 (8-22), 또는 BAM22 펩타이드 (1-22)을 포함하는 방법.

14. 상기 13에 있어서, 상기 소 부신수질-22 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 86의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 87의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 88의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 89의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 90의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22, 또는 서열번호: 91의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22을 포함하는 방법.

15. 상기 13 또는 14에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암, 만성 골수성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수성, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐 암종, 신경모세포종, 위암, 결장암, 악성 흑색종, 교모세포종, 구강 편평세포암종, 간암, 크롬친화세포종, 또는 기형암종인 방법.

16. 상기 9에 있어서, 상기 엔도모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 엔도모르핀-1 또는 엔도모르핀-2인 방법.

17. 상기 16에 있어서, 상기 엔도모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 92 또는 서열번호: 93을 포함하는 방법.

18. 상기 16 또는 17에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암, 만성 골수성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수성, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐 암종, 신경모세포종, 위암, 결장암, 악성 흑색종, 교모세포종, 구강 편평세포암종, 간암, 또는 기형암종인 방법.

19. 상기 9에 있어서, 상기 엔도르핀 펩타이드 표적화 도메인은 엔도르핀- α , 네오엔도르핀- α , 엔도르핀- β , 네오엔도르핀- β , 또는 엔도르핀- γ 인 방법.

20. 상기 19에 있어서, 상기 엔도르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 94, 서열번호: 95, 서열번호: 96, 서열번호: 97, 서열번호: 98, 또는 서열번호: 99을 포함하는 방법.

21. 상기 19 또는 20에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암, 만성 골수성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수성, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐 암종, 신경모세포종, 위암, 결장암, 악성 흑색종, 교모세포종, 구강 편평세포암종, 간암, 크롬친화세포종, 또는 기형암종인 방법.

22. 상기 9에 있어서, 상기 다이노르핀 펩타이드 표적화 도메인은 다이노르핀 A, 다이노르핀 B (류모르핀), 또

는 리모르핀인 방법.

23. 상기 22에 있어서, 상기 다이노르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 100, 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 104, 서열번호: 105, 서열번호: 106, 서열번호: 107, 서열번호: 108, 서열번호: 109, 서열번호: 110, 서열번호: 111, 서열번호: 112, 서열번호: 113, 서열번호: 114, 서열번호: 115, 서열번호: 116, 서열번호: 117, 서열번호: 118, 서열번호: 119, 서열번호: 120, 서열번호: 121, 서열번호: 122, 서열번호: 123, 서열번호: 124, 서열번호: 125, 서열번호: 126, 서열번호: 127, 서열번호: 128, 서열번호: 129, 또는 서열번호: 130을 포함하는 방법.

24. 상기 22 또는 23에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암, 만성 골수성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 림프종, 다발성 골수성, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐 암종, 비인두 암종, 신경모세포종, 위암, 결장암, 악성 흑색종, 교모세포종, 구강 편평세포암종, 간암, 크롬친화세포종, 또는 기형암종인 방법.

25. 상기 9에 있어서, 상기 헤모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 LVVH7, VVH7, VH7, H7, LVVH6, LVVH5, VVH5, LVVH4, 및 LVVH3인 방법.

26. 상기 25에 있어서, 상기 헤모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 141, 서열번호: 142, 서열번호: 143, 서열번호: 144, 서열번호: 145, 서열번호: 146, 서열번호: 147, 서열번호: 148, 또는 서열번호: 149를 포함하는 방법.

27. 25 또는 26에 있어서, 상기 암은 폐 암종 또는 고환 암종인 방법.

28. 상기 1-27에 있어서, 상기 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BoNT/A 전위 도메인, BoNT/B 전위 도메인, BoNT/C1 전위 도메인, BoNT/D 전위 도메인, BoNT/E 전위 도메인, BoNT/F 전위 도메인, BoNT/G 전위 도메인, TeNT 전위 도메인, BaNT 전위 도메인, 또는 BuNT 전위 도메인인 방법.

29. 상기 1-27에 있어서, 상기 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BoNT/A 효소 도메인, BoNT/B 효소 도메인, BoNT/C1 효소 도메인, BoNT/D 효소 도메인, BoNT/E 효소 도메인, BoNT/F 효소 도메인, BoNT/G 효소 도메인, TeNT 효소 도메인, BaNT 효소 도메인, 또는 BuNT 효소 도메인인 방법.

30. 상기 4-6 및 8에 있어서, 상기 외인성 프로테아제 절단 부위는 식물 파파인 절단 부위, 곤충 파파인 절단 부위, 갑각류 파파인 절단 부위, 엔테로키나아제 절단 부위, 인간 라이노바이러스 3C 프로테아제 절단 부위, 인간 엔테로바이러스 3C 프로테아제 절단 부위, 담배 식각 바이러스 프로테아제 절단 부위, 담배 엽맥 모틀 (Tobacco Vein Mottling) 바이러스 절단 부위, 서브틸리신(subtilisin) 절단 부위, 히드록실아민 절단 부위, 또는 카스파제(Caspase) 3 절단 부위인 방법.

31. 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인을 포함하는 TVEMP로서, 상기 조성물의 투여는 암과 연관된 증상을 감소시키는 TVEMP.

32. 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 및 외인성 프로테아제 절단 부위를 포함하는 TVEMP로서, 상기 조성물의 투여는 암과 연관된 증상을 감소시키는 TVEMP.

33. 상기 31에 있어서, 상기 TVEMP는 1) 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 표적화 도메인, 2) 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 3) 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 4) 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 5) 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 효소 도메인 및 표적화 도메인, 또는 6) 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 표적화 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인의 순서로 선형 아미노-대-카복실 단일 폴리펩타이드를 포함하는 TVEMP.

34. 상기 32에 있어서, 상기 TVEMP는 1) 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 표적화 도메인, 2) 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 3) 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 4) 표적화 도메인, 클로스트리듐 독소 효소 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 5) 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 클로스트리듐 독소 효소 도메인 및 표적화 도메인, 또는 6) 클로스트리듐 독소 전위 도메인, 외인성 프로테아제 절단 부위, 표적화 도메인 및 클로스트리듐 독소 효소 도메인의 순서로 선형 아미노-대-카복

실 단일 폴리펩타이드를 포함하는 TVEMP.

35. 상기 31-34에 있어서, 상기 표적화 도메인은 오피오이드 펩타이드 표적화 도메인인 TVEMP.

36. 상기 35에 있어서, 상기 오피오이드 펩타이드 표적화 도메인은 엔케팔린, 소 부신수질-22 (BAM22) 펩타이드, 엔도모르핀, 엔도르핀, 다이노르핀, 노시셉틴, 또는 헤모르핀인 TVEMP.

37. 상기 36에 있어서, 상기 엔케팔린 펩타이드 표적화 도메인은 Leu-엔케팔린, Met-엔케팔린, Met-엔케팔린 MRGL, 또는 Met-엔케팔린 MRF인 TVEMP.

38. 상기 37에 있어서, 상기 엔케팔린 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 82, 서열번호: 83, 서열번호: 84, 또는 서열번호: 85를 포함하는 TVEMP.

39. 상기 36에 있어서, 상기 소 부신수질-22 펩타이드 표적화 도메인은 BAM22 펩타이드 표적화 도메인이고, BAM22 펩타이드 (1-12), BAM22 펩타이드 (6-22), BAM22 펩타이드 (8-22), 또는 BAM22 펩타이드 (1-22)를 포함하는 TVEMP.

40. 상기 39에 있어서, 상기 소 부신수질-22 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 86의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 87의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 88의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 89의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22; 서열번호: 90의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22, 또는 서열번호: 91의 아미노산 1-12, 아미노산 6-22, 아미노산 8-22 또는 아미노산 1-22를 포함하는 TVEMP.

41. 상기 36에 있어서, 상기 엔도모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 엔도모르핀-1 또는 엔도모르핀-2인 TVEMP.

42. 상기 41에 있어서, 상기 엔도모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 92 또는 서열번호: 93을 포함하는 TVEMP.

43. 상기 36에 있어서, 상기 엔도르핀 펩타이드 표적화 도메인은 엔도르핀- α , 네오엔도르핀- α , 엔도르핀- β , 네오엔도르핀- β , 또는 엔도르핀- γ 인 TVEMP.

44. 상기 43에 있어서, 상기 엔도르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 94, 서열번호: 95, 서열번호: 96, 서열번호: 97, 서열번호: 98, 또는 서열번호: 99을 포함하는 TVEMP.

45. 상기 36에 있어서, 상기 다이노르핀 펩타이드 표적화 도메인은 다이노르핀 A, 다이노르핀 B (류모르핀), 또는 리모르핀인 TVEMP.

46. 상기 45에 있어서, 상기 다이노르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 100, 서열번호: 101, 서열번호: 102, 서열번호: 103, 서열번호: 104, 서열번호: 105, 서열번호: 106, 서열번호: 107, 서열번호: 108, 서열번호: 109, 서열번호: 110, 서열번호: 111, 서열번호: 112, 서열번호: 113, 서열번호: 114, 서열번호: 115, 서열번호: 116, 서열번호: 117, 서열번호: 118, 서열번호: 119, 서열번호: 120, 서열번호: 121, 서열번호: 122, 서열번호: 123, 서열번호: 124, 서열번호: 125, 서열번호: 126, 서열번호: 127, 서열번호: 128, 서열번호: 129, 또는 서열번호: 130을 포함하는 TVEMP.

47. 상기 36에 있어서, 상기 노시셉틴 펩타이드 표적화 도메인은 노시셉틴 RK, 노시셉틴, 뉴로펩타이드 1, 뉴로펩타이드 2, 또는 뉴로펩타이드 3인 TVEMP.

48. 상기 47에 있어서, 상기 노시셉틴 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 131, 서열번호: 132, 서열번호: 133, 서열번호: 134, 서열번호: 135, 서열번호: 136, 서열번호: 137, 서열번호: 138, 서열번호: 139, 또는 서열번호: 140을 포함하는 방법.

49. 상기 36에 있어서, 상기 헤모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 LVVH7, VVH7, VH7, H7, LVVH6, LVVH5, VVH5, LVVH4, 및 LVVH3인 TVEMP.

50. 상기 49에 있어서, 상기 헤모르핀 펩타이드 표적화 도메인은 서열번호: 141, 서열번호: 142, 서열번호: 143, 서열번호: 144, 서열번호: 145, 서열번호: 146, 서열번호: 147, 서열번호: 148, 또는 서열번호: 149를 포함하는 TVEMP.

51. 상기 31-47에 있어서, 상기 클로스트리듐 독소 전위 도메인은 BoNT/A 전위 도메인, BoNT/B 전위 도메인, BoNT/C1 전위 도메인, BoNT/D 전위 도메인, BoNT/E 전위 도메인, BoNT/F 전위 도메인, BoNT/G 전위 도메인,

TeNT 전위 도메인, BaNT 전위 도메인, 또는 BuNT 전위 도메인인 TVEMP.

52. 상기 31-47에 있어서, 상기 클로스트리듐 독소 효소 도메인은 BoNT/A 효소 도메인, BoNT/B 효소 도메인, BoNT/C1 효소 도메인, BoNT/D 효소 도메인, BoNT/E 효소 도메인, BoNT/F 효소 도메인, BoNT/G 효소 도메인, TeNT 효소 도메인, BaNT 효소 도메인, 또는 BuNT 효소 도메인인 TVEMP.

53. 상기 32 및 34에 있어서, 상기 외인성 프로테아제 절단 부위는 식물 파파인 절단 부위, 곤충 파파인 절단 부위, 갑각류 파파인 절단 부위, 엔테로키나아제 절단 부위, 인간 라이노바이러스 3C 프로테아제 절단 부위, 인간 엔테로바이러스 3C 프로테아제 절단 부위, 담배 식각 바이러스 프로테아제 절단 부위, 담배 엽맥 모듈 (Tobacco Vein Mottling) 바이러스 절단 부위, 서브틸리신(subtilisin) 절단 부위, 히드록실아민 절단 부위, 또는 카스파제(Caspase) 3 절단 부위인 TVEMP.

54. 상기 31-53의 TVEMP를 포함하는 조성물.

55. 상기 54에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물인 조성물.

56. 상기 55에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 약제학적 담체, 약제학적 부형제, 또는 이의 임의 조합을 포함하는 조성물.

실시예

하기 실시예로 이제 포함되는 대표적 구현예를 예시하지만, 개시되는 TVEMP, TVEMP를 포함하는 조성물, 및 상기 조성물을 이용한 암 치료 방법을 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

실시예 1

경쇄 분석

본 실시예는 어느 클로스트리듐 독소의 경쇄가 암 치료에 치료적 이득을 제공하기 충분한 효과를 갖는지를 결정하기 위해 암 세포를 스크리닝하는 방법을 예시한다.

어느 클로스트리듐 독소의 경쇄 또는 이들의 활성 단편이 본 명세서에 개시된 방법을 이용하여 암을 치료하는 TVEMP의 제조에 유용한지를 동정하기 위해, 클로스트리듐 독소의 경쇄 절단 분석을 수행하였다. 이러한 분석으로 두 가지 기본적 문제가 확인된다. 첫째로 다양한 보툴리눔 신경독소 혈청형의 경쇄는 상이한 SNARE 기질을 절단한다. 부가적으로, 일부 세포는 천연 생성 보툴리눔 신경독소에 의해 절단되지 않는 SNAP-23만을 발현할 수 있다. 이들 세포는 LC/A에 감수성이 아니지만, 각각 시냅토프레빈-2(VAMP-2) 및/또는 신택신을 발현하는 경우 LC/B 및 LC/C1에 감수성일 수 있다. 두번째로 상기 전달감염 분석으로 수용체 결합 및 세포 내로의 전위와 무관한 방식으로 암 세포에 대한 경쇄의 세포성 효과를 조사할 수 있다. 종합해 보면, 상기 분석으로 여러 유형의 인간 암을 포함하는 다양한 암 세포주 상에서 SNARE 단백질의 절단 효과를 조사할 수 있다.

상이한 보툴리눔 신경독소 혈청형의 경쇄에 연결된 녹색 형광 단백질(GFP)을 포함하는 융합 단백질을 인코딩하는 포유류 발현 구축물을 표준 절차를 이용하여 제조하였다. 이러한 발현 구축물을 하기와 같이 명명하였다: 1) 서열 번호: 151의 폴리뉴클레오티드가 인코딩하는 서열 번호: 150의 GFP를 발현하는 구축물 pQBI25/GFP; 2) 서열 번호: 153의 폴리뉴클레오티드가 인코딩하는 서열 번호: 152의 GFP-LC/A 융합 단백질을 발현하는 구축물 pQBI25/GFP-LC/A; 3) 서열 번호: 155의 폴리뉴클레오티드가 인코딩하는 서열 번호: 154의 GFP-LC/B 융합 단백질을 발현하는 구축물 pQBI/GFP-LC/B; 4) 서열 번호: 157의 폴리뉴클레오티드가 인코딩하는 서열 번호: 156의 GFP-LC/C1 융합 단백질을 발현하는 구축물 pQBI/GFP-LC/C1; 및 5) 서열 번호: 159의 폴리뉴클레오티드가 인코딩하는 서열 번호: 158의 GFP-LC/E 융합 단백질을 발현하는 구축물 pQBI/GFP-LC/E. 전체적으로 경쇄들이 3가지 우세한 SNARE 단백질 SNAP-25, VAMP, 또는 신택신 중 하나를 절단하므로, 이들 특정 보툴리눔 독소 혈청형에 대한 경쇄를 선택하였다.

세포를 배양하기 위해, 적절한 밀도의 세포를 3 mL의 적절한 배지를 함유하는 6-웰 조직 배양 플레이트의 웰 내로 접종하였다(표 5). 세포가 적절한 밀도(약 1×10^6 개 세포)에 도달할 때까지 세포를 5% 이산화탄소 하의 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 10 μ L의 LipofectAmine 2000(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)을 함유하는 250 μ L의 OPTI-MEM 혈청 감소 배지를 5 μ g의 원하는 포유류 발현 구축물을 함유하는 250 μ L의 OPTI-MEM 혈청 감소 배지에 첨가하여 500 μ L의 전달감염 용액을 제조하였다. 상기 전달감염 혼합물을 실온에서 대략 25분 동안 인큐베이션하였다. 성장 배지를 새로운 무첨가 무혈청 배지로 교체하고 500 μ L의 전달감염 용액을 세포에 첨가하였다. 이어서 세포를 5% 이산화탄소 하의 37°C 인큐베이터에서 대략 8시간 동안

안 인큐베이션하였다. 전달감염 배지를 새로운 무첨가 무혈청 배지로 교체한 후 세포를 5% 이산화탄소 하의 37 °C 인큐베이터에서 대략 48시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 인큐베이션 후, 세포의 배지를 흡입 제거하여 세척하고, 각 웰을 3 mL의 1 x PBS로 행구었다.

세포주	기원	공급처	혈청 성장 배지 조성
RT4	인간 방광 전이 세포암종	ATCC HTB-2	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 McCoy의 5a 배지
P19	마우스 태아암종	ATCC CRL-1825	7.5% 소 혈청, 2.5% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 알파 최소 필수 배지
NCI H69	인간 소세포 폐암종	ATCC HTB-119	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 RPMI-1640 배지
NCI H82	인간 소세포 폐암종	ATCC HTB-175	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 RPMI-1640 배지
DU-145	뇌 유래 인간 전립선암종	ATCC HTB-81	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 Eagle의 최소 필수 배지
T24	인간 방광 전이 세포암종	ATCC HTB-4	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 McCoy의 5a 배지
J82	인간 방광 전이 세포암종	ATCC HTB-1	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 Eagle의 최소 필수 배지
HIT-T15	시리아 골든 햄스터, 랑게르한스 베타 세포의 이자섬	ATCC CRL-1777	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 Eagle의 최소 필수 배지(저농도 글루코오스)

세포를 먼저 부착된 경쇄의 동시적 발현을 시사하는 GFP의 발현에 대해 형광 현미경검사를 이용하여 분석하였다. GFP-LC 융합 단백질의 발현 및 세포하 분석의 편재를 검출하기 위해, 세포를 동일초점 현미경검사로 조사하였다. 상술된 바와 같이 전달감염 및 세척된 세포주 RT4, P19, NCI H69, NCI H82, DU145, T24, 및 J82 유래의 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 고정된 세포를 488 nm 여기 레이저와 510-530 nm의 방출 경로를 이용하는 동일초점 현미경으로 이미지화하였다. 데이터는 각각의 세포 유형이 성공적으로 전달감염되었으며, 소세포성 폐암 세포주 NCI H69 및 NCI H82를 제외하고 각각의 세포주에서 유래한 세포들이 GFP 및 GFP-경쇄 융합 단백질 모두를 발현함을 나타내었다(표 6).

세포주	기원	발현				
		GFP	GFP-LC/A	GFP-LC/B	GFP-LC/C1	GFP-LC/E
RT4	방광암종	+	+	+	+	+
P19	태아암종	+	+	+	+	+
NCI H69	소세포 폐암종	-	-	-	-	-
NCI H82	소세포 폐암종	-	-	-	-	-
DU145	전립선암종	+	+	+	+	+
T24	방광암종	+	+	+	+	+
J82	방광암종	+	+	+	+	+

암 세포가 내부단백분해 절단에 민감성이 되기 위해서는 표적 SNARE 단백질이 내인적으로 발현되고 경쇄 절단에 접근가능해야 한다. 절단된 SNARE 산물의 존재를 검출하기 위해, 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 상술된 바와 같이 전달감염 및 세척된 세포주 RT4, P19, NCI H69, NCI H82, DU145, T24, 및 J82 유래의 세포 각각의 웰에 200 μ l의 2 x SDS-PAGE 로딩 완충액을 첨가하여 용해시키고, 용해액을 튜브로 옮겨 95°C에서 5분 동안 가열하였다. 12 μ l의 각 표본을 변성 환원 조건 하의 NuPAGE[®] Novex 4-12% 비스-트리스 프리캐스트 폴리아크릴아미드 겔(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)을 사용하여 MOPS 폴리아크릴아미드 겔에 의해 분리하였다. 분리된 펩타이드를 전기영동 탱크 전달 기구를 이용한 웨스턴 블로팅에 의해 겔로부터 니트로셀룰로오스 막 상으로 옮겼다. 막을 트리스-완충 식염수(TBS)(25 mM 2-아미노-2-히드록시메틸-1,3-프로판디올 염산(트리스-HCl)(pH 7.4), 137 mM 염화나트륨, 2.7 mM 염화칼륨), 0.1% 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트, 2% 소 혈청 알부민(BSA), 및 5% 무지방 건조유를 함유하는 블로킹 용액 중에서 부드럽게 진탕하면서 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하여 블로킹하였다. 차단된 막을 TBS, 0.1% 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트, 2% BSA, 및 1) 일차 항체로서 S9684 α -SNAP-25 래빗(rabbit) 폴리클로날 항혈청(Sigma, St. Louis, MO)의 1:5,000배 희석액; 2) 일차 항체로서 sc17836 α -Syntaxin-1 래빗 폴리클로날 항혈청(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)의 1:5,000배 희석액; 또는 3) 일차 항체로서 sc69706 α -VAMP-2 마우스 폴리클로날 항혈청(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)의 1:5,000배 희석액 중에서 하룻밤 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 일차 항체로 탐침한 블롯을 매번 TBS, 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트 중에서 5분씩 3회 세척하였다. 세척한 막을 이차 항체로서 1) 홀스래디쉬 페록시다아제에 접합된 81-6720 염소 폴리클로날 α -마우스 면역글로불린 G, 중쇄 및 경쇄(IgG, H+L) 항체의 1:5,000배 희석액(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); 또는 2) 홀스래디쉬 페록시다아제에 접합된 81-6120 염소 폴리클로날 α -래빗 면역글로불린 G, 중쇄 및 경쇄(IgG, H+L) 항체(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)의 1:5,000배 희석액을 함유하는 TBS, 0.1% 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트, 2% BSA 중에서 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이차 항체로 탐침한 블롯을 매번 TBS, 0.1% 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트 중에서 5분씩 3회 세척하였다. 표지된 SNARE 산물의 신호 검출을 화학발광 기반 검출 시스템인 ECL Plus[™] 웨스턴 블롯 검출 시스템(GE Healthcare-Amersham, Piscataway, NJ)을 이용하여 시각화하였다. 상기 막들을 이미지화하고 절단된 SNARE 산물의 백분율을 Typhoon 9410 Variable Mode Imager 및 Imager 분석 소프트웨어(GE Healthcare-Amersham, Piscataway, NJ)를 이용하여 정량하였다. 데이터는 SNAP-25 및 VAMP-2가 일부 세포 유형에서 발현되는 반면 선택신은 시험한 각 세포 유형에서 발현됨을 나타내었다(표 7).

표 7. 세포 내 SNARE의 존재

세포주	기원	세포 내 SNARE의 존재		
		SNAP-25	VAMP-2	선택신-1
RT4	방광암종	-	+	+
P19	태아암종	+	-	+
NCI H69	소세포 폐암종	ND	ND	ND
NCI H82	소세포 폐암종	ND	ND	ND
DU145	전립선암종	+	+	+
T24	방광암종	-	+	+
J82	방광암종	+	-	+

또한, 데이터는 1) BoNT/A 경쇄가 P19 태아 암종 세포주, DU145 전립선암종 세포주, 및 J82 방광암종 세포주 유래 세포에 존재하는 SNAP-25를 절단할 수 있으며(표 8); 2) BoNT/E 경쇄가 P19 태아 암종 세포주, 및 J82 방광암종 세포주 유래 세포에 존재하는 SNAP-25를 절단할 수 있고(표 8); 3) BoNT/B 경쇄가 시험한 모든 세포주에서 VAMP-2를 절단할 수 없으며(표 8); 및 4) BoNT/C1 경쇄가 T24 방광암종 세포주 유래 세포에 존재하는 선택신-1을 절단할 수 있음을 나타내었다(표 8). 이들 결과는 적절한 클로스트리듐 독소 경쇄로의 암 세포 치료가 3개 SNARE 단백질 중 하나를 절단하여 세포외 배출을 저해할 것임을 시사한다. 이러한 저해는 암 세포 성장 및 생존에 필요한 성장 인자, 혈관신생 인자, 및 항-아포토시스 생존 인자의 방출을 예방할 것이다.

세포주	기원	경쇄에 의한 SNARE 의 절단			
		SNAP-25		VAMP-2	신택신-1
		LC/A	LC/E	LC/B	LC/C1
RT4	방광암종	-	-	-	-
P19	태아암종	+	+	-	-
NCI H69	소세포 폐암종	ND	ND	ND	ND
NCI H82	소세포 폐암종	ND	ND	ND	ND
DU145	전립선암종	+	-	-	-
T24	방광암종	-	-	-	+
J82	방광암종	+	+	-	-

SNARE 절단이 세포의 배출을 손상시키는지 여부를 추가 평가하기 위해, 인슐린 방출 분석을 수행하였다. HIT-T15 세포는 고농도 글루코오스 중에 놓이는 경우 인슐린을 방출한다. 또한 이들 세포는 SNAP-25를 발현하며, SNAP-25가 인슐린 방출에 필요한 SNARE 복합체의 통합적 성분인 것으로 나타났다. 상술된 바와 같이 전달감염 및 세척된 HIT-T15 세포를 1) 기저 인슐린 방출을 위한 5.6 mM 글루코오스(저농도 글루코오스); 또는 2) 유발된 인슐린 방출을 위한 25.2 mM 글루코오스(고농도 글루코오스)를 함유하는 DMEM 배지 중에 놓았다. 세포를 대략 1 시간 동안 5% 이산화탄소 하에 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하여 인슐린을 방출시켰다. 인큐베이션한 배지를 수집하여 방출된 인슐린 양을 인슐린 ELISA 키트를 이용해 결정하였다. 제조자의 지시(APLCO Diagnostics, Salem, NH)에 따라 분석을 수행하였다. 세포의 배출은 시간 당 1×10^6 개 세포가 방출한 인슐린의 양으로 표현하였다.

테이터는 GFP-LC/A, GFP-LC/B, 및 GFP-LC/E로 전달감염된 HIT-T15 세포가 비전달감염된 세포 또는 GFP로 전달감염된 세포에 비해 인슐린을 덜 방출함을 보여주었다(표 9). 또한, 저농도 글루코오스(5.6 mM)를 함유하는 배지 중에 방출된 기저 인슐린은 전달감염된 세포 간에 변화 없이 유지되었다. 테이터는 BoNT/A, BoNT/B 및 BoNT/E 경쇄가 HIT-T15 세포에서 SNAP-25 또는 VAMP-2의 절단에 의해 인슐린 방출을 저해함을 시사한다.

구축물	5.6 mM 글루코오스(저농도)	25.2 mM 글루코오스(고농도)
비전달감염 대조군	6.5 +/- 0.1	9.9 +/- 2.9
GFP	4.3 +/- 0.7	10.8 +/- 2.1
GFP-LCA	3.2 +/- 0.4	4.5 +/- 0.6
GFP-LCB	3.4 +/- 0.2	5.5 +/- 0.9
GFP-LCE	4.2 +/- 0.7	4.4 +/- 1.0

보툴리눔 독소 경쇄 활성화는 또한 단백질의 형질막으로 및 형질막으로부터의 수송을 저해할 수 있다. SNARE 절단이 수용체의 형질막으로의 전달 및 편재를 손상시키는지 여부를 평가하기 위해, 세포 막 단백질의 존재 또는 부재를 보툴리눔 독소 경쇄로 전달감염된 세포에서 결정하였다. 상술된 바와 같이 전달감염 및 세척된 세포주 DU145 및 J82 유래 세포를 2 mM NHS-LC-바이오틴(Thermo Scientific, Rockford, IL)으로 4°C에서 2시간 동안 처리하였다. 이어서 세포를 250 mM Tris-HCl(pH 7.5)로 30분 동안 4°C에서 처리한 후 TBS 중에 3회 세척하였다. 막 단백질을 제조자의 지시에 따라 막 단백질 추출 키트(Calbiochem, San Diego, CA)를 이용하여 단리하였다. 바이오틴화 단백질을 고정화된 애비딘(Thermo Scientific, Rockford, IL)으로 침전시켰다. TBS로 3회 세척 후, 표본을 50 μ l의 2x SDS-PAGE 로딩 완충액 중에 현탁하고, 변성 환원 조건 하에 NuPAGE® Novex 4-12% 비스-트리스 프리캐스트 폴리아크릴아미드 겔(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)을 사용하여 MOPS 폴리아크릴아미드 겔에 의해 분리하였다. 겔을 세척하여 10% 메탄올 및 7% 아세트산 중에 30분 동안 고정하였다. 세척 용액을 제거하여 겔을 SYPRO® Ruby 단백질 겔 염색 용액(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 중에서 3시간 내지 하룻밤 동안

실온에서 인큐베이션하였다. 염색한 겔을 10% 메탄올 및 7% 아세트산 중에 30분 동안 탈염색하였다. 탈염색한 겔의 화학발광도를 Typhoon 9410 Variable Mode Imager 및 Imager 분석 소프트웨어(GE Healthcare-Amersham, Piscataway, NJ)를 이용하여 시각화하였다. 데이터는 BoNT/A 경쇄 처리가 세포 표면에 위치하는 수용체군에 반드시 영향을 주게 될 형질막으로 및 형질막으로부터의 단백질 수송을 저해함을 보여주었다. 이처럼, 손상된 수송은 암 세포를 아포토시스 인자에 대해 보다 민감해지고 성장 신호 및 혈관신생 인자에 대해 덜 민감해지도록 할 수 있다.

경쇄에 의한 SNARE 절단 효과와 각 세포주에서 어느 경쇄가 어느 SNARE 단백질을 절단하는지를 확립하고, 이어서 TVEMP를 촉매 경쇄를 전달하기 위해 암 세포에서 과발현되거나 독특하게 발현되는 수용체로 TVEMP를 표적화하는 방식으로 설계하였다.

실시예 2

암 세포 내 수용체 및 표적의 존재

본 실시예는 본 명세서에 개시된 TVEMP의 표적화 부분에 결합할 수 있는 인지체 수용체의 존재 뿐만 아니라 본 명세서에 개시된 TVEMP의 효소 도메인의 표적 SNARE 단백질의 존재를 결정하는 방법을 예시한다.

TVEMP가 본 명세서에 개시된 암 치료 방법을 위해 효과적인 제제가 되기 위해서는 암 세포가 TVEMP의 표적화 부분에 결합할 수 있는 적절한 수용체 뿐만 아니라 TVEMP의 효소 도메인에 의해 절단될 수 있는 적절한 SNARE 단백질을 발현해야 한다.

배양 세포에, 적절한 밀도의 세포를 혈청이 없고 25 μ g/mL의 GT1b(Alexis Biochemicals, San Diego, CA)를 첨가하거나 첨가하지 않은 100 μ l의 적절한 배지(표 10)를 함유하는 96-웰 조직 배양 플레이트의 웰 내로 접종하였다. 세포를 접종하고, 표준적이고 일상적인 형태학적 요건, 예컨대 성장 정지(대략 3일)로 평가되는 바와 같이 세포가 분화할 때까지 5% 이산화탄소 하에 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 배지를 각각의 웰에서 흡입 제거하고 완전한 용량 반응을 일으키기 위해 시험하고 있는 다양한 농도의 보툴리눔 독소 또는 TVEMP를 함유하는 100 μ l의 새로운 배지로 교체하였다. 분석은 3개씩 수행하였다. 처리 24시간 후, 세포를 세척하고 독소 또는 TVEMP 없이 추가 2일 동안 인큐베이션하여 SNARE 기질을 절단시켰다. 상기 인큐베이션 후, 배지를 흡입 제거하여 세포를 세척하고 각각의 웰을 3 mL의 1 x PBS로 행구었다. 세포를 연속 진탕하면서 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 새로 제조한 용해 완충액(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1%, 4-옥틸페놀 폴리옥실레이트) 중에 용해시켜 수집하였다. 용해시킨 세포를 4000rpm에서 20분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 벤치탑 원심분리기를 이용하여 파편을 제거하였다. 세포 용해액의 총 단백질 농도를 브래드포드 분석으로 측정하였다.

표 10. 세포주 및 배지			
세포주	기원	공급처	혈청 성장 배지 조성
RT4	인간 방광 전이 세포 암종	ATCC HTB-2	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 McCoy의 5a 배지
P19	마우스 태아암종	ATCC CRL-1825	7.5% 소 혈청, 2.5% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 Alpha 최소 필수 배지
NCI H69	인간 소세포 폐암종	ATCC HTB-119	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 RPMI-1640 배지
NCI H82	인간 소세포 폐암종	ATCC HTB-175	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 RPMI-1640 배지
DU-145	뇌 유래 인간 전립선 암종	ATCC HTB-81	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 Eagle의 최소 필수 배지
PC-3	뇌 유래 인간 전립선 암종	ATCC CRL-1435	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 F-12K 배지
LNCaP 클론 FGC	뇌 유래 인간 전립선 암종	ATCC CRL-1740	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 RPMI-1640 Eagle
RWPE-1	인간 전립선	ATCC CRL-11609	10% 소 태아 혈청, 2 mM GlutaMAX™ I와 0.1 mM 비필수 아미노산, 10 mM HEPES, 1 mM 피루브산나트륨, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 Dulbecco의 최소 필수 배지
T24	인간 방광 전이 세포 암종	ATCC HTB-4	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 McCoy의 5a 배지
J82	인간 방광 전이 세포 암종	ATCC HTB-1	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 Eagle의 최소 필수 배지
MCF-7	인간 유방암종	ATCC HTB-22	10% 소 태아 혈청, 2 mM GlutaMAX™ I와 0.1 mM 비필수 아미노산, 10 mM HEPES, 1 mM 피루브산나트륨, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 Dulbecco의 최소 필수 배지
SiMa	인간 신경모세포종	DSMZ ACC 164	10% 소 태아 혈청, 0.1 mM 비필수 아미노산, 10 mM HEPES, 1 mM 피루브산나트륨, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 RPMI 1640
266.6	마우스 췌장	ATCC CRL -2151	10% 소 태아 혈청, 2 mM GlutaMAX™ I와 0.1 mM 비필수 아미노산, 10 mM HEPES, 1 mM 피루브산나트륨, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 Dulbecco의 최소 필수 배지

HIT-T15	햄스터 랑게르한스 베타 세포의 이자선	ATCC CRL-1777	10% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 첨가 Eagle의 최소 필수 배지 (저농도 글루코오스)
HUVEC	인간 헛줄 정맥 내피 세포	Cell Applications, Inc., San Diego, CA, Cat. No. 200-05n	내피 세포 성장 배지(Cell Applications, Inc., San Diego, CA, Cat. No. 211-500)

암 세포가 적절한 수용체 및 표적 SNARE 단백질을 발현하는지 여부를 결정하기 위해, 웨스턴 블롯 분석을 수행할 수 있다.

하나의 실험에 있어서, 상술된 바와 같이 전달감염 및 세척된 세포주 RT4, P19, NCI H69, NCI H82, DU-145, T24, J82, LNCaP, 및 PC-3 유래의 세포에 40 µl의 2 x SDS-PAGE 로딩 완충액(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)을 첨가하고 95°C에서 5분 동안 플레이트를 가열하여 세포를 수집하였다. 변성 환원 조건 하에 1) SNAP-25¹⁹⁷ 절단 산물을 분리하는 경우 CRITERION® 12% 비스-트리스 프리캐스트 폴리아크릴아미드 겔(Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA); 2) 미절단 SNAP-25₂₀₆ 기질 및 SNAP-25₁₉₇ 절단 산물을 모두 분리하는 경우 NuPAGE[®] 12% 비스-트리스 프리캐스트 폴리아크릴아미드 겔(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA); 또는 3) 모든 다른 단백질을 분리하는 경우 NuPAGE[®] Novex 4-12% 비스-트리스 프리캐스트 폴리아크릴아미드 겔(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)을 이용하여 MOPS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 12 μl의 수집된 표본을 분리하였다. 분리된 펩타이드를 전기영동 탱크 전달 기구를 이용한 웨스턴 블로팅에 의해 겔로부터 니트로셀룰로오스 막 상으로 옮겼다. 막을 트리스-완충 식염수(TBS)(25 mM 2-아미노-2-히드록시메틸-1,3-프로판디올 염산(트리스-HCl)(pH 7.4), 137 mM 염화나트륨, 2.7 mM 염화칼륨), 0.1% 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트, 2% 소 혈청 알부민(BSA), 및 5% 무지방 건조유를 함유하는 블로킹 용액 중에서 부드럽게 진탕하면서 1 시간 동안 실온에서 인큐베이션하여 블로킹하였다. 블로킹된 막을 TBS, 0.1% 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트, 2% BSA, 및 1) 일차 항체로서 S9684 α-SNAP-25 래빗 폴리클로날 항혈청(Sigma, St. Louis, MO)의 1:5,000배 희석액; 2) 일차 항체로서 sc123 α-Syntaxin-1 래빗 폴리클로날 항혈청(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)의 1:5,000배 희석액; 3) 일차 항체로서 sc13992 α-VAMP-1/2/3 래빗 폴리클로날 항혈청(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)의 1:5,000배 희석액; 4) 일차 항체로서 sc50371 α-SNAP-23 래빗 폴리클로날 항혈청(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)의 1:5,000배 희석액; 5) 일차 항체로서 sc28955 α-SVC2 래빗 폴리클로날 항혈청(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)의 1:5,000배 희석액; 6) 일차 항체로서 sc123 α-FGFR3 래빗 폴리클로날 항혈청(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)의 1:5,000배 희석액; 7) 일차 항체로서 sc9112 α-KOR1 래빗 폴리클로날 항혈청(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)의 1:5,000배 희석액; 8) 일차 항체로서 H00004987-D01P α-OPRL1 래빗 폴리클로날 항혈청(Novus Biologicals, Littleton, CO)의 1:5,000배 희석액; 및 9) 일차 항체로서 sc47778 α-β-액틴 래빗 폴리클로날 항혈청(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)의 1:5,000배 희석액 중에서 하룻밤 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 일차 항체로 탐침한 블롯을 매번 TBS, 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트 중에서 5분씩 3회 세척하였다. 세척한 막을 이차 항체로서 1) 홀스래디쉬 페록시다아제에 접합된 81-6720 염소 폴리클로날 α-마우스 면역글로블린 G, 중쇄 및 경쇄(IgG, H+L) 항체의 1:5,000배 희석액(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); 또는 2) 홀스래디쉬 페록시다아제에 접합된 81-6120 염소 폴리클로날 α-래빗 면역글로블린 G, 중쇄 및 경쇄(IgG, H+L) 항체 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)의 1:5,000배 희석액을 함유하는 TBS, 0.1% 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트, 2% BSA 중에서 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이차 항체로 탐침한 블롯을 매번 TBS, 0.1% 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트 중에서 5분씩 3회 세척하였다. 표지된 SNARE 산물의 신호 검출을 화학발광 기반 검출 시스템인 ECL Plus[™] 웨스턴 블롯 검출 시스템(GE Healthcare-Amersham, Piscataway, NJ)을 이용하여 시각화하였다. 상기 막들을 이미지화하고 절단된 SNARE 산물의 백분율을 Typhoon 9410 Variable Mode Imager 및 Imager 분석 소프트웨어(GE Healthcare-Amersham, Piscataway, NJ)를 이용하여 정량하였다. 데이터는 본 접근법으로 각각의 세포주가 포함하는 세포 중에 존재하는 수용체 및 SNARE 단백질을 동정할 수 있음을 나타내었다(표 11).

표 11. 세포 내 수용체 및 SNARE 단백질의 발현

세포주	발현							
	SNAP-25	SNAP-23	VAMP-2	신택신-1	FGFR3	SV2C	OPRL-1	KOR-1
RT4	+	-	+	+	+	+	ND	+
P19	+	-	-	+	+	-	ND	+
NCI H69	+	-	+	+	+	-	ND	+
NCI H82	+	-	+	+	+	-	ND	+
DU-145	++	+	++	++	+++	ND	ND	+
PC-3	-	++	+/-	++	+++	ND	ND	+
LNCaP 클론 FGC	+	+	+	+	+++	+++	++	+
T24	-	++	+	+	++	++	++	+
J82	++	+/-	++	+	+++	++	++	+

ND, 결정되지 않음

일단 적절한 수용체 및 SNARE 단백질을 포함하는 세포를 포함하는 세포주가 동정된 후, 보툴리눔 독소 또는

TVEMP가 이들 세포를 증독시키는 능력을 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 절단된 SNARE 산물의 존재를 검출함으로써 결정할 수 있다. 적절한 밀도의 각 세포주 유래 세포를 25 µg/mL의 GT1b(Alexis Biochemicals, San Diego, CA)를 포함하거나 포함하지 않는 100 µL의 적절한 배지(표 7)를 함유하는 96-웰 조직 배양 플레이트의 웰 내로 접종하였다. 세포를 접종하고, 표준적이고 일상적인 형태학적 요건, 예컨대 성장 정지(대략 3일)로 평가되는 바와 같이 세포가 분화할 때까지 5% 이산화탄소 하에 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 배지를 각각의 웰에서 흡입 제거하고 완전한 용량 반응을 일으키기 충분한 시험하고 있는 다양한 농도의 보툴리눔 독소 또는 TVEMP를 함유하는 100 µL의 새로운 배지로 교체하였다. 분석은 3개씩 수행하였다. 처리 24시간 후, 세포를 세척하고 독소 또는 TVEMP 없이 추가 2일 동안 인큐베이션하여 SNARE 기질을 절단시켰다. 상기 인큐베이션 후, 배지를 흡입 제거하여 세포를 세척하고 각각의 웰을 3 mL의 1 x PBS로 행구었다. 세포를 연속 진탕하면서 4°C에서 30분 동안 새로 제조한 용해 완충액(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1%, 4-옥틸페놀 폴리에톡실레이트) 중에 용해시켜 수집하였다. 용해시킨 세포를 4000rpm에서 20분 동안 4°C에서 원심분리하여 벤치탑 원심분리기를 이용하여 과편을 제거하였다. 세포 용해액의 단백질 농도를 브래드포드 분석으로 측정하였다. 세포 용해액의 표본을 상술된 바와 같이 웨스턴 블롯 분석에 의해 분석하였다.

하나의 실험에 있어서, 세포주 LNCaP, J82, 및 MCF-7 유래의 분화된 세포를 상술된 바와 같이 전달감염시켰다. 각각의 웰로부터 배지를 흡입 제거하고 분화된 세포를 1) 0 (미처리 표본), 0.12 nM, 0.36 nM, 1.1 nM, 3.3 nM, 10 nM, 30 nM, 및 90 nM의 BoNT/A; 2) 0 (미처리 표본), 및 50 nM의 BoNT/A; 3) 0 (미처리 표본), 0.12 nM, 0.36 nM, 1.1 nM, 3.3 nM, 10 nM, 30 nM, 및 90 nM의 Noci-LH_N/A로 명명된 TVEMP; 또는 4) 0 (미처리 표본), 및 166 nM의 Noci-LH_N/A로 명명된 TVEMP를 함유하는 새로운 배지로 교체하여 처리하였다. 1) 3-15 시간; 2) 6 시간 또는 3) 24 시간 처리 후, 세포를 세척하고 독소 또는 TVEMP 없이 추가 16 시간 동안 인큐베이션하여 SNAP-25 기질을 절단시켰다. 본 인큐베이션 후, 세포를 세척하고 상술된 바와 같이 수집하였다. 절단된 SNAP-25 산물의 존재를 일차 항체로서 S9684 α-SNAP-25 래빗 폴리클로날 항혈청(Sigma, St. Louis, MO)의 1:5,000배 희석액 및 이차 항체로서 홀스래디쉬 페록시다아제에 접합된 81-6120 염소 폴리클로날 α-래빗 면역글로불린 G, 중쇄 및 경쇄(IgG, H+L) 항체(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)의 1:5,000배 희석액을 사용하여 상술된 바와 같이 웨스턴 블롯 분석을 이용해 검출하였다. 이 결과를 표 12에 나타낸다.

세포주	절단 검출을 위한 최저 농도 및 최초 시간	
	BoNT/A	Noci-LH _N /A
LNCaP	50 nM, 9시간	166 nM, 9시간
J82	50 nM, 3시간 1.1 nM, 24시간	166 nM, 3시간
MCF-7	1.1 nM, 6시간	ND
ND, 결정되지 않음		

종합적으로, 데이터는 1) BoNT/A가 LNCaP 전립선암종 세포주, J82 방광암종 세포주, 및 MCF-7 유방암종 세포주 유래 세포에 존재하는 SNAP-25를 절단할 수 있으며(표 9); 2) Noci-LH_N/A가 LNCaP 전립선암종 세포주 및 J82 방광암종 세포주 유래 세포에 존재하는 SNAP-25를 절단할 수 있음(표 9)을 나타내었다. 적절한 클로스트리듐 독소의 경쇄로의 암 세포 치료가 3개 SNARE 단백질 중 하나를 절단하여 세포의 배출을 저해할 것임을 시사한다. 이러한 저해는 암 세포 성장 및 생존에 필요한 성장 인자, 혈관신생 인자, 및 항-아포토시스 생존 인자의 방출을 예방할 것이다. 마지막으로 이들 실험은 보툴리눔 경쇄의 암 세포 내로의 세포내 전달이 경쇄 구축물의 전달감염에 의해서 뿐만 아니라 표적화 도메인에 대한 내인성 신호 전달 경로를 이용함으로써 적절한 SNARE 단백질을 절단시킨다는 일반적 개념의 타당성을 나타낸다.

실시예 3

혈관신생에 대한 경쇄 전달의 효과

본 실시예는 보툴리눔 독소 또는 TVEMP를 이용한 치료가 암 치료에서 치료 이득을 제공하기 충분한 정도로 혈관신생에 영향을 미칠 것임을 나타낸다.

LHN/A-G에 기반한 TVEMP 또는 보툴리눔 독소를 이용한 치료에서 야기되는 세포외 배출의 차단은 예로 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자-1(FGF1) 및 FGF2를 포함하는 혈관신생 인자의 방출을 예방할 수 있을 것이다. 이들 혈관신생 인자의 방출 예방은 독소 또는 TVEMP가 투여되는 부위에서 혈관신생을 감소시키거나 함께 저해할 것이다. 이러한 치료가 혈관신생을 감소시키거나 저해하는지 여부를 평가하기 위해, 4가지 상이한 분석을 수행하였다: VEGF 방출 분석, 세포 이동 분석, 시험관 내 혈관 형성 분석, 및 인간 혈관신생 단백질 어레이 분석.

VEGF는 혈관 내피 세포에 대한 강력한 유사분열물질이며 생리학 및 병리학 혈관신생의 유도자로 공지되어 있다. 보툴리눔 독소 또는 TVEMP의 혈관신생 저해 가능성을 확인하기 위해, 독소 또는 TVEMP가 세포로부터 VEGF 방출을 저해하는 능력을 평가하였다. VEGF 방출 분석을 수행하기 위해, SiMa 세포주 유래의 약 600,000개 세포를 최소 필수 배지, 2 mM GlutaMAX™ I와 Earle의 염, 1 x B27 보충제, 1 x N2 보충제, 0.1 mM 비필수 아미노산, 10 mM HEPES 및 25 µg/mL GT1b를 함유하는 3 mL의 무혈청 배지를 함유하는 6-웰 IV형 콜라겐 조직 배양 플레이트의 웰 내로 접종하였다. 이들 세포를 표준적이고 일상적인 형태학적 요건, 예컨대 성장 정지 및 신경돌기 연장(대략 3일)으로 평가되는 바와 같이 세포가 분화할 때까지 5% 이산화탄소 하에 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 분화된 세포의 각 웰로부터 배지를 흡입 제거하고 0.77 mg/mL의 BoNT/A 또는 1 mg/mL의 Noci-LH_N/A TVEMP를 함유하는 새로운 배지로 교체하였다. 대조군으로 세포에 배지만을 병렬 처리하였다. 처리 후 배지를 제거하고 새로운 분화 배지로 교체하였다. 60 µl 분취량의 배지를 각 웰에서 제거하고, 새로운 분화 배지 첨가 1일, 2일, 3일 및 4일 후 100 µl 분화 배지로 교체하였다. 제거한 배지는 필요 시까지 -20°C에 보관하였다. 최종 표본을 제거한 후, 세포를 트립신 처리하고, 각 웰의 세포수를 계수하였다.

수집된 표본 중 VEGF의 존재는 K151BMB-1 VEGF 조직 배양 분석(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)을 이용하여 검출하였다. MULTI-ARRAY® 96-웰 스몰 스팟 플레이트 VEGF 플레이트를 150 µl의 블로킹 완충액(0.05% 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트, 2% ECL 블로킹제(GE Healthcare-Amersham, Piscataway, NJ), 및 1% 염소 혈청(Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) 첨가 PBS)으로 블로킹하고 600 rpm에서 1시간 동안 진탕하였다. 블로킹 완충액을 방출하고 25 µl의 각각의 표본을 VEGF 플레이트의 각 웰에 첨가하여 플레이트를 4°C에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 200 µl의 PBS-T(PBS + 0.05% Tween-20)로 3회 세척하고, 이어서 25 µl의 2% 항체 완충액(PBS + 0.05 % 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우리에이트, 및 2% ECL 블로킹제(GE Healthcare-Amersham, Piscataway, NJ)) 중의 SULFO-TAG α-hVEGF 마우스 모노클로날 항체 5 µg/mL를 첨가하여 600 rpm으로 RT에서 1 시간 동안 진탕기 상에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS-T로 3회 세척한 후, 150 µl의 판독 완충액(MSD, Cat# R92TC-1)을 웰 마다 첨가하였다. 플레이트를 SECTOR™ Imager 6000 이미지 판독기(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)로 판독하였다. 이어서 데이터를 Microsoft Office Excel 2007로 내보내었다. 검출된 VEGF의 양을 웰에 존재하는 세포수로 표준화하고, VEGF 방출% 값을 대조군을 100% 값으로 이용하여 계산하였다.

데이터는 BoNT/A로의 치료가 SiMa 세포에서 VEGF 방출을 약 50% 저해함을 보여주었다(표 13). Noci-LH_N/A TVEMP의 첨가는 VEGF 방출을 저해하지 않는 것으로 나타났으나, 상기 결과는 SiMa 세포에서 BoNT/A에 비해 Noci-LH_N/A TVEMP의 역량이 낮기 때문일 수 있다. 분화된 SiMa 세포에서 BoNT/A의 EC₅₀는 약 0.5 nM 미만인 반면, Noci-LH_N/A TVEMP의 EC₅₀는 30 nM를 초과하였다. 이처럼, SiMa 세포에서 Noci-LH_N/A TVEMP의 효과 부재는 단순히 이들 세포에 존재하는 낮은 양의 OPRL-1 수용체에 기인한다. 이러한 효과의 부재는 저수준의 표적화 수용체를 발현하는 세포(즉 관심 수용체를 과발현하는 중앙 주위의 정상 세포)는 보툴리눔 독소 또는 TVEMP 처리에 영향을 받지 않을 것이라는 개념을 확인시켜 준다. 또한 VEGF의 공지된 전사 조절제인 IL-6의 첨가가 VEGF 방출에 효과가 없었다는 발견은 외인성 IL-6의 첨가가 VEGF 분비에 영향을 미치지 않는다는 보고와도 일치한다.

시점	VEGF 방출		
	대조군	BoNT/A	Noci-LH _N /A TVEMP
1 일	100%	69%	119%
2 일	100%	57%	123%
3 일	100%	53%	125%
4 일	100%	57%	104%

VEGF는 이동 유도자이므로, VEGF의 방출에 영향을 미치는 화합물은 이동에도 효과를 낼 것이다. 또한, 화합물에 의한 세포의 배출의 저해도 역시 세포 이동에 관여하는 추가 인자의 방출을 저해할 것이다. 보툴리눔 독소 또는 TVEMP 처리가 세포 이동을 감소 또는 저해시킬 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 제조사의 지시에 따라 세포 이동 분석(Essen Bioscience, Ann Arbor, MI)을 수행하였다. 1일째에, DU-145 세포를 성장 배지 중 96-웰 Essen ImageLock 플레이트의 웰 당 25,000개 세포씩 접종하였다. 2일째에 세포에 성장 배지 중의 10 nM BoNT/A, 40 nM Noci-LH_N/A TVEMP, 또는 90 nM Gal-LH_N/A TVEMP를 처리하였다. 이동 저해를 위한 양성 대조군으로 세포를 0.11 μM, 0.33 μM, 또는 1 μM의 시토칼라신-D로 처리하였다. 음성 대조군으로, 세포를 배지만으로 처리하였다. 3일째에 세포가 100% 융합에 도달한 후, 세포를 배지로 세척한 뒤 96-핀 WoundMaker(Essen Bioscience, Ann Arbor, MI)를 이용하여 모든 웰에 동시에 상처를 만들었다. 세포 상처 생성 후 배지를 제거하고 세포를 Ca²⁺ 및 Mg²⁺를 첨가한 150 μl Dulbecco의 인산염 완충 식염수로 2회 세척한 뒤 100 μl의 배지를 첨가하였다. 이어서 플레이트를 INCUCYTE™ 스캐너(Essen Bioscience, Ann Arbor, MI)에 넣고 연속 45시간 동안 매 1시간마다 이미지를 얻었다. 데이터를 INCUCYTE™ 세포 이동 소프트웨어를 이용하여 상대 상처 밀도 대 시간으로 분석하였다. 상대 상처 밀도는 시간 0에서는 0으로, 상처 내부의 세포 밀도가 초기 상처 외부의 세포 밀도와 동일할 때를 100%로 설계하였다.

결과를 표 14에 나타낸다. 결과로부터, Noci-LH_N/A TVEMP 또는 Gal-LH_N/A TVEMP로 사전 처리한 세포는 배지만으로 처리한 세포보다 약간 더 느리게 이동함을 보여주었다. 결과는 Noci-LH_N/A TVEMP 또는 Gal-LH_N/A TVEMP의 처리가 24시간 후 배지 단독 처리한 세포에 비해 약 10% 감소라는 유의미한 세포 이동 감소를 일으킴을 나타내었다. BoNT/A를 처리한 세포는 세포 이동에 대한 영향을 나타내지 않았다. 시토칼라신-D로 처리한 세포는 이동하지 않았다. SNAP-25를 함유하지 않는 PC-3 세포로 동일한 실험을 수행하였을 때, 이동의 감소가 아닌 증가가 관찰되어(결과는 나타내지 않음), 초기에 이들의 리간드 수용체 상의 활성화를 통해, BoNT/A, Noci-LH_N/A TVEMP, 및 Gal-LH_N/A TVEMP이 이동을 증가시키는 기능을 할 수 있음을 시사하였다. 그러나 SNAP-25의 절단 후에는 이동이 감소되었다. 이처럼, 보툴리눔 독소 및/또는 TVEMP에 대한 장기간 노출은 상기 처리된 세포의 이동을 보다 현저히 감소시킬 수 있을 것이다.

처리	24 시간에서의 상대 상처 밀도	
	평균	배지 대비 백분율
배지 대조군	78.2 ± 2.4	100%
BoNT/A	78.6 ± 1.1	101%
Noci-LH _N /A TVEMP	71.5 ± 3.3	91%
Gal-LH _N /A TVEMP	69.5 ± 4.4	89%
시토칼라신-D	3.3 ± 0.2	4%

혈관신생에는 여러 단계가 관여된다; 새로운 혈관 형성을 달성하기 위해, 내피 세포는 먼저 기저막을 깨트려 이들의 안정한 위치에서 탈출해야 한다. 일단 이것을 달성하면, 내피 세포는 암 세포 또는 상처 연관 대식세포로부터 방출될 수 있는 혈관신생 자극을 향해 이동한다. 또한, 내피 세포는 증식하여 새로운 혈관을 만들기 위해 필요한 수의 세포를 제공한다. 이 증식에 이어 내피 세포의 새로운 성장이 3차원 관형 구조로 재구성하기 위해 필요하다. 보툴리눔 독소 또는 TVEMP 처리가 혈관 형성을 감소 또는 저해할 수 있는지 여부를 결정하기 위해,

시험관 내 내피 관 형성 분석(Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA)을 제조자의 지시에 따라 수행하였다. 인간 탯줄 정맥 내피 세포(HUVEC)를 융합성이 될 때까지 T-75 배양 플라스크 내에서 80% 융합성으로 키웠다. 세포를 수집한 후 6-웰 플레이트에서 24시간 동안 HUVEC에 대한 웰 당 500,000개 세포씩 접종하였다. 인큐베이션 후, 세포를 미처리한 채로 놔두거나 2 nM 또는 5 nM의 BoNT/A 또는 6 nM 또는 25 nM의 Noci-LH_N/A TVEMP로 24 시간 동안 처리하였다. 저해에 대한 양성 대조군으로, 세포를 콜라게나아제 저해제로 처리하였다. 저해에 대한 음성 대조군으로, 세포를 배지만 단독 처리하였다. 이어서 세포를 다시 수집하고, 여러 혈관신생 자극 인자, 예컨대 라미닌, IV형 콜라겐, 헤페란 설페이트 프로테오글리칸, 엔탁틴 및 성장 인자, 예컨대 FGF2 및 TGF-β를 함유하는 설치류 Engelbreth-Holm-Swan(EHS) 종양 세포에서 제조한 ECM 겔 상에 웰 당 35,000개 세포씩 접종하였다. 세포를 3-4 시간 동안 ECM 겔 상에서 인큐베이션한 후 칼세인 AM으로의 염색 전이나 후에 현미경 하에서 검사하고 사진을 찍었다.

또한 종양 세포주 유래의 세포를 사용하기 위해 내피 관 형성 분석을 변형하였다. 상기 변형 분석에 있어서, LNCaP, PC-3, DU-145, T24, 및 J82 세포주 유래의 세포를 T-75 배양 플라스크 내에서 80% 융합성으로 키웠다. 이어서 세포를 수집하고 1% 혈청을 추가한 3 mL의 적절한 배지(표 10)를 함유하는 6-웰 플레이트에서 웰 당 400,000개 세포씩 접종하였다. 세포를 37°C 인큐베이터 내에서 5% 이산화탄소 하에 3일 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 미처리한 채로 놔두거나 20 nM의 BoNT/A 또는 40 nM의 Noci-LH_N/A TVEMP로 24 시간 동안 처리하였다. 이어서 세포를 수집하고, ECM 겔 플레이트 상에 접종하여 상술된 바와 같이 검사하였다.

HUVEC, DU145 및 J82 세포에서는 T24 및 LNCaP 세포에서보다 적은 정도로 배지 단독 처리한 ECM 플레이트 상에 관이 형성된 반면, 콜라게나아제 저해제로의 처리는 관의 형성을 방지하는 결과를 보여주었다(표 15). PC-3 세포에서는 관이 형성되지 않았다. LNCaP 전립선암종 세포주 및 J82 방광암종 세포주 유래 세포의 BoNT/A 및 Noci-LH_N/A TVEMP 처리는 관의 형성을 저해하였다. BoNT/A 및 Noci-LH_N/A TVEMP 처리는 HUVEC 배양에서 관 형성에 대해 효과를 보이지 않았다. 이러한 관 형성의 저해는 이동, 막에 대한 수용체 및 다른 단백질(이동 인자 및 이들의 수용체), 기질 또는 다른 세포와 상호작용하는 부착 분자의 전달, 및/또는 프로테아제 분비의 저해에 기인할 수 있다.

세포주	내피 관 형성의 저해			
	배지	콜라게나아제 저해제	BoNT/A	Noci-LH _N /A
LNCaP	아니오	예	예	예
PC-3	—	—	—	—
DU-145	아니오	ND	ND	ND
T24	아니오	ND	ND	ND
J82	아니오	예	예	예
HUVEC	아니오	ND	아니오	아니오

ND, 결정되지 않음

인간 혈관신생 단백질 어레이 스크리닝을 수행하기 위해, DU-145 전립선암 세포주 유래 세포를 1% 차콜 스트립 FBS, 100 U/mL 페니실린, 및 100 µg/mL 스트렙토마이신을 첨가한 이글의 최소 필수 배지를 함유하는 100 mm² 플레이트에 접종하였다. 세포를 37°C 인큐베이터에서 5% 이산화탄소 하에 하룻밤 동안 인큐베이션하여 5 x 10⁶개 세포 밀도로 키웠다. 상기 인큐베이션 후, 세포를 배지의 흡입 제거에 의해 세척하고, 플레이트를 10 mL의 1 x PBS로 행구었다. 세척한 세포를 50 nM BoNT/A를 함유하는 새로운 배지로 교체하여 처리하였다. 대조를 위해, 배지 단독 처리한 세포를 병렬 실험하였다. 처리 24시간 후, 세포를 세척하고, 새로 제조한 용해 완충액(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1%, 4-옥틸페놀 폴리옥실레이트) 중에서 얼음 상에 30분 동안 연속으로 약하게 진탕하면서 용해시켜 수집하였다. 용해된 세포를 14,000 g에서 5분 동안 4°C에서 원심분리하여 파편을 제거하였다. 세포 용해액의 단백질 농도를 브래드포드 분석으로 측정하였다. 분석을 수행하기 위해, 어레이를 500 µg의 단백질을 함유하는 각각의 세포 용해액 250 µl와 인큐베이션하였다. 블롯을 Typhoon 9410 Imager로 스캐닝하여 어레이 이미지를 포착하고, 어레이의 정량은 Image Quant TL V2005로 수행하였다. 처리 표본의 신호를 미처리군의 신호로 나누어 증가 배수를 결정하였다.

결과로부터 검출된 35개 혈관신생 관련 단백질의 대부분이 미처리 대조군에 비해 BoNT/A 처리 세포에서 상향조절되었음이 나타났다(표 16). 발현이 증가된 단백질들은 항-신생혈관성인 두 단백질(엔도스타틴 및 안지오테틴)을 제외하고 혈관신생 촉진에 관여하였다. 세포 증식, 분화, 세포 성장 및 발생을 촉진하는 GDNF, PDGF-AA, 및 FGF1의 존재가 증가함이 나타났다. 혈관신생을 촉진 또는 개시하는 단백질은 다음과 같았다; 응고 인자 III, EG-VEGF, 안지오테틴-1, 안지오테틴-2, 및 PD-ECGF. 글루코오스 대사에 관여하는 단백질의 발현은 다음과 같았다; DPPIV, IGFBP-1, IGFBP-2, 및 IGFBP-3. 세포-세포 부착을 증강시키는 단백질도 상향조절되었다; MIP-1, MMP-9, 엔도텔린-1, 혈소판 인자 4 및 TGF-β1. 가장 유의미한 증가는 거의 100배 증가된 내분비샘 유래 혈관 내피 성장 인자(EG-VEGF)에 대해 관찰되었다. 세포의 배출이 저해되고 세포가 이들을 배지로 방출할 수 없기 때문에 세포 용해액 중 이들 단백질의 증가는 이들의 세포질 내 축적을 반영할 수 있다.

분석물	평균 픽셀 밀도		증가 배수	기능
	비처리군	처리군		
외부 대조군	65451	68877	1.1	—
내부 대조군	50052	59543	1.2	—
응고 인자 III/TF	12736	26726	2.1	혈관신생 촉진
GDNF	156	428	2.7	생존 및 분화 촉진
MIP-1 알파	153	535	3.5	화학주성
CXCL 16	3465	2352	0.7	시토카인
GM-CSF	5001	1457	0.3	시토카인
세르핀 E1	677	2214	3.3	프로테아제 저해
액티빈 A	552	1672	3.0	전립선에서 형태형성 조절
DPPIV	3790	8923	2.4	글루코오스 대사
HB-EGF	8990	6717	0.7	세포 증식
MMP-9	2454	5050	2.1	세포외 기질 분해
세르핀 F1	743	882	1.2	프로테아제 저해
TIMP-1	95918	86280	0.9	항-혈관신생
안지오테닌	6022	5468	0.9	혈관신생 촉진
EG-VEGF	15	1368	88.3	혈관신생 촉진
IGFBP-1	122	1147	9.4	인슐린 성장 인자 단백질
펜트랙신 3	119	732	6.2	아플로시스 세포의 보체 매개 제거에 관여
TIMP-4	152	845	5.6	기질 메탈로프로티나아제 저해제
안지오테틴-1	137	807	5.9	혈관신생 촉진
IGFBP-2	2379	8330	3.5	인슐린 성장 인자 단백질
PD-ECGF	942	12924	13.7	혈관신생 촉진
트롬보스폰딘-1	2138	12359	5.8	항-혈관신생
안지오테틴-2	129	1985	15.3	안지오테틴 1의 길항제
엔도스타틴/콜라겐 XVIII	2388	6800	2.8	항-혈관신생
IGFBP-3	1145	11329	9.9	세포 성장의 인슐린 유사 촉진제
PDGF-AA	202	908	4.5	세포 증식, 세포 분화, 세포 성장, 발생조절
안지오테틴/클라스미노겐	142	893	6.3	항-혈관신생
엔도텔린-1	581	5828	10.0	혈관 항상성

uPA	30656	57108	1.9	세린 프로테아제
암피레글린	33908	20736	0.6	EGF/TGF-알파 수용체와 상호작용하여 성장 촉진
FGF1	1189	1875	1.6	증식 & 분화 촉진
IL-8	45837	19261	0.4	혈관신생 인자
FGF2	28018	23513	0.8	증식 & 분화 촉진
LAP/TGF-β1	360	1914	5.3	세포외 기질 생산 증가
혈소판 인자 4	456	819	1.8	시트카인
VEGF	33513	31434	0.9	투과도에 영향

종합적으로 본 실시예에 기재된 실험은 TVEMP의 보툴리눔 독소의 처리 후 혈관신생 가능성의 전체적 감소를 세포내 혈관신생 단백질의 증가 관찰과 함께 보여주었다. 이는 SNARE 단백질의 절단 후 세포외 배출의 차단으로 인한 소포성 단백질의 축적 및/또는 혈관신생을 촉진하는 보툴리눔 독소 또는 TVEMP에 대한 수용체의 활성화에 기인할 수 있다.

실시예 4

아픏토시스에 대한 경쇄 전달의 효과

본 실시예는 보툴리눔 독소 또는 TVEMP로의 처리가 암 치료에서 치료 이득을 제공하기 충분한 정도로 아픏토시스에 영향을 미치게 될 것임을 나타낸다.

LHN/A-G에 기반한 TVEMP 또는 보툴리눔 독소의 처리에서 기인하는 세포외 배출의 차단은 대사 활성 감소 및 세포 생활성 감소를 일으킨다. 이처럼, 독소 또는 TVEMP 효과로 인해 저해된 세포외 배출능을 갖는 암 세포는 생존 능력이 감소될 것이다. 상기 치료가 암 세포 생활성을 감소시키는지 여부를 결정하기 위해, 3개의 상이한 분석을 수행하였다: 세포 생활성 및 대사 분석, 카스파아제-3/8 활성 분석, 및 인간 아픏토시스 단백질 어레이 분석.

보툴리눔 독소 또는 TVEMP 처리가 암 세포 생활성을 감소시킬 수 있는지 여부를 결정하기 위해, CELLTITER 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 세포 대사 활성 분석(Promega Corp., Madison, WI)을 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 상기 분석은 대사 활성 세포 내에서 NADPH 또는 NADH에 의해 환원되는 테트라졸륨 화합물 [3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카르복시메톡시페닐)-2-(4-설포페닐)-2H-테트라졸륨, 내염; MTS]을 함유하는 비색계 분석이다. 환원된 MTS는 흡광도 490nm에서 측정할 수 있는 유색 포마잔 산물이다. 세포주 MCF-7, SiMa, PC-12, 266.6, RWPE-1, 및 N2a 유래 세포의 적절한 밀도를 혈청을 첨가하지 않고 25 µg/mL의 GT1b(Alexis Biochemicals, San Diego, CA)를 첨가하거나 첨가하지 않은 100 µl의 적절한 배지(표 7)를 함유하는 96-웰 조직 배양 플레이트의 웰 내로 접종하였다. 세포를 접종하고 표준적이고 일상적인 형태학적 요건, 예컨대 성장 정지(대략 3일)로 평가되는 바와 같이 세포가 분화할 때까지 5% 이산화탄소 하에 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 배지를 각각의 웰에서 흡입 제거하고 분화된 세포를 0 (미처리 표본), 0.3125 nM, 1.25 nM, 및 20 nM의 BoNT/A를 함유하는 새 배지로 교체하여 처리하였다. 처리 24시간 후, 세포의 배지를 흡입 제거하고, 각각의 웰을 100 µl의 1 x PBS로 행구었다. 세척 후 100 µl의 MTS 용액을 각각의 웰로 첨가하고, 2 시간 동안 인큐베이션 후 490nm에서의 흡광도를 96-웰 플레이트 판독기로 기록하였다. 490nm 흡광량으로 측정된 포마잔 산물의 양은 배양 중에서 살아있는 세포수와 직접적으로 비례한다. 세포 생활성에 대한 TVEMP의 효과를 조사하기 위해 유사한 설계를 채용할 수 있다.

결과로부터 BoNT/A 처리가 평가한 암성 세포주에서 대사 활성을 감소시킴이 나타났다(표 17).

세포주	BoNT/A 농도			
	0 nM	0.3125 nM	1.25 nM	20 nM
MCF-7	1.60	1.45	1.41	1.30
SiMa	1.68	1.40	1.07	0.33
PC-12	1.68	1.66	1.45	1.15
266.6	1.10	1.05	1.02	0.82
RWPE-1	0.99	1.01	0.89	0.67
N2a	1.63	1.50	1.43	1.28

보툴리눔 독소 또는 TVEMP 처리가 암 세포 생활성을 감소시킬 수 있다는 것을 더 나타내기 위해, CELLTITER GLO® 발광 세포 생활성 분석(Promega Corp., Madison, WI)을 제조자의 지시에 따라 수행하였다. 상기 분석에서 세포 생활성은 대사 활성 세포의 존재를 나타내는 ATP의 존재에 근거하여 정량하였다. ATP 함량의 감소는 대사 적으로 활성이 더 작은 세포에 대응된다. 세포주 LNCaP, J82, T24, 및 DU-145 유래 세포를 상술된 바와 같이 분 화시켰다. 배지를 각각의 웰로부터 흡입 제거하고, 분화된 세포를 1) 0 (미처리 표본), 25 nM, 및 50 nM의 BoNT/A; 또는 2) 0 (미처리 표본), 250 nM, 및 500 nM의 Noci-LH_N/A TVEMP를 함유하는 새 배지로 교체하여 처리 하였다. 24시간 치료 후, 세포의 배지를 흡입 제거하여 세척하고, 각각의 웰을 100 μl의 1 x PBS로 행구었다. 세척 후, 100 μl의 CELLTITER GLO® 시약을 각각의 웰에 첨가하였다. 실온에서 인큐베이션 10분 후, 표본 발광 도를 SpectraMAX L 발광도 관독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 측정하였다. 분석은 3회씩 수행하였으며, 매 4 또는 5일마다 세포 생활성을 확인하였다.

데이터로부터 BoNT/A 처리(표 18) 또는 Noci-LH_N/A TVEMP처리 후 DU-145 전립선암종 세포주 및 J82 방광암종 세 포주 둘 다에서 유래하는 세포에서 생활성 감소가 관찰됨이 나타났다(표 19).

시간	BoNT/A 농도							
	DU-145				J82			
	0 nM	25 nM	0 nM	50 nM	0 nM	25 nM	0 nM	50 nM
1일	3356	3291 (0.385)	404219	301228 (0.325)	3077	2853 (0.223)	543436	318900 (0.398)
2일	2360	2433 (0.433)	649139	394645 (0.174)	5211	4646 (0.016)	741025	493817 (0.129)
4일	ND	ND	1277552	809182 (0.058)	ND	ND	1242627	649797 (0.010)
5일	4823	2325 (0.0001)	ND	ND	7384	4262 (0.0001)	ND	ND

비처리 대조군 대비 유의차를 보이는 P값을 괄호에 나타낸다.
ND, 결정되지 않음

시간	Noci-LH _N /A TVEMP 농도							
	DU-145				J82			
	0 nM	250 nM	0 nM	500 nM	0 nM	250 nM	0 nM	500 nM
1일	3356	3630 (0.087)	404219	408023 (0.959)	3077	3189 (0.223)	543436	406420 (0.103)
2일	2360	2379 (0.876)	649139	622596 (0.802)	5211	4639 (0.015)	741025	677236 (0.581)
4일			1277552	1030346 (0.171)			1242627	854124 (0.020)
5일	4823	3595 (0.0003)			7384	6349 (0.009)		

비처리 대조군 대비 유의차를 보이는 P값을 괄호에 나타낸다.
ND, 결정되지 않음

보툴리눔 독소 또는 TVEMP 처리가 아포토시스 절차에 의해 암 세포 생활성을 감소시키는지 여부를 결정하기 위해, 카스파아제-3/8의 활성을 BoNT/A 처리 세포에서 측정하였다. 세포주 LNCaP, J82, 및 T24 유래 세포를 상술된 바와 같이 분화시켰다. 배지를 각각의 웰로부터 흡입 제거하고, 분화된 세포를 1) 0 (미처리 표본), 0.5 nM, 5 nM, 및 50 nM의 BoNT/A; 또는 2) 0 (미처리 표본), 1.6 nM, 16 nM, 및 166 nM의 Noci-LH_N/A TVEMP를 함유한 새 배지로 교체 처리하였다. 24시간 처리 후, 세포 배지를 흡입 제거하여 세척하고, 각각의 웰을 100 μl의 1 x PBS로 행구었다. 세포성 카스파아제 9 활성을 측정하기 위해, 50 μl의 카스파아제-GLO[®] 9(Promega, Corp., Madison, WI) 시약을 각각의 웰의 배양 배지에 첨가하였다. 30분 동안 37°C에서 인큐베이션 후, 각각의 표본의 발광도를 Spectramax L 발광측정계(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 측정하였다. T24는 SNAP-25를 발현하지 않으며, BoNT/A 또는 Noci-LH_N/A TVEMP로의 처리에 감수성을 보이지 않아야 한다.

데이터로부터 카스파아제 3/8 활성에 대한 효과는 BoNT/A로의 노출 후 LNCaP 세포에서 가장 현저함이 나타나서, LNCaP 세포주 생활성이 BoNT/A 처리로 감소됨을 시사하였다(표 20). 이들 데이터는 BoNT/A 처리한 생존 및 사멸 세포군의 수를 측정하는 세포 생활성 분석에서도 뒷받침되었다(표 18). J82 세포주 유래 세포는 카스파아제 3/8 활성에 유의미한 차이를 보이지 않았으나, 이들 세포주는 BoNT/A 또는 Noci-LH_N/A TVEMP 처리 후 사멸 세포량을 더 많이 함유하였다(표 19). J82 세포에서 카스파아제 활성이 관찰되지 않는 이유는 적어도 2개 가능성이 기인할 수 있다: 1) 카스파아제 3/8 활성을 검출하기 위한 BoNT/A 처리 시점이 J82 및 LNCaP에 있어 상이함(예로 카스파아제 3/8 활성은 J82 세포에서 더 빨리 일어날 수 있다); 또는 2) J82에 대한 세포사 경로가 카스파아제 3/8에 무관함.

세포주	BoNT/A 농도				Noci-LH _N /A TVEMP			
	0 nM	0.5 nM	5 nM	50 nM	0 nM	1.6 nM	16 nM	166 nM
LNCaP	270	283	239	572	218	232	233	263
T24	656	612	634	646	637	602	623	617
J82	235	146	256	194	132	133	103	98

보툴리눔 독소 또는 TVEMP 처리한 세포의 세포사가 카스파아제 3/8 경로와 무관한 절차에 의해 지시되는지 여부를 평가하기 위해, 세포를 절단된 핵 폴리(ADP-리보오스) 폴리머라아제(PARP)의 존재에 대해 분석하였다. PARP는 116kDa의 핵 폴리(ADP-리보오스) 폴리머라아제이며, 환경적 스트레스에 반응하여 DNA 보수에 관여하는 것으로 나타난다. 상기 단백질은 시험관 내에서 여러 ICE-유사 카스파아제에 의해 절단될 수 있으며, 생체 내에서 카스파아제-3의 주요 절단 표적 중 하나이다. 인간 PARP에서, 절단은 카르복시-말단 절단 도메인(89kDa)으로부터 PARP 아미노-말단 DNA 결합 도메인(24kDa)을 분리하는 Asp214 및 Gly215 사이에서 일어난다. PARP는 세포가 이들의 생활성을 유지하는 것을 도우며; PARP의 절단은 세포 분리를 촉진하고 아포토시스를 겪는 세포의 마커로

서 작용한다. 세포 생활성에 있어서의 변화가 아폽토시스를 겪는 세포에 기인하는지 여부를 결정하기 위해, 세포주 DU-145 및 J82 유래 세포를 상술된 바와 같이 분화시켰다. 배지를 각각의 웰로부터 흡입 제거하고, 분화된 세포를 1) 0 (미처리 표본) 및 50 nM의 BoNT/A; 또는 2) 0 (미처리 표본) 및 500 nM의 Noci-LH_N/A TVEMP를 함유하는 새 배지로 교체하여 처리하였다. 처리 48시간 후, α-PARP 항체를 일차 항체로서 사용한 것을 제외하고는 세포를 실시예 1에 기재된 바와 같이 세척하고, 수집하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 두 세포주 유래의 세포는 Noci-LH_N/A TVEMP 처리 2일 후 절단된 PARP의 증가를 나타내었다. 그러나 BoNT/A로 처리한 두 세포주 유래의 세포에서는 절단된 PARP의 존재가 최소화되었다.

인간 아폽토시스 단백질 어레이 스크리닝을 수행하기 위해, DU-145 전립선암 세포주 유래 세포를 실시예 3에 상술된 바와 같이 BoNT/A로 처리하고, 수집하여 분석하였다. 결과로부터, DU-145 세포주 유래 세포를 50 nM BoNT/A로 24 시간 동안 처리한 후, 대조군에 비해 대부분의 아폽토시스 관련 단백질이 변화없이 유지됨이 나타났다. 발현이 1.5배 내지 2.4배 감소된 아폽토시스 관련 단백질은 단지 10개 종이었다(표 21). 발현 감소는 3개의 항-아폽토시스 단백질(리빈, 서비빈, 및 BCL-x), 2개의 세포 주기 관련 단백질(클라스핀 및 P27), 항산화제 관련 단백질(PON2), 샤페론 단백질(클러스테린) 및 2개의 친-아폽토시스 관련 단백질(Bax 및 시토크롬 C)에서 나타났다.

표 21. DU-145 세포주에서의 인간 아폽토시스 어레이

분석물	평균 픽셀 밀도		감소 배수	기능
	비처리군	처리군		
리빈	644.1	469.7	1.7	항-아폽토시스
시토크롬 c	3423	1889	1.9	친-아폽토시스
XIAP	10099	10045	1.0	항-아폽토시스
HTRA2/오미	7542	9368	0.8	IAP 길항제
클러스테린	1139	816	1.6	미스폴딩된 단백질의 샤페론
TNF rRI/TNFRSF1A	2036	1467	1.5	NfκB 활성화
HSP70	7058	9669	0.7	스트레스 반응 샤페론
클라스핀	6630	3390	2.0	세포 주기 확인점
서비빈	8717	3739	2.4	항-아폽토시스
HSP60	945	855	1.2	스트레스 반응 샤페론
cIAP-2	2862	3156	0.9	아폽토시스 저해제(IAP)
SMAC/디아블로	8379	7132	1.2	IAP 단백질과의 상호작용에 의한 카스파아제 활성화 촉진
HSP27	5716	5683	1.0	스트레스 반응 샤페론
cIAP-1	16916	15297	1.1	아폽토시스 저해제(IAP)
포스포-rad17	1646	999	1.8	세포 주기 확인점
HO-2/HMOX2	8930	8934	1.0	미세소체 효소
카탈라아제	18742	18710	1.0	산화적 스트레스로부터 세포 손상 방지
p53	19134	22007	0.9	아폽토시스 유도
HO-1/HMOX1/HSP32	9878	11333	0.9	미세소체 효소
절단된 카스파아제-3	715	614	1.3	아폽토시스의 하부 매개자
p53	8623	11225	0.8	아폽토시스 유도
HIF-1 알파	6832	6703	1.0	저산소증 반응 요소에 결합
프로-카스파아제-3	36318	42668	0.9	아폽토시스의 하부 매개자
p53	20019	24725	0.8	아폽토시스 유도
Fas/TNFSF6	34978	35878	1.0	아폽토시스 유도
Bcl-x	571	445	1.6	항-아폽토시스
p27	1293	852	1.7	세포 주기 확인점
FADD	9996	8647	1.2	아폽토시스 유도
Bcl-2	967	1427	0.7	항-아폽토시스

p21	1062	1029	1.1	세포 주기 차단
TRAIL R2/DR5	25985	21477	1.2	아폽토시스 유도
Bax	2097	1436	1.6	아폽토시스 활성화제
PON2	2611	1784	1.5	항산화 효소
TRAIL R1	28443	20518	1.4	아폽토시스 유도
Bad	5097	5932	0.9	친-아폽토시스

종합적으로, 본 실시예에 기재된 결과로부터 BoNT/A 또는 TVEMP의 처리가 대사 활성을 감소시키고 세포 생활성을 감소시키는 것으로 나타났다. 아폽토시스에 관련된 사건이 암 세포 내로의 경쇄 전달에 뒤이어 확인되었으며, LNCaP 세포에서 BoNT/A의 처리 후 카스파아제 3/8 활성이 관찰되었을 뿐만 아니라 카스파아제 3의 주요 기질인 PARP의 절단 증가가 DU-145 및 J82 세포에서 Noci-LH_h/A TVEMP 처리 후에 관찰되어, 세포가 BoNT/A 또는 TVEMP의 처리 후 아폽토시스쪽으로 유도되는 것으로 나타났다. 전체적으로 세포 용해액 중 아폽토시스에 연관된 단백질의 양은 BoNT/A의 처리 후 변화하지 않았다. 대부분의 친-아폽토시스 및 항-아폽토시스 단백질은 전체 단백질량의 변화 없이 세포질로부터 미토콘드리아로 전위하여 이들의 기능을 발휘한다. 검출된 작은 변화는 세포의 배출의 저해에 대한 종양 세포의 단기 반응 및 암 세포가 성장하는데 필요한 자가분비 또는 주변분비 루프에서의 입력 방해일 수 있다. 결과적으로 상기 세포는 생존 신호의 부재로 인해 아폽토시스쪽으로 유도될 것이다.

실시예 5

암 치료

하기 실시예는 본 발명의 범위를 어떤 방식으로든 제한하지 않으면서 특정 구현예를 설명하는 방식으로 제공된다.

의사가 좌측 유방에 덩어리를 호소하는 62세 여성을 검사하여 유방암으로 진단하였다. 해당 여성에게 감염 부위 근처에 본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물을 국소 투여하여 치료하였다. 환자 상태를 모니터링하고, 치료 약 1-7일 후에 의사는 전이성 종양의 성장이 느려진 것을 확인하였다. 1달 및 3달째의 체크업 시, 의사는 종양의 크기가 더 작아진 것으로 확인했다. 상기 종양 크기의 감소는 TVEMP를 포함하는 조성물로의 치료가 성공적임을 시사하였다. 또한, 본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물의 전신 투여를 또한 이용하여 개시된 TVEMP를 유방암 치료를 위해 투여할 수 있다.

의사가 배뇨에 어려움을 호소하는 58세 남성을 검사하여 전립선암으로 진단하였다. 해당 남성에게 본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물을 정맥내 투여하여 전신 치료하였다. 환자 상태를 모니터링하고, 치료 약 1-7일 후에 의사는 전립선의 크기가 작아진 것을 확인하였다. 1달 및 3달째의 체크업 시, 의사는 전립선의 크기가 정상 크기로 되돌아가고 혈청 PSA 수준이 정상 범위 내에 있음을 확인했다. 상기 종양 크기 및/또는 혈청 PSA 수준의 감소는 TVEMP를 포함하는 조성물로의 치료가 성공적임을 시사하였다. 또한, 본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물의 국소 투여를 또한 이용하여 개시된 TVEMP를 전립선암 치료를 위해 투여할 수 있다.

의사가 호흡기 재채기를 호소하는 67세 남성을 검사하여 폐암으로 진단하였다. 해당 남성에게 본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물을 정맥내 투여하여 전신 치료하였다. 환자 상태를 모니터링하고, 치료 약 1-7일 후에 의사는 전이성 종양의 성장이 느려진 것을 확인하였다. 1달 및 3달째의 체크업 시, 환자는 호흡이 정상으로 되돌아온 것으로 나타났으며, 의사가 종양의 크기가 더 작아진 것을 확인했다. 상기 정상 호흡 및/또는 종양 크기의 감소는 TVEMP를 포함하는 조성물로의 치료가 성공적임을 시사하였다. 또한, 전신 투여를 또한 이용하여 개시된 TVEMP를 암 치료를 위해 투여할 수 있다. 또한 흡입 투여를 또한 이용하여 개시된 TVEMP를 폐암 치료를 위해 투여할 수 있다.

의사가 골반통을 호소하는 33세 여성을 검사하여 방광암으로 진단하였다. 해당 여성에게 관련 부위 근처에 본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물을 국소 투여하여 치료하였다. 환자 상태를 모니터링하고, 치료 약 1-7일 후에 의사는 전이성 종양의 성장이 느려진 것을 확인하였다. 1달 및 3달째의 체크업 시, 환자는 골반통이 가라앉은 것으로 나타났으며, 의사가 종양의 크기가 더 작아진 것을 확인했다. 상기 감소된 통증 및/또는 종양 크기의 감소는 TVEMP를 포함하는 조성물로의 치료가 성공적임을 시사하였다. 또한, 전신 투여를 또한

이용하여 개시된 TVEMP를 방광암 치료를 위해 투여할 수 있다.

의사가 복통을 호소하는 73세 여성을 검사하여 결장암으로 진단하였다. 해당 여성에게 본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물을 정맥내 투여하여 전신 치료하였다. 환자 상태를 모니터링하고, 치료 약 1-7일 후에 의사는 전이성 종양의 성장이 느려진 것을 확인하였다. 1달 및 3달째의 체크업 시, 환자는 복통이 가라앉은 것으로 나타났으며, 의사가 종양의 크기가 더 작아진 것을 확인했다. 상기 감소된 통증 및/또는 종양 크기의 감소는 TVEMP를 포함하는 조성물로의 치료가 성공적임을 시사하였다. 또한, 본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물의 국소 투여를 또한 이용하여 개시된 TVEMP를 결장암 치료를 위해 투여할 수 있다.

의사가 두통과 현기증을 호소하는 37세 남성을 검사하여 신경모세포종으로 진단하였다. 해당 남성에게 관련 부위 근처에 본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물을 두개내 투여하여 치료하였다. 환자 상태를 모니터링하고, 치료 약 1-7일 후에 의사는 전이성 종양의 성장이 느려진 것을 확인하였다. 1달 및 3달째의 체크업 시, 환자는 더 이상 두통 및 현기증을 겪지 않는 것으로 나타났으며, 의사가 신경모세포종이 사라진 것을 확인했다. 상기 두통, 현기증 및/또는 신경모세포종의 소멸은 TVEMP를 포함하는 조성물로의 치료가 성공적임을 시사하였다.

의사가 통증성 피부명과 변색을 호소하는 46세 남성을 검사하여 흑색종으로 진단하였다. 해당 남성에게 본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물을 국소 투여하여 치료하였다. 환자 상태를 모니터링하고, 치료 약 1-7일 후에 의사는 피부명의 크기가 약간 감소하였으며 피부가 이전처럼 변색되지 않는 것을 확인하였다. 1달 및 3달째의 체크업 시, 환자는 더 이상 통증을 겪지 않는 것으로 나타났으며, 의사가 피부명과 변색이 소멸되었음을 확인했다. 상기 감소된 통증 및/또는 피부명의 소멸은 TVEMP를 포함하는 조성물로의 치료가 성공적임을 시사하였다. 또한, 본 명세서에 개시된 바와 같은 TVEMP를 포함하는 조성물의 전신 투여를 또한 이용하여 개시된 TVEMP를 방광암 치료를 위해 투여할 수 있다.

결론적으로 본 명세서의 측면은 다양한 구현예를 참조로 설명되었지만, 당해분야 숙련자는 개시된 특정 실시예가 본 명세서에 개시된 요지의 원리를 단지 예시하려는 것임을 쉽게 이해할 것이다. 따라서 개시된 요지는 본 명세서에 기재된 특정 방법론, 프로토콜 및/또는 시약 등에 제한되는 것이 아님을 이해해야 한다. 이처럼, 개시된 요지에 대해 다양한 개질 또는 변화 또는 대안적 구성을 본 명세서의 정수를 벗어나지 않으면서 본 명세서에 교시에 따라 수행할 수 있다. 마지막으로 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 구현예를 설명하기 위해서만이지 특허청구범위에 의해서만 정의되는 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다. 따라서 본 발명은 정확히 나타내고 설명한 바에 따라 제한되는 것이 아니다.

본 발명의 수행을 위해 본 발명자들에게 공지된 최적 방식을 포함하는 본 발명의 특정 구현예를 본 명세서에 설명한다. 당연히 상기 기재된 구현예에 대한 변형은 상술된 설명을 읽으면 당업자에게 자명해질 것이다. 본 발명자들은 당해분야의 숙련자가 적절히 상기 변형을 채용할 것을 예상하며, 본 발명을 본 명세서에 구체적으로 기재된 것 이외에 다른 방식으로 실시할 것을 의도하고 한다. 따라서 본 발명에는 적용 가능한 범에 의해 허용되는, 본 명세서에 첨부된 특허청구범위에 언급되는 요지의 모든 개질 및 균등물이 포함된다. 또한 이들의 모든 가능한 변형에서 상술된 요소의 임의 조합은 명세서에서 명확히 반대하거나 또는 본 명세서에서 달리 나타내지 않는 한 본 발명에 포함된다.

본 명세서에 개시된 본 발명의 대안적 요소 또는 구현예의 그룹들은 제한으로 간주되어서는 안된다. 각각의 그룹 멤버는 본 명세서에서 확인된 다른 그룹의 멤버 또는 다른 요소와의 임의 조합으로 또는 개별로 언급되고 청구될 수 있다. 하나 이상의 그룹 멤버가 편의성 및/또는 특허성의 이유로 그룹에 포함되거나 이로부터 삭제될 수 있다. 임의의 상기 포함 또는 삭제가 일어나는 경우, 본 명세서는 상기 그룹을 보정으로서 포함하여 첨부되는 특허청구범위에서 이용되는 모든 마쿠시 그룹의 명시적 설명을 충족하는 것으로 간주된다.

달리 언급되지 않는 한, 명세서 및 특허청구범위에서 사용되는 성분, 특성, 예컨대 분자량, 반응 조건 등의 양을 표현하는 모든 수치는 모든 경우 "약"이라는 용어로 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "약"이라는 용어는 표시된 해당 항목, 파라미터 또는 용어가 언급된 항목, 파라미터 또는 용어의 초과 또는 미만 10% 범위를 포함하는 것을 의미한다. 따라서 달리 언급되지 않는 한, 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 설정된 수치 파라미터는 본 발명에서 수득하고자 원하는 특성에 따라 변할 수 있는 근사치이다. 최소한으로 그리고 특허청구범위의 균등론 원칙의 적용을 제한하려는 의도 없이, 각각의 수치 파라미터는 적어도 보고된 유의미한 자리수의 관점에서 일반적인 반올림 기법을 적용하여 고려되어야 한다. 본 발명의 넓은 범위에 설정된 수치 범위 및 파라미터가 근사치이더라도, 특정 실시예에 설정된 수치값은 가능한 정확히 보고된다. 그러나 모든 수치값은 이들 각각의 평가 측정에서 확인되는 표준 편차에서 필연적으로 야기되는 일부 오류를 내재

적으로 함유한다.

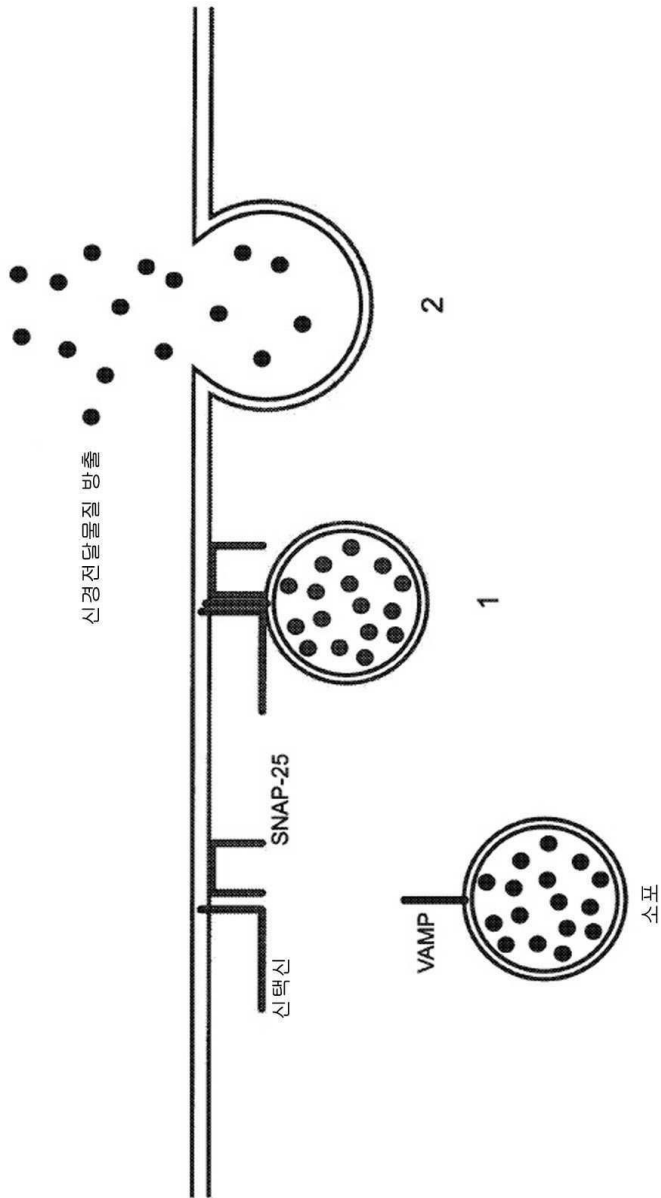
본 발명을 설명하는 문맥에서(특히 하기 특허청구범위의 문맥에서) 사용되는 "하나", "그" 등의 유사 참조어는 본 명세서에서 달리 나타내거나 문맥상 명확히 반대인 경우가 아닌 한 단수 및 복수 모두를 포함하는 것으로 간주되어야 한다. 본원의 값 범위의 언급은 단지 개별적으로 범위 내에 속하는 각각의 개별값을 쉽게 참조하는 방법으로 작용하려는 것이다. 본 명세서에서 달리 언급되지 않는 한, 각각의 개별값은 본 명세서에서 개별적으로 언급되는 것과 마찬가지로 명세서 내에 포함된다. 본 명세서에 기재된 모든 방법은 본 명세서에서 달리 나타내거나 문맥상 명확히 반대인 경우가 아닌 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본 명세서에 제공된 임의의 모든 예 또는 예시적 언어(예로 "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 예시하기 위한 것이며, 달리 청구하는 본 발명의 범위에 제한을 부여하지 않는다. 명세서 내 어떤 언어도 본 발명의 실시예에 필수적인 임의의 비청구 요소를 나타내는 것으로 간주되어서는 안된다.

본 명세서에 개시된 특정 구현예는 구성된 또는 본질적으로 구성된이라는 언어를 이용하여 특허청구범위에서 추가 제한될 수 있다. 출원 시 또는 보정 시 추가되어 특허청구범위에서 사용되는 경우, "구성된"이라는 접속 용어는 특허청구범위에서 특정되지 않은 임의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. "본질적으로 구성된"이라는 접속 용어는 특허청구범위를 특정된 재료 또는 단계 및 기본적인 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 주지 않는 것들로 제한한다. 이렇게 청구하는 본 발명의 구현예는 내재적으로 또는 명시적으로 기재되며 본 명세서에서 가능해진다.

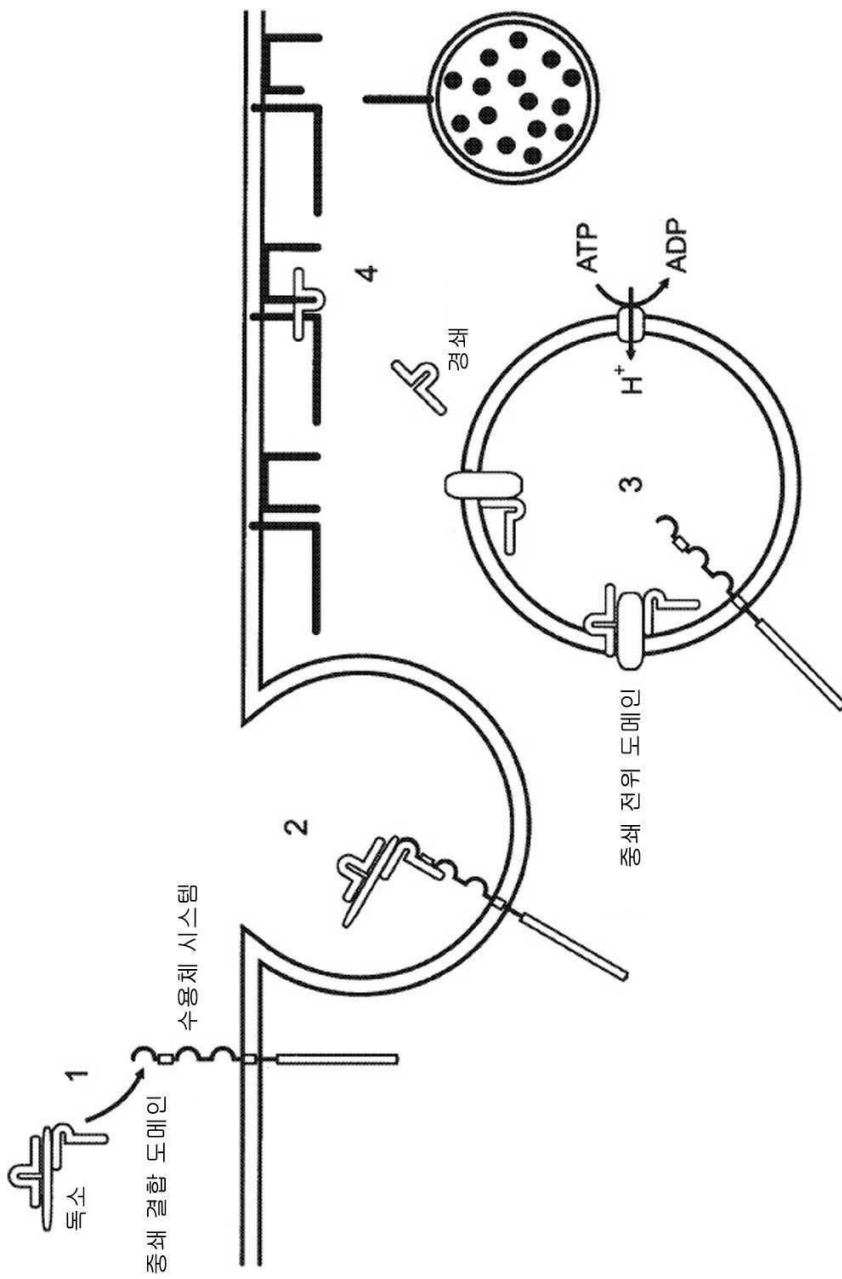
본 명세서에서 참조되고 확인된 모든 특허, 특허 공보, 및 기타 문헌은, 예를 들어 본 발명과 연관되어 사용할 수 있는 상기 문헌에 기재된 조성물 및 방법의 설명 및 개시 목적으로 이들의 전문이 본 명세서에 개별적으로 그리고 명시적으로 참조를 위해 도입된다. 이들 문헌은 본 출원의 출원일 이전 이들의 개시에 대해서만 제공된다. 이와 관련하여 어느 것도 본 발명자들이 이전 발명으로 인해 또는 임의의 다른 이유를 위해 상기 개시를 선행하는 자격을 얻지 않았다는 인정으로 간주되어서는 안된다. 이들 문서의 내용에 관한 표시 또는 날짜에 대한 모든 언급은 본 출원인이 이용가능한 정보에 근거한 것이며, 이들 문서의 내용 또는 날짜의 정확성에 대한 어떠한 인정도 구성하지 않는다.

도면

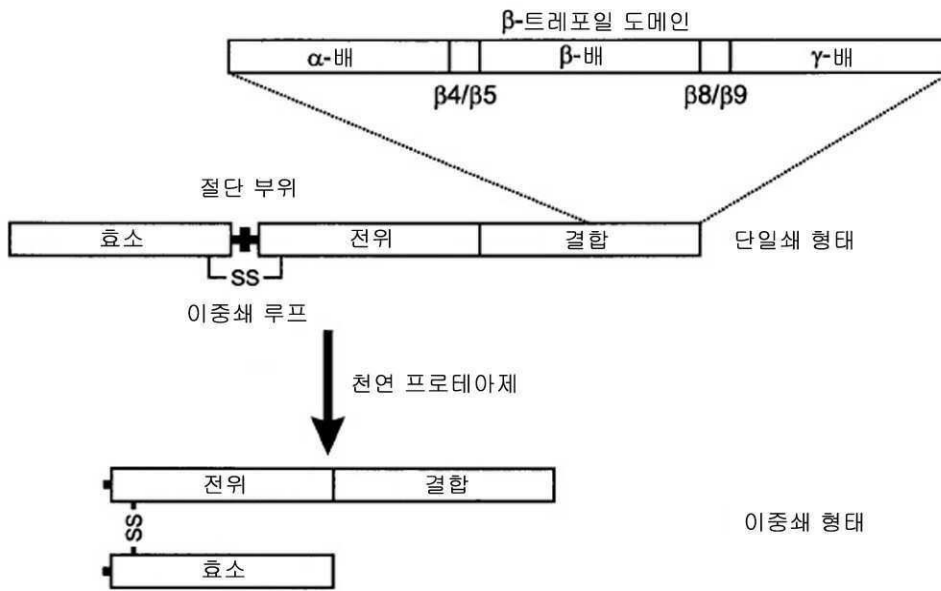
도면1a



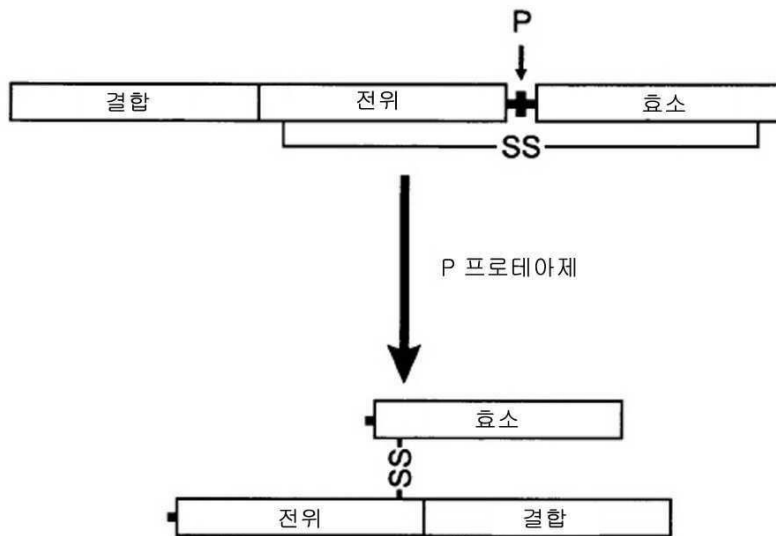
도면1b



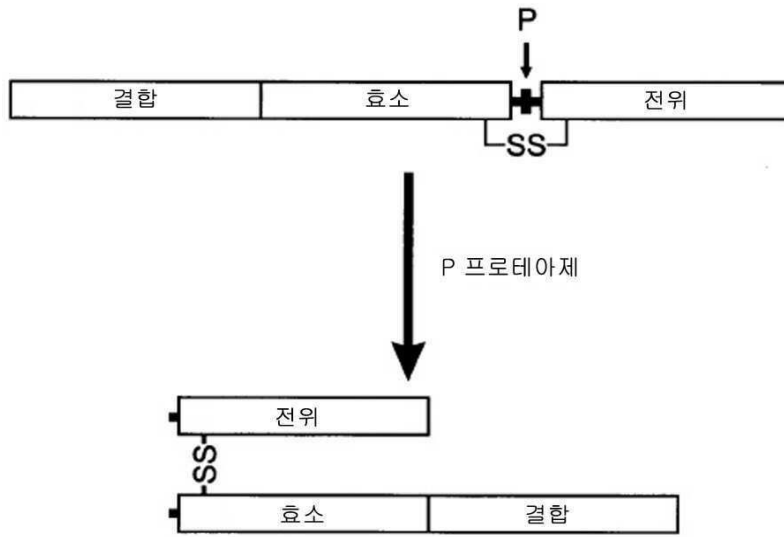
도면2



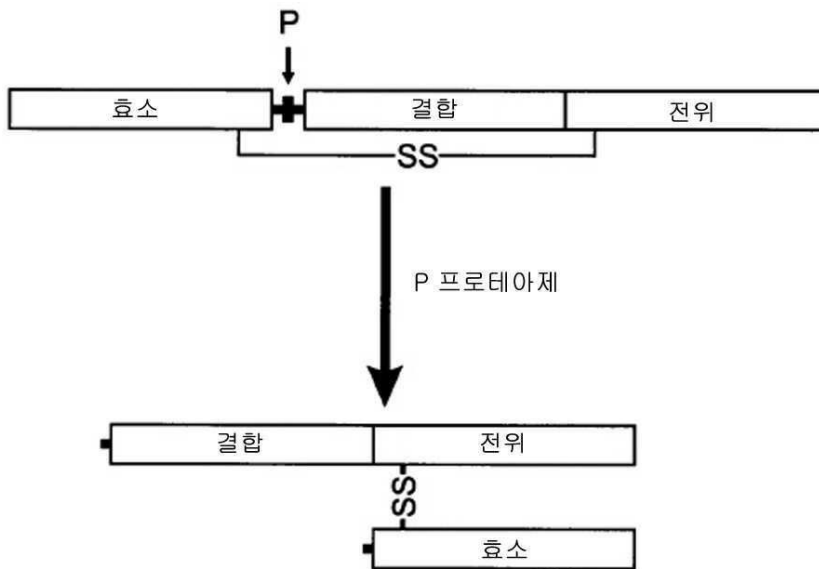
도면3a



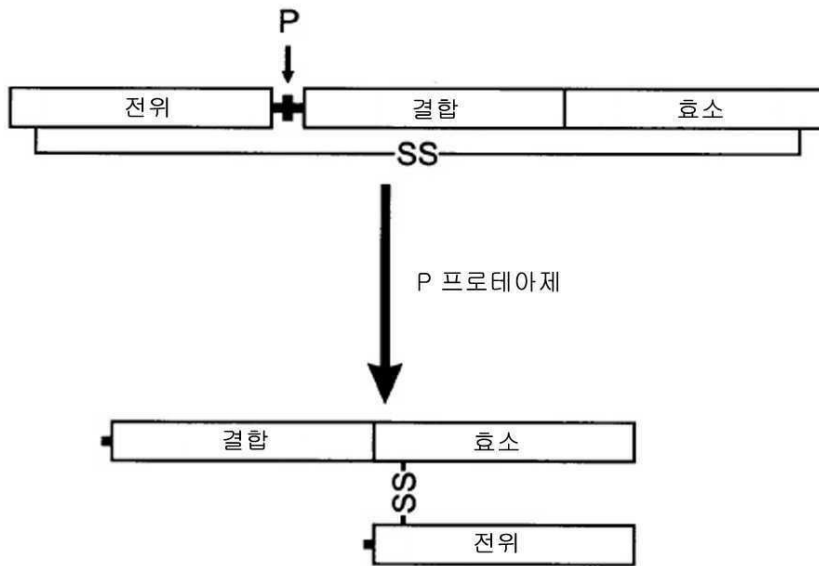
도면3b



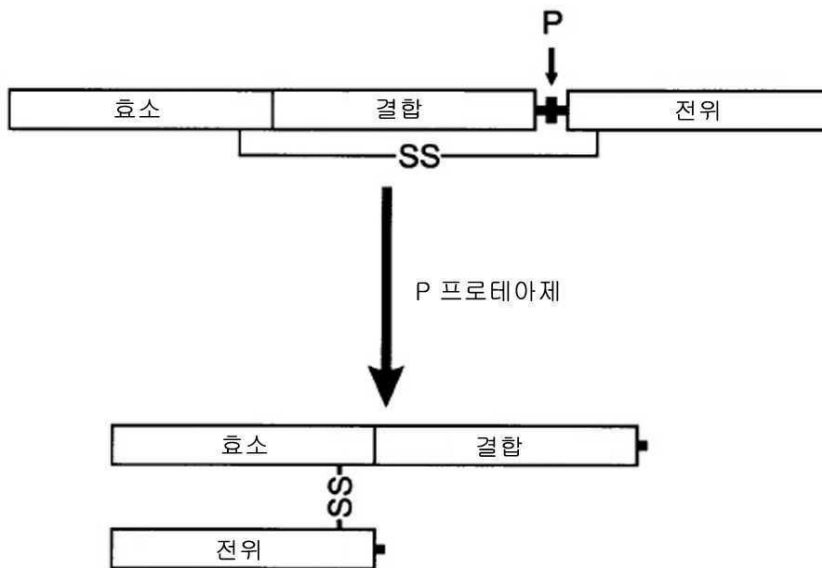
도면4a



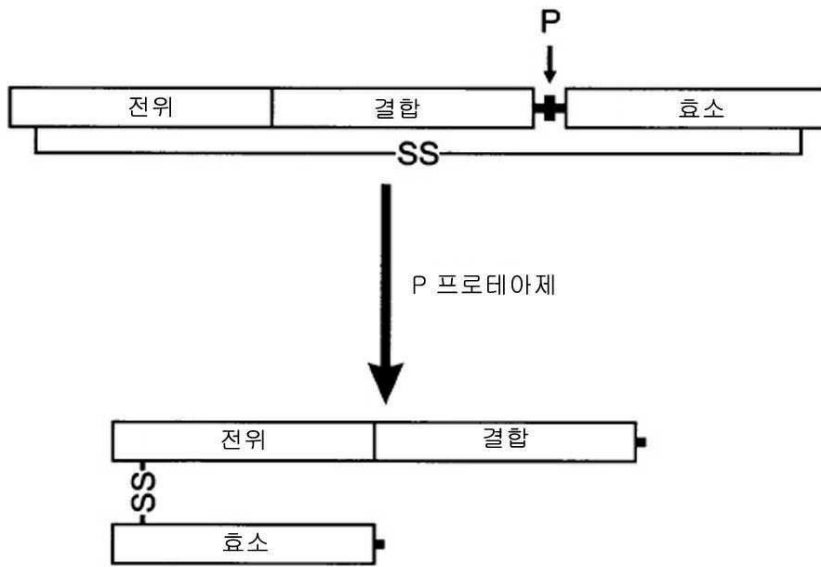
도면4b



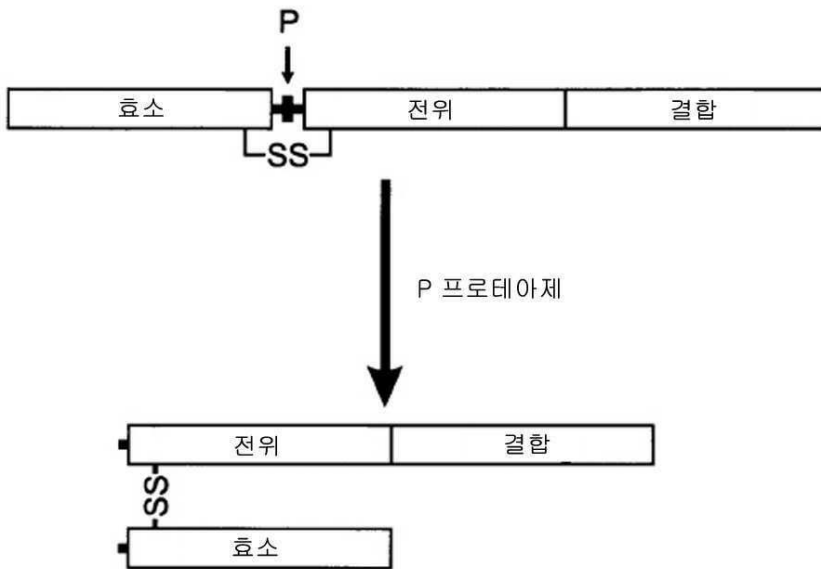
도면4c



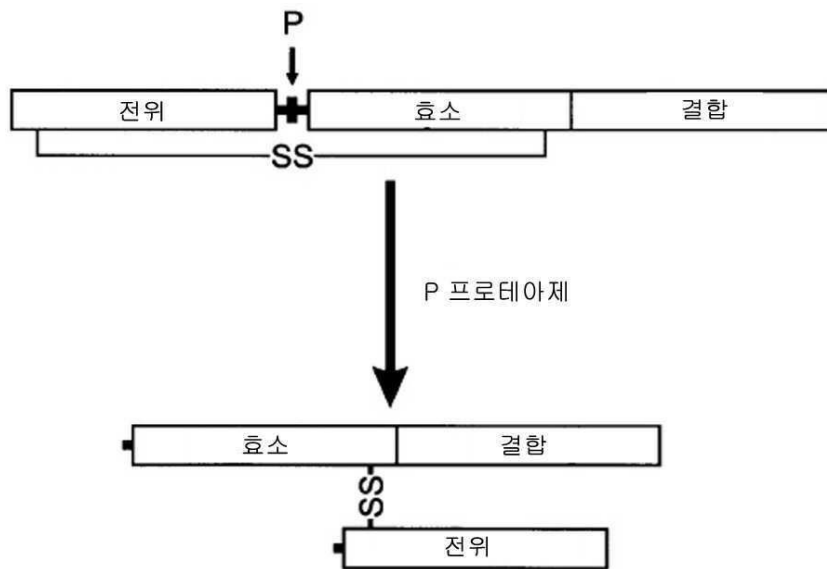
도면4d



도면5a



도면5b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Jacky, Birgitte P.S.
 Garay, Patton E.
 Molina, Yanira
 Stathakis, Dean G.
 Francis, Joseph
 Aoki, K. Roger
 Fernandez-Salas, Ester
- <120> Methods of Treating Cancer Using Opioid
 Retargeted Endpeptidases
- <130> 18559 (BOT)
- <150> US 61/233,930
- <151> 2009-08-14
- <160> 159
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 1296
- <212> PRT
- <213> Clostridium botulinum A1
- <400> 1

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 Leu
 1010 1015 1020

Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro
 1025 1030 1035 1040

Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys
 1045 1050 1055

Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe
 1060 1065 1070

Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr
 1075 1080 1085

Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr
 1090 1095 1100

Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn
 1105 1110 1115 1120

Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu
 1125 1130 1135

Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser
 1140 1145 1150

Ser Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly
 1155 1160 1165

Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val
 1170 1175 1180

Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala
 1185 1190 1195 1200

Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn
 1205 1210 1215

Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr
 1220 1225 1230

Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly

1235 1240 1245
 Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser
 1250 1255 1260
 Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys
 1265 1270 1275 1280

 Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu
 1285 1290 1295
 <210> 2
 <211> 1296
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum A2
 <400> 2
 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 Asp 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 Glu 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 Val Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Ile
 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 Asn Phe Phe Lys Val Ile Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365
 Phe Asp Lys Ala Val Phe Arg Ile Asn Ile Val Pro Asp Glu Asn Tyr
 370 375 380
 Thr Ile Lys Asp Gly Phe Asn Leu Lys Gly Ala Asn Leu Ser Thr Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Ser Arg Asn Phe Thr Arg 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 Pro Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu 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 Asp Lys Val Glu Glu

465 470 475 480
 Ile Thr Ala 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 Asp 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 Pro 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 Asp Ser Arg Ile Ile Leu Thr Asn Ser Ala Glu Glu Ala Leu

565 570 575
 Leu Lys Pro Asn Val Ala Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Lys Tyr Val Lys

580 585 590
 Lys Ile Asn Lys Ala Val Glu Ala Phe Met Phe Leu Asn Trp Ala Glu

595 600 605
 Glu Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Asn Glu Val Thr Thr Met

610 615 620
 Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala

625 630 635 640
 Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Ser Lys Gly Glu Phe Val Glu Ala Ile

645 650 655

Ile Phe Thr Gly Val Val Ala Met Leu Glu Phe Ile Pro Glu Tyr Ala
 660 665 670

Leu Pro Val Phe Gly Thr Phe Ala Ile Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
 675 680 685

Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asn Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
 690 695 700

Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Thr Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
 705 710 715 720

Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Glu Lys Met Lys Lys 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 Ser Ala Met Ile Asn Ile
 770 775 780

Asn Lys Phe Leu Asp Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
 785 790 795 800

Ile Pro Tyr Ala Val Lys Arg Leu Lys Asp Phe Asp Ala Ser Val Arg
 805 810 815

Asp Val Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Val Leu
 820 825 830

Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Glu Val Asn Asn Thr Leu Ser Ala Asp
 835 840 845

Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Lys Lys Leu Leu Ser
 850 855 860

Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Val Asn Thr Ser Ile Leu Ser
 865 870 875 880

Ile Val Tyr Lys Lys Asp Asp Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Gly Ala
 885 890 895

Lys Ile Asn Ile Gly Asp Arg Val Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Lys Asn

900 905 910
 Gln Ile Lys Leu Ile Asn Leu Glu Ser Ser Thr 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 Lys Ile Pro Lys Tyr Phe Ser Lys Ile Asn Leu Asn Asn

945 950 955 960
 Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Ile Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val

965 970 975
 Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Asn Lys Gln

980 985 990
 Asn Ile Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Val Asn Ile Ser

995 1000 1005
 Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu

1010 1015 1020
 Thr Lys Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro

1025 1030 1035 1040
 Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Lys Ile Met Phe Lys

1045 1050 1055
 Leu Asp Gly Cys Arg Asp Pro Arg Arg Tyr Ile Met Ile Lys Tyr Phe

1060 1065 1070
 Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr

1075 1080 1085
 Asp Ser Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr

1090 1095 1100
 Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Phe Asp Pro Asn

1105 1110 1115 1120
 Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Ile Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu

1125 1130 1135
 Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val Val Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser

1140 1145 1150

Thr Leu Tyr Glu Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly
 1155 1160 1165
 Asn Glu Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val
 1170 1175 1180
 Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala

 1185 1190 1195 1200
 Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn
 1205 1210 1215
 Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asp Asp Gln Gly Ile Arg
 1220 1225 1230
 Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly
 1235 1240 1245
 Phe Ile Gly Phe His Leu Tyr Asp Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser

 1250 1255 1260
 Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Val Gly Lys Ala Ser Arg Thr Phe Gly Cys
 1265 1270 1275 1280
 Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Ser Ser Leu
 1285 1290 1295

 <210> 3
 <211> 1292
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum A3
 <400> 3
 Met Pro Phe Val Asn Lys Pro Phe Asn Tyr Arg Asp Pro Gly 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 Glu Gly Val 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 Ile Lys Leu Phe Asp
 85 90 95
 Arg Ile Tyr Ser Thr Gly Leu Gly Arg Met Leu Leu Ser Phe Ile Val
 100 105 110
 Lys 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 Glu Pro Gly Gly Ser Tyr
 130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Thr Gly Pro Ser Ala Asp Ile
 145 150 155 160
 Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Asp Val Phe 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 Thr Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
 210 215 220
 Leu Ile His Ala Ala His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn
 225 230 235 240
 Arg Val Leu Lys Val Lys 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 Asn Asp Thr Asn
 260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Trp Gln Lys Lys Phe Ser Arg Asp Ala Tyr Asp
 275 280 285
 Asn Leu Gln Asn Ile Ala Arg Ile Leu Asn Glu Ala Lys Thr Ile Val
 290 295 300
 Gly Thr Thr Thr Pro Leu Gln Tyr Met Lys Asn Ile Phe Ile Arg Lys
 305 310 315 320

Tyr Phe Leu Ser Glu Asp Ala Ser Gly Lys Ile Ser Val Asn Lys Ala
 325 330 335

Ala Phe Lys Glu Phe Tyr Arg Val Leu Thr Arg Gly Phe Thr Glu Leu
 340 345 350

Glu Phe Val Asn Pro Phe Lys Val Ile Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn
 355 360 365

Phe Asp Lys Ala Val Phe Arg Ile Asn Ile Val Pro Asp Glu Asn Tyr
 370 375 380

Thr Ile Asn Glu Gly Phe Asn Leu Glu Gly Ala Asn Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400

Asn Thr Glu Ile Asn Ser Arg Asn Phe Thr Arg Leu Lys Asn Phe Thr
 405 410 415

Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Pro
 420 425 430

Phe Lys Thr Lys Ser Leu Asp Glu Gly Tyr Asn Lys Ala Leu Asn Tyr
 435 440 445

Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu
 450 455 460

Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asp Lys Val Glu Glu Ile Thr Ala Asp
 465 470 475 480

Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Ser Asp Leu Ile Gln
 485 490 495

Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asp Phe Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser
 500 505 510

Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu Pro Met Pro
 515 520 525

Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr
 530 535 540

Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His Gly Asp Ser
 545 550 555 560

Arg Ile Ile Leu Thr Asn Ser Ala Glu Glu Ala Leu Leu Lys Pro Asn

565 570 575
 Val Ala Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Lys Tyr Val Lys Lys Ile Asn Lys
 580 585 590

Ala Val Glu Ala Val Ile Phe Leu Ser Trp Ala Glu Glu Leu Val Tyr
 595 600 605

Asp Phe Thr Asp Glu Thr Asn Glu Val Thr Thr Met Asp Lys Ile Ala
 610 615 620

Asp Ile Thr Ile Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly
 625 630 635 640

Asn Met Val Ser Lys Gly Glu Phe Val Glu Ala Ile Leu Phe Thr Gly
 645 650 655

Val Val Ala Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Tyr Ser Leu Pro Val Phe
 660 665 670

Gly Thr Phe Ala Ile Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val
 675 680 685

Gln Thr Ile Asn Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu
 690 695 700

Val Tyr Lys Tyr Thr Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln
 705 710 715 720

Ile Asp Leu Ile Arg Glu Lys Met Lys Lys Ala Leu Glu Asn Gln Ala
 725 730 735

Glu Ala Thr Arg Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu
 740 745 750

Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys
 755 760 765

Leu Asn Arg Ser Ile Asn Arg Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu
 770 775 780

Asp Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Ala
 785 790 795 800

Val Lys Arg Leu Lys Asp Phe Asp Ala Ser Val Arg Asp Val Leu Leu
 805 810 815

Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Leu Gln Val Asp Arg
 820 825 830
 Leu Lys Asp Glu Val Asn Asn Thr Leu Ser Ala Asp Ile Pro Phe Gln
 835 840 845

 Leu Ser Lys Tyr Val Asn Asp Lys Lys Leu Leu Ser Thr Phe Thr Glu
 850 855 860
 Tyr Ile Lys Asn Ile Val Asn Thr Ser Ile Leu Ser Ile Val Tyr Lys
 865 870 875 880
 Lys Asp Asp Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Gly Ala Lys Ile Asn Ile
 885 890 895
 Gly Asp Arg Val Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Lys Asn Gln Ile Lys Leu
 900 905 910

 Ile Asn Leu Glu Ser Ser Thr Ile Glu Val Ile Leu Lys Asn Ala Ile
 915 920 925
 Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser Phe Trp Ile Lys
 930 935 940
 Ile Pro Lys Tyr Phe Ser Lys Ile Asn Leu Asn Asn Glu Tyr Thr Ile
 945 950 955 960
 Ile Asn Cys Ile Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn Tyr
 965 970 975

 Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Asn Lys Gln Asn Ile Gln Arg
 980 985 990
 Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Val Asn Ile Ser Asp Tyr Ile Asn
 995 1000 1005
 Arg Trp Met Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Thr Lys Ser Lys
 1010 1015 1020
 Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro Ile Ser Asn Leu
 1025 1030 1035 1040

 Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Lys Ile Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys
 1045 1050 1055
 Arg Asp Pro Arg Arg Tyr Ile Met Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp

1060 1065 1070
 Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Ser Gln Ser
 1075 1080 1085
 Asn Pro Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Gln Tyr Asp
 1090 1095 1100

 Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Phe Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp
 1105 1110 1115 1120
 Val Asn Asn Ile Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg
 1125 1130 1135
 Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Thr Leu Tyr Met
 1140 1145 1150
 Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Glu Asp Asn
 1155 1160 1165

 Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn
 1170 1175 1180
 Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu Lys
 1185 1190 1195 1200
 Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser Gln Val
 1205 1210 1215
 Val Val Met Lys Ser Lys Asp Asp Gln Gly Ile Arg Asn Lys Cys Lys
 1220 1225 1230

 Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly Phe Val Gly Phe
 1235 1240 1245
 His Leu Tyr Asp Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser Asn Trp Tyr Asn
 1250 1255 1260
 Arg Gln Val Gly Lys Ala Ser Arg Thr Phe Gly Cys Ser Trp Glu Phe
 1265 1270 1275 1280
 Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Ser Ser Leu
 1285 1290

 <210> 4
 <211
 > 1296

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum A4

<400> 4

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

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

 115 120 125
 Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Ile Ile Gln Leu Asp Asp Ser Tyr
 130 135 140
 Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Ala Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asn Ile
 145 150 155 160
 Ile Glu Ser Gln Cys Ser Ser Phe Arg Asp Asp 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 Val Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
 195 200 205
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Gln Asp Pro Ala Val Ala Leu Ala His Glu
 210 215 220
 Leu Ile His Ala Glu His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Thr Asn

225 230 235 240
 Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ala Gly Leu

 245 250 255
 Glu Val Ser Leu Glu Glu Leu Ile Thr Phe Gly Gly Asn Asp Ala Lys
 260 265 270
 Phe Ile Asp Ser Leu Gln Lys Lys Glu Phe Ser 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 Ala Thr Gly Lys Phe Leu Val Asp Arg Leu
 325 330 335
 Lys Phe Asp Glu Leu Tyr Lys Leu 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 Asp Val Asn Tyr

 370 375 380
 Thr Ile His Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Gly Gln Asn Ile Glu Ile Asn Asn Lys Asn Phe Asp 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 Glu Gly Tyr Asn Lys

 435 440 445
 Ala Leu Asn Glu 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 Asp Lys Val 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 Asn Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
 500 505 510
 Glu Asn Thr Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
 515 520 525
 Glu Pro Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
 530 535 540
 Leu Asn Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Lys
 545 550 555 560
 His Ser Asn Ser Arg Ile Ile Leu Thr Asn Ser Ala Lys Glu Ala Leu
 565 570 575
 Leu Lys Pro Asn Ile Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Lys Tyr Ile Lys
 580 585 590
 Ala Ile Asn Lys Ala Val Glu Ala Val Thr Phe Val Asn Trp Ile Glu
 595 600 605
 Asn Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Asn Glu Val Ser Thr Met
 610 615 620
 Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Val Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
 625 630 635 640
 Leu Asn Ile Gly Asn Met Ile Tyr Lys Gly Glu Phe Val Glu Ala Ile
 645 650 655
 Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Ile Val Pro Glu Ile Ala
 660 665 670
 Leu Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Val Ser 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 Ile
 705 710 715 720
 Val Asn Thr Gln Ile Asn Leu Ile Arg Glu Lys Met Lys Lys 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 Ser Ala Met Ile Asn Ile
 770 775 780
 Asn Lys Phe Leu Asp Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
 785 790 795 800
 Ile Pro Tyr Ala Val Lys Arg Leu Lys Asp Phe Asp Ala Ser Val Arg
 805 810 815
 Asp Val Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly

 820 825 830
 Gln Val Asn Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Ala Asp
 835 840 845
 Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Lys Lys Leu Leu Ser
 850 855 860
 Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Thr Asn Ala Ser Ile Leu Ser
 865 870 875 880
 Ile Val Tyr Lys Asp Asp Asp Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Gly Ala

 885 890 895
 Glu Ile Tyr Asn Gly Asp Lys Val Tyr Tyr Asn Ser Ile Asp Lys Asn
 900 905 910
 Gln Ile Arg Leu Ile Asn Leu Glu Ser Ser Thr Ile Glu Val Ile Leu
 915 920 925
 Lys Lys 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 Phe 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 Ile
 1010 1015 1020
 Thr Lys Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro
 1025 1030 1035 1040
 Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Lys Ile Met Phe Lys
 1045 1050 1055
 Leu Asp Gly Cys Arg Asp Pro His Arg Tyr Ile Val Ile Lys Tyr Phe
 1060 1065 1070
 Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Ser Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr
 1075 1080 1085
 Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr
 1090 1095 1100
 Leu Gln Tyr Asp Lys Ser Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn
 1105 1110 1115 1120
 Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu
 1125 1130 1135
 Lys Gly Pro Arg Asp Asn Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser
 1140 1145 1150
 Ser Leu Tyr Met Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly
 1155 1160 1165
 Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val
 1170 1175 1180
 Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala
 1185 1190 1195 1200
 Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn
 1205 1210 1215
 Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr

1220 1225 1230
 Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly
 1235 1240 1245
 Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser
 1250 1255 1260
 Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys

 1265 1270 1275 1280
 Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Arg Glu Arg Pro Leu
 1285 1290 1295
 <210> 5
 <211> 1296
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum A5
 <400> 5
 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 Glu 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 Asp 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 Glu 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 Glu 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 Glu 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 Val Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
 565 570 575
 Leu Asn Pro Ser Ser Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Arg
 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 Gly 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 Gly Asp
 755 760 765
 Leu Ser Ser Lys Leu Asn Asp 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
 Glu 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 Ile 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 Lys Ile Pro Lys Tyr Phe Ser Lys Ile Asn Leu Asn Asn
 945 950 955 960
 Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Ile Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val
 965 970 975
 Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Asn Lys Gln
 980 985 990

 Asn Ile Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Val Ala Ile Ser
 995 1000 1005
 Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Ile Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu
 1010 1015 1020
 Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro
 1025 1030 1035 1040
 Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys
 1045 1050 1055

 Leu Asp Gly Cys Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe
 1060 1065 1070
 Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr
 1075 1080 1085
 Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr
 1090 1095 1100
 Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn
 1105 1110 1115 1120

 Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu
 1125 1130 1135

Lys Gly Pro Arg Gly Ser Ile Val Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser
 1140 1145 1150
 Ser Leu Tyr Met Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly
 1155 1160 1165
 Asn Lys Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val
 1170 1175 1180

Val Val Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala
 1185 1190 1195 1200
 Gly Val Glu Lys Ile Leu Ser Val Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn
 1205 1210 1215
 Leu Ser Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Arg
 1220 1225 1230
 Asn Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly
 1235 1240 1245

Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Asp Lys Leu Val Ala Ser
 1250 1255 1260
 Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Phe Gly Cys
 1265 1270 1275 1280
 Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Ser Pro Leu
 1285 1290 1295

<210> 6

<211> 1291

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum B1

<400> 6

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

50 55 60
 Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn

 65 70 75 80
 Thr Asn Asp Lys Lys Asn Ile Phe Leu Gln Thr Met Ile Lys Leu Phe

 85 90 95
 Asn Arg Ile Lys Ser Lys Pro Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Met Ile

 100 105 110
 Ile Asn Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Asp Arg Arg Val Pro Leu Glu Glu

 115 120 125
 Phe Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn

 130 135 140
 Pro Gly Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile

 145 150 155 160
 Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly

 165 170 175
 Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln

 180 185 190
 Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu

 195 200 205
 Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro

 210 215 220
 Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr

 225 230 235 240
 Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe

 245 250 255
 Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe

 260 265 270
 Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile

 275 280 285
 Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn

 290 295 300

Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr
 305 310 315 320
 Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly
 325 330 335
 Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu
 340 345 350
 Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys
 355 360 365
 Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys
 370 375 380
 Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile

 385 390 395 400
 Ser Asp Lys Asp Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile
 405 410 415
 Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr
 420 425 430
 Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp
 435 440 445
 Val Asp Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asp Lys Asn Ser Phe Ser

 450 455 460
 Asp Asp Leu Ser Lys Asn Glu Arg Ile Glu Tyr Asn Thr Gln Ser Asn
 465 470 475 480
 Tyr Ile Glu Asn Asp Phe Pro Ile Asn Glu Leu Ile Leu Asp Thr Asp
 485 490 495
 Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr
 500 505 510
 Asp Phe Asn Val Asp Val Pro Ala Tyr Glu Lys Gln Pro Ala Ile Lys

 515 520 525
 Lys Ile Phe Thr Asp Glu Asn Thr Ile Phe Gln Tyr Leu Tyr Ser Gln
 530 535 540
 Thr Phe Pro Leu Asp Ile Arg Asp Ile Ser Leu Thr Ser Ser Phe Asp

545 550 555 560
 Asp Ala Leu Leu Phe Ser Asn Lys Val Tyr Ser Phe Phe Ser Met Asp
 565 570 575
 Tyr Ile Lys Thr Ala Asn Lys Val Val Glu Ala Gly Leu Phe Ala Gly

 580 585 590
 Trp Val Lys Gln Ile Val Asn Asp Phe Val Ile Glu Ala Asn Lys Ser
 595 600 605
 Asn Thr Met Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Ile
 610 615 620
 Gly Leu Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala Lys Gly Asn Phe Glu
 625 630 635 640
 Asn Ala Phe Glu Ile Ala Gly Ala Ser Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro

 645 650 655
 Glu Leu Leu Ile Pro Val Val Gly Ala Phe Leu Leu Glu Ser Tyr Ile
 660 665 670
 Asp Asn Lys Asn Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp Asn Ala Leu Thr Lys
 675 680 685
 Arg Asn Glu Lys Trp Ser Asp Met Tyr Gly Leu Ile Val Ala Gln Trp
 690 695 700
 Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile Lys Glu Gly Met Tyr

 705 710 715 720
 Lys Ala Leu Asn Tyr Gln Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ile Ile Lys Tyr
 725 730 735
 Arg Tyr Asn Ile Tyr Ser Glu Lys Glu Lys Ser Asn Ile Asn Ile Asp
 740 745 750
 Phe Asn Asp Ile Asn Ser Lys Leu Asn Glu Gly Ile Asn Gln Ala Ile
 755 760 765
 Asp Asn Ile Asn Asn Phe Ile Asn Gly Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met

 770 775 780
 Lys Lys Met Ile Pro Leu Ala Val Glu Lys Leu Leu Asp Phe Asp Asn
 785 790 795 800

Thr Leu Lys Lys Asn Leu Leu Asn Tyr Ile Asp Glu Asn Lys Leu Tyr
 805 810 815
 Leu Ile Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Lys Ser Lys Val Asn Lys Tyr Leu
 820 825 830
 Lys Thr Ile Met Pro Phe Asp Leu Ser Ile Tyr Thr Asn Asp Thr Ile
 835 840 845
 Leu Ile Glu Met Phe Asn Lys Tyr Asn Ser Glu Ile Leu Asn Asn Ile
 850 855 860
 Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Lys Asp Asn Asn Leu Ile Asp Leu Ser Gly
 865 870 875 880
 Tyr Gly Ala Lys Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Glu Leu Asn Asp Lys
 885 890 895
 Asn Gln Phe Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr
 900 905 910
 Gln Asn Gln Asn Ile Ile Phe Asn Ser Val Phe Leu Asp Phe Ser Val
 915 920 925
 Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn
 930 935 940
 Tyr Ile His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser
 945 950 955 960
 Gly Trp Lys Ile Ser Ile Arg Gly Asn Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile
 965 970 975
 Asp Ile Asn Gly Lys Thr Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Asn Ile Arg
 980 985 990
 Glu Asp Ile Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
 995 1000 1005
 Asn Asn Leu Asn Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu Ser
 1010 1015 1020
 Asn Thr Asp Ile Lys Asp Ile Arg Glu Val Ile Ala Asn Gly Glu Ile
 1025 1030 1035 1040
 Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe Ile Trp Met

1045 1050 1055
 Lys Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Glu Leu Ser Gln Ser Asn Ile Glu
 1060 1065 1070
 Glu Arg Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr Leu Lys Asp Phe Trp
 1075 1080 1085
 Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met Phe Asn Ala Gly

 1090 1095 1100
 Asn Lys Asn Ser Tyr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Ser Pro Val Gly Glu
 1105 1110 1115 1120
 Ile Leu Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Gln Asn Ser Lys Tyr Ile Asn Tyr
 1125 1130 1135
 Arg Asp Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Phe Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn
 1140 1145 1150
 Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asp Ile Val Arg Lys Glu Asp Tyr Ile Tyr

 1155 1160 1165
 Leu Asp Phe Phe Asn Leu Asn Gln Glu Trp Arg Val Tyr Ile Tyr Lys
 1170 1175 1180
 Tyr Phe Lys Lys Glu Glu Glu Lys Leu Phe Leu Ala Pro Ile Ser Asp
 1185 1190 1195 1200
 Ser Asp Glu Phe Tyr Asn Thr Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln
 1205 1210 1215
 Pro Thr Tyr Ser Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr

 1220 1225 1230
 Asp Glu Ile Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile
 1235 1240 1245
 Val Phe Lys Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu
 1250 1255 1260
 Lys Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Ser Lys Leu Gly Cys Asn Trp
 1265 1270 1275 1280
 Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu
 1285 1290

<210> 7

<211> 1291

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum B2

<400> 7

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

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

 115 120 125
 Phe Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn
 130 135 140
 Pro Gly Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile
 145 150 155 160
 Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly
 165 170 175
 Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln

 180 185 190
 Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu
 195 200 205
 Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro

210 215 220
 Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe

 245 250 255
 Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
 260 265 270
 Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile
 275 280 285
 Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn
 290 295 300
 Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr

 305 310 315 320
 Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly
 325 330 335
 Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu
 340 345 350
 Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys
 355 360 365
 Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys

 370 375 380
 Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile
 385 390 395 400
 Ser Asp Lys Asn Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile
 405 410 415
 Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr
 420 425 430
 Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Arg Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp

 435 440 445
 Val Asp Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asp Lys Asn Ser Phe Ser
 450 455 460

Asp Asp Leu Ser Lys Asn Glu Arg Ile Glu Tyr Asp Thr Gln Ser Asn
 465 470 475 480
 Tyr Ile Glu Asn Arg Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ile Leu Asp Thr Asn
 485 490 495
 Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr
 500 505 510
 Asp Phe Asn Val Asp Val Pro Val Tyr Glu Lys Gln Pro Ala Ile Lys
 515 520 525
 Lys Ile Phe Thr Asp Glu Asn Thr Ile Phe Gln Tyr Leu Tyr Ser Gln
 530 535 540
 Thr Phe Pro Leu Asp Ile Arg Asp Ile Ser Leu Thr Ser Ser Phe Asp
 545 550 555 560
 Asp Ala Leu Leu Phe Ser Lys Lys Val Tyr Ser Phe Phe Ser Met Asp
 565 570 575
 Tyr Ile Lys Thr Ala Asn Lys Val Val Glu Ala Gly Leu Phe Ala Gly
 580 585 590
 Trp Val Lys Gln Ile Val Asp Asp Phe Val Ile Glu Ala Asn Lys Ser
 595 600 605
 Ser Thr Met Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Ile
 610 615 620
 Gly Leu Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala Lys Gly Asn Phe Glu
 625 630 635 640
 Asn Ala Phe Glu Ile Ala Gly Ala Ser Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro
 645 650 655
 Glu Leu Leu Ile Pro Val Val Gly Ala Phe Leu Leu Glu Ser Tyr Ile
 660 665 670
 Asp Asn Lys Asn Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp Asn Ala Leu Thr Lys
 675 680 685
 Arg Asp Glu Lys Trp Ile Asp Met Tyr Gly Leu Ile Val Ala Gln Trp
 690 695 700
 Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile Lys Glu Gly Met Tyr

705 710 715 720
Lys Ala Leu Asn Tyr Gln Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ile Ile Lys Tyr
 725 730 735
Lys Tyr Asn Ile Tyr Ser Glu Lys Glu Lys Ser Asn Ile Asn Ile Asp
 740 745 750
Phe Asn Asp Ile Asn Ser Lys Leu Asn Glu Gly Ile Asn Gln Ala Ile

 755 760 765
Asp Asn Ile Asn Asn Phe Ile Asn Glu Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met
 770 775 780
Lys Lys Met Ile Pro Leu Ala Val Glu Lys Leu Leu Asp Phe Asp Asn
785 790 795 800
Thr Leu Lys Lys Asn Leu Leu Asn Tyr Ile Asp Glu Asn Lys Leu Tyr
 805 810 815
Leu Ile Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Lys Ser Lys Val Asp Lys His Leu

 820 825 830
Lys Thr Ile Ile Pro Phe Asp Leu Ser Lys Tyr Thr Asn Asn Thr Ile
 835 840 845
Leu Ile Glu Ile Phe Asn Lys Tyr Asn Ser Glu Ile Leu Asn Asn Ile
 850 855 860
Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Arg Asp Asn Asn Leu Ile Asp Leu Ser Gly
865 870 875 880
Tyr Gly Ala Asn Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Glu Leu Asn Asp Lys

 885 890 895
Asn Gln Phe Lys Leu Thr Ser Ser Thr Asn Ser Glu Ile Arg Val Thr
 900 905 910
Gln Asn Gln Asn Ile Ile Phe Asn Ser Met Phe Leu Asp Phe Ser Val
 915 920 925
Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn
 930 935 940
Tyr Ile His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Ile Lys Asn Asn Ser

945 950 955 960

Gly Trp Lys Ile Ser Ile Arg Gly Asn Arg Ile Ile Trp Thr Leu Thr
 965 970 975

Asp Ile Asn Gly Lys Thr Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Ser Ile Arg
 980 985 990

Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
 995 1000 1005

Asn Asn Ser Asp Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu Ser
 1010 1015 1020

Asn Ile Asp Ile Lys Asp Ile Gly Glu Val Ile Ala Asn Gly Glu Ile
 1025 1030 1035 1040

Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe Ile Trp Met
 1045 1050 1055

Lys Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Glu Leu Ser Gln Ser Asn Ile Lys
 1060 1065 1070

Glu Ile Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr Leu Lys Asp Phe Trp
 1075 1080 1085

Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met Phe Asn Ala Gly
 1090 1095 1100

Asn Lys Asn Ser Tyr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Ser Ser Val Gly Glu
 1105 1110 1115 1120

Ile Leu Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Gln Asn Ser Asn Tyr Ile Asn Tyr
 1125 1130 1135

Arg Asn Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Phe Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn
 1140 1145 1150

Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asp Ile Val Arg Lys Glu Asp Tyr Ile Tyr
 1155 1160 1165

Leu Asp Phe Phe Asn Ser Asn Arg Glu Trp Arg Val Tyr Ala Tyr Lys
 1170 1175 1180

Asp Phe Lys Glu Glu Glu Lys Lys Leu Phe Leu Ala Asn Ile Tyr Asp
 1185 1190 1195 1200

Ser Asn Glu Phe Tyr Lys Thr Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln

1205 1210 1215
 Pro Thr Tyr Ser Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr
 1220 1225 1230
 Asp Glu Ile Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Thr
 1235 1240 1245
 Val Phe Lys Asn Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu
 1250 1255 1260
 Lys Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Ser Asp Leu Gly Cys Asn Trp

 1265 1270 1275 1280
 Lys Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu
 1285 1290

 <210> 8
 <211> 1291
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum B3
 <400> 8
 Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn
 1 5 10 15
 Asp Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg
 20 25 30
 Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Ile Pro Glu

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

 100 105 110
 Ile Asn Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Asp Arg Arg Val Pro Leu Glu Glu
 115 120 125

Phe Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn
 130 135 140
 Pro Gly Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile
 145 150 155 160
 Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly
 165 170 175
 Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln
 180 185 190
 Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu
 195 200 205
 Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro
 210 215 220
 Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe
 245 250 255
 Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
 260 265 270
 Gly Gly Gln Asp Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile
 275 280 285
 Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn
 290 295 300
 Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr
 305 310 315 320
 Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly
 325 330 335
 Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu
 340 345 350
 Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys
 355 360 365
 Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys

370 375 380
 Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile
 385 390 395 400
 Ser Asp Lys Asn Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile
 405 410 415
 Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr

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

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

 545 550 555 560
 Asp Ala Leu Leu Phe Ser Asn Lys Val Tyr Ser Phe Phe Ser Met Asp
 565 570 575
 Tyr Ile Lys Thr Ala Asn Lys Val Val Glu Ala Gly Leu Phe Ala Gly
 580 585 590
 Trp Val Lys Gln Ile Val Asp Asp Phe Val Ile Glu Ala Asn Lys Ser
 595 600 605
 Ser Thr Met Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Ile

 610 615 620

Gly Leu Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala Lys Gly Asn Phe Glu
 625 630 635 640
 Asn Ala Phe Glu Ile Ala Gly Ala Ser Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro
 645 650 655
 Glu Leu Leu Ile Pro Val Val Gly Ala Phe Leu Leu Glu Ser Tyr Ile
 660 665 670
 Asp Asn Lys Asn Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp Asn Ala Leu Thr Lys
 675 680 685
 Arg Asp Glu Lys Trp Ile Asp Met Tyr Gly Leu Ile Val Ala Gln Trp
 690 695 700
 Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile Lys Glu Gly Met Tyr
 705 710 715 720
 Lys Ala Leu Asn Tyr Gln Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ile Ile Lys Tyr
 725 730 735
 Lys Tyr Asn Ile Tyr Ser Glu Lys Glu Lys Ser Asn Ile Asn Ile Asp
 740 745 750
 Phe Asn Asp Ile Asn Ser Lys Leu Asn Glu Gly Ile Asn Gln Ala Ile
 755 760 765
 Asp Asn Ile Asn Asn Phe Ile Asn Glu Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met
 770 775 780
 Lys Lys Met Ile Pro Leu Ala Val Glu Lys Leu Leu Asp Phe Asp Asn
 785 790 795 800
 Thr Leu Lys Lys Asn Leu Leu Asn Tyr Ile Asp Glu Asn Lys Leu Tyr
 805 810 815
 Leu Ile Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Lys Ser Lys Val Asp Lys His Leu
 820 825 830
 Lys Thr Ile Ile Pro Phe Asp Leu Ser Met Tyr Thr Asn Asn Thr Ile
 835 840 845
 Leu Ile Glu Ile Phe Asn Lys Tyr Asn Ser Glu Ile Leu Asn Asn Ile
 850 855 860
 Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Arg Asp Asn Asn Leu Ile Asp Leu Ser Gly

865 870 875 880
 Tyr Gly Ala Lys Val Glu Val Tyr Asn Gly Val Glu Leu Asn Asp Lys
 885 890 895
 Asn Gln Phe Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Thr
 900 905 910
 Gln Asn Gln Asp Ile Ile Phe Asn Ser Met Phe Leu Asp Phe Ser Val
 915 920 925
 Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn

 930 935 940
 Tyr Ile His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Ile Lys Asn Asn Ser
 945 950 955 960
 Gly Trp Lys Ile Ser Ile Arg Gly Asn Lys Ile Ile Trp Thr Leu Thr
 965 970 975
 Asp Ile Asn Gly Lys Thr Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Ser Ile Arg
 980 985 990
 Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr

 995 1000 1005
 Asn Asn Ser Asp Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu Ser
 1010 1015 1020
 Asn Ile Asp Ile Lys Asp Ile Gly Glu Val Ile Ala Asn Gly Glu Ile
 1025 1030 1035 1040
 Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asp Ile Asp Arg Thr Gln Phe Ile Trp Met
 1045 1050 1055
 Lys Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Glu Leu Ser Gln Ser Asn Ile Lys

 1060 1065 1070
 Glu Ile Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr Leu Lys Asp Phe Trp
 1075 1080 1085
 Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met Phe Asn Ala Gly
 1090 1095 1100
 Asn Lys Asn Ser Tyr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Ser Ser Val Gly Glu
 1105 1110 1115 1120

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

1125 1130 1135

Arg Asn Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Phe Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn

1140 1145 1150

Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asp Ile Val Arg Lys Glu Asp Tyr Ile Tyr

1155 1160 1165

Leu Asp Phe Phe Asn Leu Asn Gln Glu Trp Arg Val Tyr Ala Tyr Lys

1170 1175 1180

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

1185 1190 1195 1200

Ser Asn Glu Phe Tyr Asn Thr Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln

1205 1210 1215

Pro Thr Tyr Ser Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr

1220 1225 1230

Asp Glu Ile Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile

1235 1240 1245

Val Phe Lys Asp Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu

1250 1255 1260

Lys Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Pro Asn Leu Gly Cys Asn Trp

1265 1270 1275 1280

Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Ile Glu

1285 1290

<210> 9

<211> 1291

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum Bnp

<400> 9

Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn

1 5 10 15

Asp Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg

20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Ile Pro Glu
 35 40 45
 Arg Tyr Thr Phe Gly Tyr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Lys Ser Ser Gly
 50 55 60
 Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn
 65 70 75 80
 Thr Asn Asp Lys Lys Asn Ile Phe Leu Gln Thr Met Ile Lys Leu Phe
 85 90 95
 Asn Arg Ile Lys Ser Lys Pro Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Met Ile
 100 105 110
 Ile Asn Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Asp Arg Arg Val Pro Leu Glu Glu
 115 120 125
 Phe Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn
 130 135 140
 Pro Gly Glu Val Glu Gln Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile
 145 150 155 160
 Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly
 165 170 175
 Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln
 180 185 190
 Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu
 195 200 205
 Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro
 210 215 220
 Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe
 245 250 255
 Phe Met Gln Ser Thr Asp Thr Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
 260 265 270
 Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Ser Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile

275 280 285
 Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn
 290 295 300
 Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr
 305 310 315 320
 Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly
 325 330 335
 Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asn Lys Leu Tyr Lys Ser Leu

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

 405 410 415
 Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr
 420 425 430
 Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Val Pro Gly Ile Cys Ile Asp
 435 440 445
 Val Asp Asn Glu Asn Leu Phe Phe Ile Ala Asp Lys Asn Ser Phe Ser
 450 455 460
 Asp Asp Leu Ser Lys Asn Glu Arg Val Glu Tyr Asn Thr Gln Asn Asn

 465 470 475 480
 Tyr Ile Gly Asn Asp Phe Pro Ile Asn Glu Leu Ile Leu Asp Thr Asp
 485 490 495
 Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr
 500 505 510
 Asp Phe Asn Val Asp Val Pro Val Tyr Glu Lys Gln Pro Ala Ile Lys
 515 520 525

Lys Val Phe Thr Asp Glu Asn Thr Ile Phe Gln Tyr Leu Tyr Ser Gln

530 535 540

Thr Phe Pro Leu Asn Ile Arg Asp Ile Ser Leu Thr Ser Ser Phe Asp

545 550 555 560

Asp Ala Leu Leu Val Ser Ser Lys Val Tyr Ser Phe Phe Ser Met Asp

565 570 575

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

580 585 590

Trp Val Lys Gln Ile Val Asp Asp Phe Val Ile Glu Ala Asn Lys Ser

595 600 605

Ser Thr Met Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Ile

610 615 620

Gly Leu Ala Leu Asn Val Gly Asp Glu Thr Ala Lys Gly Asn Phe Glu

625 630 635 640

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

645 650 655

Glu Leu Leu Ile Pro Val Val Gly Val Phe Leu Leu Glu Ser Tyr Ile

660 665 670

Asp Asn Lys Asn Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp Asn Ala Leu Thr Lys

675 680 685

Arg Val Glu Lys Trp Ile Asp Met Tyr Gly Leu Ile Val Ala Gln Trp

690 695 700

Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile Lys Glu Gly Met Tyr

705 710 715 720

Lys Ala Leu Asn Tyr Gln Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ile Ile Lys Tyr

725 730 735

Lys Tyr Asn Ile Tyr Ser Glu Glu Glu Lys Ser Asn Ile Asn Ile Asn

740 745 750

Phe Asn Asp Ile Asn Ser Lys Leu Asn Asp Gly Ile Asn Gln Ala Met

755 760 765

Asp Asn Ile Asn Asp Phe Ile Asn Glu Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met

770 775 780
 Lys Lys Met Ile Pro Leu Ala Val Lys Lys Leu Leu Asp Phe Asp Asn

 785 790 795 800
 Thr Leu Lys Lys Asn Leu Leu Asn Tyr Ile Asp Glu Asn Lys Leu Tyr
 805 810 815
 Leu Ile Gly Ser Val Glu Asp Glu Lys Ser Lys Val Asp Lys Tyr Leu
 820 825 830
 Lys Thr Ile Ile Pro Phe Asp Leu Ser Thr Tyr Thr Asn Asn Glu Ile
 835 840 845
 Leu Ile Lys Ile Phe Asn Lys Tyr Asn Ser Glu Ile Leu Asn Asn Ile

 850 855 860
 Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Arg Asp Asn Asn Leu Ile Asp Leu Ser Gly
 865 870 875 880
 Tyr Gly Ala Lys Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Lys Leu Asn Asp Lys
 885 890 895
 Asn Gln Phe Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asp Ser Lys Ile Arg Val Thr
 900 905 910
 Gln Asn Gln Asn Ile Ile Phe Asn Ser Met Phe Leu Asp Phe Ser Val

 915 920 925
 Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Arg Asn Asp Asp Ile Gln Asn
 930 935 940
 Tyr Ile His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser
 945 950 955 960
 Gly Trp Lys Ile Ser Ile Arg Gly Asn Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile
 965 970 975
 Asp Ile Asn Gly Lys Thr Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Asn Ile Arg

 980 985 990
 Glu Asp Ile Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
 995 1000 1005
 Asn Asn Leu Asp Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Thr Leu Glu Ser
 1010 1015 1020

Asn Met Asp Ile Lys Asp Ile Gly Glu Val Ile Val Asn Gly Glu Ile
 1025 1030 1035 1040
 Thr Phe Lys Leu Asp Gly Asp Val Asp Arg Thr Gln Phe Ile Trp Met

 1045 1050 1055
 Lys Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Gln Leu Asn Gln Ser Asn Ile Lys
 1060 1065 1070
 Glu Ile Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr Leu Lys Asp Phe Trp
 1075 1080 1085
 Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met Phe Asn Ala Gly
 1090 1095 1100
 Asn Lys Asn Ser Tyr Ile Lys Leu Val Lys Asp Ser Ser Val Gly Glu

 1105 1110 1115 1120
 Ile Leu Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Gln Asn Ser Asn Tyr Ile Asn Tyr
 1125 1130 1135
 Arg Asn Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Phe Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn
 1140 1145 1150
 Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asp Ile Val Arg Lys Glu Asp Tyr Ile His
 1155 1160 1165
 Leu Asp Phe Val Asn Ser Asn Glu Glu Trp Arg Val Tyr Ala Tyr Lys

 1170 1175 1180
 Asn Phe Lys Glu Gln Glu Gln Lys Leu Phe Leu Ser Ile Ile Tyr Asp
 1185 1190 1195 1200
 Ser Asn Glu Phe Tyr Lys Thr Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln
 1205 1210 1215
 Pro Thr Tyr Ser Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr
 1220 1225 1230
 Asp Asp Ile Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Val

 1235 1240 1245
 Leu Arg Lys Lys Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu
 1250 1255 1260
 Lys Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Lys Ser Asn Leu Gly Cys Asn Trp

1265 1270 1275 1280
 Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu
 1285 1290
 <210> 10
 <211> 1291
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum Bbv
 <400> 10
 Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn

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

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

 130 135 140
 Pro Gly Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile
 145 150 155 160
 Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly
 165 170 175
 Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln
 180 185 190

Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu
 195 200 205
 Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro
 210 215 220
 Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Gly Ile Lys Val Asn Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe
 245 250 255
 Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
 260 265 270
 Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Ser Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile
 275 280 285
 Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn
 290 295 300
 Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr
 305 310 315 320
 Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly
 325 330 335
 Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu
 340 345 350
 Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys
 355 360 365
 Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys
 370 375 380
 Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile
 385 390 395 400
 Ser Asp Lys Asn Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile
 405 410 415
 Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr
 420 425 430
 Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp

435 440 445
 Val Asp Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asp Lys Asn Ser Phe Ser

 450 455 460
 Asp Asp Leu Ser Lys Asn Glu Arg Ile Ala Tyr Asn Thr Gln Asn Asn
 465 470 475 480
 Tyr Ile Glu Asn Asp Phe Ser Ile Asn Glu Leu Ile Leu Asp Thr Asp

 485 490 495
 Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr

 500 505 510
 Asp Phe Asn Val Tyr Val Pro Val Tyr Lys Lys Gln Pro Ala Ile Lys

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

 565 570 575
 Tyr Ile Lys Thr Ala Asn Lys Val Val Glu Ala Gly Leu Phe Ala Gly

 580 585 590
 Trp Val Lys Gln Ile Val Asp Asp Phe Val Ile Glu Ala Asn Lys Ser
 595 600 605
 Ser Thr Met Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Ile
 610 615 620
 Gly Leu Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala Lys Gly Asn Phe Glu
 625 630 635 640
 Asn Ala Phe Glu Ile Ala Gly Ala Ser Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro

 645 650 655
 Glu Leu Leu Ile Pro Val Val Gly Ala Phe Leu Leu Glu Ser Tyr Ile
 660 665 670
 Asp Asn Lys Asn Lys Ile Ile Glu Thr Ile Asn Ser Ala Leu Thr Lys
 675 680 685

Arg Asp Glu Lys Trp Ile Asp Met Tyr Gly Leu Ile Val Ala Gln Trp
 690 695 700
 Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile Lys Glu Gly Met Tyr

 705 710 715 720
 Lys Ala Leu Asn Tyr Gln Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ile Ile Lys Tyr
 725 730 735
 Lys Tyr Asn Ile Tyr Ser Glu Lys Glu Arg Ser Asn Ile Asn Ile Asp
 740 745 750
 Phe Asn Asp Val Asn Ser Lys Leu Asn Glu Gly Ile Asn Gln Ala Ile
 755 760 765
 Asp Asn Ile Asn Asn Phe Ile Asn Glu Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met

 770 775 780
 Lys Lys Met Ile Pro Leu Ala Val Glu Lys Leu Leu Asp Phe Asp Asn
 785 790 795 800
 Thr Leu Arg Lys Asn Leu Leu Asn Tyr Ile Asp Glu Asn Lys Leu Tyr
 805 810 815
 Leu Ile Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Lys Ser Lys Val Asp Lys Tyr Leu
 820 825 830
 Lys Thr Ser Ile Pro Phe Asp Leu Ser Thr Tyr Thr Asn Asn Thr Ile

 835 840 845
 Leu Ile Glu Ile Phe Asn Lys Tyr Asn Ser Asp Ile Leu Asn Asn Ile
 850 855 860
 Ile Leu Asn Leu Arg Tyr Arg Asp Asn Lys Leu Ile Asp Leu Ser Gly
 865 870 875 880
 Tyr Gly Ala Lys Val Glu Val Tyr Asp Gly Val Lys Leu Asn Asp Lys
 885 890 895
 Asn Gln Phe Lys Leu Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Ile Arg Val Ile

 900 905 910
 Gln Asn Gln Asn Ile Ile Phe Asn Ser Met Phe Leu Asp Phe Ser Val
 915 920 925
 Ser Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Lys Asn Asp Gly Ile Gln Asn

930 935 940
 Tyr Ile His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Lys Asn Asn Ser
 945 950 955 960
 Gly Trp Lys Ile Ser Ile Arg Gly Asn Met Ile Ile Trp Thr Leu Ile

965 970 975
 Asp Ile Asn Gly Lys Ile Lys Ser Val Phe Phe Glu Tyr Ser Ile Lys
 980 985 990
 Glu Asp Ile Ser Glu Tyr Ile Asn Arg Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
 995 1000 1005
 Asn Asn Ser Asp Asn Ala Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu Glu Ser
 1010 1015 1020
 His Ile Asp Ile Arg Asp Ile Arg Glu Val Ile Ala Asn Asp Glu Ile

1025 1030 1035 1040
 Ile Phe Lys Leu Asp Gly Asn Ile Asp Arg Thr Gln Phe Ile Trp Met
 1045 1050 1055
 Lys Tyr Phe Ser Ile Phe Asn Thr Glu Leu Ser Gln Ser Asn Ile Glu
 1060 1065 1070
 Glu Ile Tyr Lys Ile Gln Ser Tyr Ser Glu Tyr Leu Lys Asp Phe Trp
 1075 1080 1085
 Gly Asn Pro Leu Met Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met Phe Asn Ala Gly

1090 1095 1100
 Asn Lys Asn Ser Tyr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Ser Ser Val Gly Glu
 1105 1110 1115 1120
 Ile Leu Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Gln Asn Ser Lys Tyr Ile Asn Tyr
 1125 1130 1135
 Arg Asp Leu Tyr Ile Gly Glu Lys Phe Ile Ile Arg Arg Lys Ser Asn
 1140 1145 1150
 Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asp Ile Val Arg Lys Glu Asp Tyr Ile Tyr

1155 1160 1165
 Leu Asp Phe Phe Asn Leu Asn Gln Glu Trp Arg Val Tyr Met Tyr Lys
 1170 1175 1180

Tyr Phe Lys Lys Glu Glu Glu Lys Leu Phe Leu Ala Pro Ile Ser Asp
 1185 1190 1195 1200
 Ser Asp Glu Phe Tyr Asn Thr Ile Gln Ile Lys Glu Tyr Asp Glu Gln
 1205 1210 1215
 Pro Thr Tyr Ser Cys Gln Leu Leu Phe Lys Lys Asp Glu Glu Ser Thr
 1220 1225 1230
 Asp Glu Ile Gly Leu Ile Gly Ile His Arg Phe Tyr Glu Ser Gly Ile
 1235 1240 1245
 Val Phe Lys Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe Cys Ile Ser Lys Trp Tyr Leu
 1250 1255 1260
 Lys Glu Val Lys Arg Lys Pro Tyr Asn Ser Lys Leu Gly Cys Asn Trp
 1265 1270 1275 1280
 Gln Phe Ile Pro Lys Asp Glu Gly Trp Thr Glu
 1285 1290

<210> 11

<211> 1291

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum C1-1

<400> 11

Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asp Asn
 1 5 10 15
 Lys Asn Ile Leu Tyr Leu Asp Thr His Leu Asn Thr Leu Ala Asn Glu
 20 25 30
 Pro Glu Lys Ala Phe Arg Ile Thr Gly Asn Ile Trp Val Ile Pro Asp
 35 40 45
 Arg Phe Ser Arg Asn Ser Asn Pro Asn Leu Asn Lys Pro Pro Arg Val
 50 55 60
 Thr Ser Pro Lys Ser Gly Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
 65 70 75 80
 Ser Asp Lys Asp Thr Phe Leu Lys Glu Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg
 85 90 95
 Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Thr

100	105	110		
Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr Phe Asp				
115	120	125		
Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln Gly Asn				
130	135	140		
Asn Trp Val Lys Thr Gly Ser Ile Asn Pro Ser Val Ile Ile Thr Gly				
145	150	155	160	
Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys Leu Thr				
	165	170	175	
Asn Asn Thr Phe Ala Ala Gln Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ser Ile Ile				
	180	185	190	
Ser Ile Ser Pro Arg Phe Met Leu Thr Tyr Ser Asn Ala Thr Asn Asp				
195	200	205		
Val Gly Glu Gly Arg Phe Ser Lys Ser Glu Phe Cys Met Asp Pro Ile				
210	215	220		
Leu Ile Leu Met His Glu Leu Asn His Ala Met His Asn Leu Tyr Gly				
225	230	235	240	
Ile Ala Ile Pro Asn Asp Gln Thr Ile Ser Ser Val Thr Ser Asn Ile				
	245	250	255	
Phe Tyr Ser Gln Tyr Asn Val Lys Leu Glu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala				
260	265	270		
Phe Gly Gly Pro Thr Ile Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Lys Tyr				
275	280	285		
Phe Glu Glu Lys Ala Leu Asp Tyr Tyr Arg Ser Ile Ala Lys Arg Leu				
290	295	300		
Asn Ser Ile Thr Thr Ala Asn Pro Ser Ser Phe Asn Lys Tyr Ile Gly				
	305	310	315	320
Glu Tyr Lys Gln Lys Leu Ile Arg Lys Tyr Arg Phe Val Val Glu Ser				
	325	330	335	
Ser Gly Glu Val Thr Val Asn Arg Asn Lys Phe Val Glu Leu Tyr Asn				
	340	345	350	

Glu Leu Thr Gln Ile Phe Thr Glu Phe Asn Tyr Ala Lys Ile Tyr Asn
 355 360 365
 Val Gln Asn Arg Lys Ile Tyr Leu Ser Asn Val Tyr Thr Pro Val Thr
 370 375 380
 Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Val Tyr Asp Ile Gln Asn Gly Phe Asn
 385 390 395 400
 Ile Pro Lys Ser Asn Leu Asn Val Leu Phe Met Gly Gln Asn Leu Ser
 405 410 415
 Arg Asn Pro Ala Leu Arg Lys Val Asn Pro Glu Asn Met Leu Tyr Leu
 420 425 430
 Phe Thr Lys Phe Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn
 435 440 445
 Lys Thr Leu Asp Cys Arg Glu Leu Leu Val Lys Asn Thr Asp Leu Pro
 450 455 460
 Phe Ile Gly Asp Ile Ser Asp Val Lys Thr Asp Ile Phe Leu Arg Lys
 465 470 475 480
 Asp Ile Asn Glu Glu Thr Glu Val Ile Tyr Tyr Pro Asp Asn Val Ser
 485 490 495
 Val Asp Gln Val Ile Leu Ser Lys Asn Thr Ser Glu His Gly Gln Leu
 500 505 510
 Asp Leu Leu Tyr Pro Ser Ile Asp Ser Glu Ser Glu Ile Leu Pro Gly
 515 520 525
 Glu Asn Gln Val Phe Tyr Asp Asn Arg Thr Gln Asn Val Asp Tyr Leu
 530 535 540
 Asn Ser Tyr Tyr Tyr Leu Glu Ser Gln Lys Leu Ser Asp Asn Val Glu
 545 550 555 560
 Asp Phe Thr Phe Thr Arg Ser Ile Glu Glu Ala Leu Asp Asn Ser Ala
 565 570 575
 Lys Val Tyr Thr Tyr Phe Pro Thr Leu Ala Asn Lys Val Asn Ala Gly
 580 585 590
 Val Gln Gly Gly Leu Phe Leu Met Trp Ala Asn Asp Val Val Glu Asp

595 600 605
 Phe Thr Thr Asn Ile Leu Arg Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp
 610 615 620
 Val Ser Ala Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Ser Asn

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

 690 695 700
 Tyr Glu Trp Met Met Gly Thr Trp Leu Ser Arg Ile Ile Thr Gln Phe
 705 710 715 720
 Asn Asn Ile Ser Tyr Gln Met Tyr Asp Ser Leu Asn Tyr Gln Ala Gly
 725 730 735
 Ala Ile Lys Ala Lys Ile Asp Leu Glu Tyr Lys Lys Tyr Ser Gly Ser
 740 745 750
 Asp Lys Glu Asn Ile Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu

 755 760 765
 Asp Val Lys Ile Ser Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg
 770 775 780
 Glu Cys Ser Val Thr Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile
 785 790 795 800
 Asp Glu Leu Asn Glu Phe Asp Arg Asn Thr Lys Ala Lys Leu Ile Asn
 805 810 815
 Leu Ile Asp Ser His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Lys Leu

 820 825 830
 Lys Ala Lys Val Asn Asn Ser Phe Gln Asn Thr Ile Pro Phe Asn Ile
 835 840 845

Phe Ser Tyr Thr Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Ile Ile Asn Glu Tyr
 850 855 860

Phe Asn Asn Ile Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Arg Lys
 865 870 875 880

Asn Thr Leu Val Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Ser Glu Glu
 885 890 895

Gly Asp Val Gln Leu Asn Pro Ile Phe Pro Phe Asp Phe Lys Leu Gly
 900 905 910

Ser Ser Gly Glu Asp Arg Gly Lys Val Ile Val Thr Gln Asn Glu Asn
 915 920 925

Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Ser Phe Ser Ile Ser Phe Trp Ile
 930 935 940

Arg Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn Leu Pro Gly Tyr Thr Ile Ile Asp

945 950 955 960

Ser Val Lys Asn Asn Ser Gly Trp Ser Ile Gly Ile Ile Ser Asn Phe
 965 970 975

Leu Val Phe Thr Leu Lys Gln Asn Glu Asp Ser Glu Gln Ser Ile Asn
 980 985 990

Phe Ser Tyr Asp Ile Ser Asn Asn Ala Pro Gly Tyr Asn Lys Trp Phe
 995 1000 1005

Phe Val Thr Val Thr Asn Asn Met Met Gly Asn Met Lys Ile Tyr Ile

1010 1015 1020

Asn Gly Lys Leu Ile Asp Thr Ile Lys Val Lys Glu Leu Thr Gly Ile
 1025 1030 1035 1040

Asn Phe Ser Lys Thr Ile Thr Phe Glu Ile Asn Lys Ile Pro Asp Thr
 1045 1050 1055

Gly Leu Ile Thr Ser Asp Ser Asp Asn Ile Asn Met Trp Ile Arg Asp
 1060 1065 1070

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

1075 1080 1085

Phe Asn Ser Leu Gln Tyr Thr Asn Val Val Lys Asp Tyr Trp Gly Asn

1090 1095 1100
 Asp Leu Arg Tyr Asn Lys Glu Tyr Tyr Met Val Asn Ile Asp Tyr Leu
 1105 1110 1115 1120
 Asn Arg Tyr Met Tyr Ala Asn Ser Arg Gln Ile Val Phe Asn Thr Arg
 1125 1130 1135
 Arg Asn Asn Asn Asp Phe Asn Glu Gly Tyr Lys Ile Ile Ile Lys Arg

 1140 1145 1150
 Ile Arg Gly Asn Thr Asn Asp Thr Arg Val Arg Gly Gly Asp Ile Leu
 1155 1160 1165
 Tyr Phe Asp Met Thr Ile Asn Asn Lys Ala Tyr Asn Leu Phe Met Lys
 1170 1175 1180
 Asn Glu Thr Met Tyr Ala Asp Asn His Ser Thr Glu Asp Ile Tyr Ala
 1185 1190 1195 1200
 Ile Gly Leu Arg Glu Gln Thr Lys Asp Ile Asn Asp Asn Ile Ile Phe

 1205 1210 1215
 Gln Ile Gln Pro Met Asn Asn Thr Tyr Tyr Tyr Ala Ser Gln Ile Phe
 1220 1225 1230
 Lys Ser Asn Phe Asn Gly Glu Asn Ile Ser Gly Ile Cys Ser Ile Gly
 1235 1240 1245
 Thr Tyr Arg Phe Arg Leu Gly Gly Asp Trp Tyr Arg His Asn Tyr Leu
 1250 1255 1260
 Val Pro Thr Val Lys Gln Gly Asn Tyr Ala Ser Leu Leu Glu Ser Thr

 1265 1270 1275 1280
 Ser Thr His Trp Gly Phe Val Pro Val Ser Glu
 1285 1290
 <210> 12
 <211> 1280
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum C1-2
 <400> 12
 Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asp Asn
 1 5 10 15

Lys Asn Ile Leu Tyr Leu Asp Thr His Leu Asn Thr Leu Ala Asn Glu
 20 25 30
 Pro Glu Lys Ala Phe Arg Ile Ile Gly Asn Ile Trp Val Ile Pro Asp
 35 40 45
 Arg Phe Ser Arg Asp Ser Asn Pro Asn Leu Asn Lys Pro Pro Arg Val
 50 55 60
 Thr Ser Pro Lys Ser Gly Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
 65 70 75 80
 Ser Glu Lys Asp Thr Phe Leu Lys Glu Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg
 85 90 95
 Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu Ala Thr
 100 105 110
 Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr Phe Asp
 115 120 125
 Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln Gly Asn
 130 135 140
 Asn Trp Val Lys Thr Gly Ser Ile Asn Pro Ser Val Ile Ile Thr Gly
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys Leu Thr
 165 170 175
 Asn Asn Thr Phe Ala Ala Gln Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ser Ile Ile
 180 185 190
 Ser Ile Ser Pro Arg Phe Met Leu Thr Tyr Ser Asn Ala Thr Asn Asn
 195 200 205
 Val Gly Glu Gly Arg Phe Ser Lys Ser Glu Phe Cys Met Asp Pro Ile
 210 215 220
 Leu Ile Leu Met His Glu Leu Asn His Thr Met His Asn Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Ile Ala Ile Pro Asn Asp Gln Arg Ile Ser Ser Val Thr Ser Asn Ile
 245 250 255
 Phe Tyr Ser Gln Tyr Lys Val Lys Leu Glu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala

260 265 270
 Phe Gly Gly Pro Thr Ile Asp Leu Ile Pro Lys Ser Gly Arg Lys Tyr
 275 280 285
 Phe Glu Glu Lys Ala Leu Asp Tyr Tyr Arg Ser Ile Ala Lys Arg Leu

 290 295 300
 Asn Ser Ile Thr Thr Ala Asn Pro Ser Ser Phe Asn Lys Tyr Ile Gly
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Gln Lys Leu Ile Arg Lys Tyr Arg Phe Val Val Glu Ser
 325 330 335
 Ser Gly Glu Val Ala Val Asp Arg Asn Lys Phe Ala Glu Leu Tyr Lys
 340 345 350
 Glu Leu Thr Gln Ile Phe Thr Glu Phe Asn Tyr Ala Lys Ile Tyr Asn

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

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

 485 490 495
 Val Asp Gln Val Ile Leu Ser Lys Asn Thr Ser Glu His Gly Gln Leu
 500 505 510

Asp Leu Leu Tyr Pro Ile Ile Glu Gly Glu Ser Gln Val Leu Pro Gly
 515 520 525
 Glu Asn Gln Val Phe Tyr Asp Asn Arg Thr Gln Asn Val Asp Tyr Leu
 530 535 540
 Asn Ser Tyr Tyr Tyr Leu Glu Ser Gln Lys Leu Ser Asp Asn Val Glu

 545 550 555 560
 Asp Phe Thr Phe Thr Thr Ser Ile Glu Glu Ala Leu Asp Asn Ser Gly
 565 570 575
 Lys Val Tyr Thr Tyr Phe Pro Lys Leu Ala Asp Lys Val Asn Thr Gly
 580 585 590
 Val Gln Gly Gly Leu Phe Leu Met Trp Ala Asn Asp Val Val Glu Asp
 595 600 605
 Phe Thr Thr Asn Ile Leu Arg Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp

 610 615 620
 Val Ser Ala Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Ser Asn
 625 630 635 640
 Ser Val Arg Arg Glu Asn Phe Thr Glu Ala Phe Ala Val Thr Gly Val
 645 650 655
 Thr Ile Leu Leu Glu Ala Phe Gln Glu Phe Thr Ile Pro Ala Leu Gly
 660 665 670
 Ala Phe Val Ile Tyr Ser Lys Val Gln Glu Arg Asn Glu Ile Ile Lys

 675 680 685
 Thr Ile Asp Asn Cys Leu Glu Gln Arg Ile Lys Arg Trp Lys Asp Ser
 690 695 700
 Tyr Glu Trp Met Ile Gly Thr Trp Leu Ser Arg Ile Thr Thr Gln Phe
 705 710 715 720
 Asn Asn Ile Ser Tyr Gln Met Tyr Asp Ser Leu Asn Tyr Gln Ala Asp
 725 730 735
 Ala Ile Lys Asp Lys Ile Asp Leu Glu Tyr Lys Lys Tyr Ser Gly Ser

 740 745 750
 Asp Lys Glu Asn Ile Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu

755 760 765
 Asp Ile Lys Ile Ser Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg
 770 775 780
 Glu Cys Ser Val Thr Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile
 785 790 795 800
 Asp Glu Leu Asn Lys Phe Asp Leu Lys Thr Lys Thr Glu Leu Ile Asn

 805 810 815
 Leu Ile Asp Ser His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Arg Leu
 820 825 830
 Lys Ala Lys Val Asn Glu Ser Phe Glu Asn Thr Ile Pro Phe Asn Ile
 835 840 845
 Phe Ser Tyr Thr Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Ile Ile Asn Glu Tyr
 850 855 860
 Phe Asn Ser Ile Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys

 865 870 875 880
 Asn Ala Leu Val Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Arg Leu Glu
 885 890 895
 Gly Asp Val Gln Val Asn Thr Ile Tyr Thr Asn Asp Phe Lys Leu Ser
 900 905 910
 Ser Ser Gly Asp Lys Ile Ile Val Asn Leu Asn Asn Asn Ile Leu Tyr
 915 920 925
 Ser Ala Ile Tyr Glu Asn Ser Ser Val Ser Phe Trp Ile Lys Ile Ser

 930 935 940
 Lys Asp Leu Thr Asn Ser His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Ser Ile
 945 950 955 960
 Lys Gln Asn Ser Gly Trp Lys Leu Cys Ile Arg Asn Gly Asn Ile Glu
 965 970 975
 Trp Ile Leu Gln Asp Ile Asn Arg Lys Tyr Lys Ser Leu Ile Phe Asp
 980 985 990
 Tyr Ser Glu Ser Leu Ser His Thr Gly Tyr Thr Asn Lys Trp Phe Phe

 995 1000 1005

Val Thr Ile Thr Asn Asn Ile Met Gly Tyr Met Lys Leu Tyr Ile Asn
 1010 1015 1020
 Gly Glu Leu Lys Gln Ser Glu Arg Ile Glu Asp Leu Asn Glu Val Lys
 1025 1030 1035 1040
 Leu Asp Lys Thr Ile Val Phe Gly Ile Asp Glu Asn Ile Asp Glu Asn
 1045 1050 1055
 Gln Met Leu Trp Ile Arg Asp Phe Asn Ile Phe Ser Lys Glu Leu Ser
 1060 1065 1070
 Asn Glu Asp Ile Asn Ile Val Tyr Glu Gly Gln Ile Leu Arg Asn Val
 1075 1080 1085
 Ile Lys Asp Tyr Trp Gly Asn Pro Leu Lys Phe Asp Thr Glu Tyr Tyr
 1090 1095 1100
 Ile Ile Asn Asp Asn Tyr Ile Asp Arg Tyr Ile Ala Pro Lys Ser Asn
 1105 1110 1115 1120
 Ile Leu Val Leu Val Gln Tyr Pro Asp Arg Ser Lys Leu Tyr Thr Gly
 1125 1130 1135
 Asn Pro Ile Thr Ile Lys Ser Val Ser Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Arg
 1140 1145 1150
 Ile Leu Asn Gly Asp Asn Ile Met Phe His Met Leu Tyr Asn Ser Gly
 1155 1160 1165
 Lys Tyr Met Ile Ile Arg Asp Thr Asp Thr Ile Tyr Ala Ile Glu Gly
 1170 1175 1180
 Arg Glu Cys Ser Lys Asn Cys Val Tyr Ala Leu Lys Leu Gln Ser Asn
 1185 1190 1195 1200
 Leu Gly Asn Tyr Gly Ile Gly Ile Phe Ser Ile Lys Asn Ile Val Ser
 1205 1210 1215
 Gln Asn Lys Tyr Cys Ser Gln Ile Phe Ser Ser Phe Met Lys Asn Thr
 1220 1225 1230
 Met Leu Leu Ala Asp Ile Tyr Lys Pro Trp Arg Phe Ser Phe Glu Asn
 1235 1240 1245
 Ala Tyr Thr Pro Val Ala Val Thr Asn Tyr Glu Thr Lys Leu Leu Ser

1250 1255 1260
 Thr Ser Ser Phe Trp Lys Phe Ile Ser Arg Asp Pro Gly Trp Val Glu
 1265 1270 1275 1280
 <210> 13
 <211> 1276
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum D1
 <400> 13
 Met Thr Trp Pro Val Lys Asp Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asp
 1 5 10 15
 Asn Asp Ile Leu Tyr Leu Arg Ile Pro Gln Asn Lys Leu Ile Thr Thr
 20 25 30

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

 Ile Asn Glu Arg Asp Ile Gly Lys Lys Leu Ile Asn Tyr Leu Val Val
 100 105 110
 Gly Ser Pro Phe Met Gly Asp Ser Ser Thr Pro Glu Asp Thr Phe Asp
 115 120 125
 Phe Thr Arg His Thr Thr Asn Ile Ala Val Glu Lys Phe Glu Asn Gly
 130 135 140
 Ser Trp Lys Val Thr Asn Ile Ile Thr Pro Ser Val Leu Ile Phe Gly
 145 150 155 160

 Pro Leu Pro Asn Ile Leu Asp Tyr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Gln Gly
 165 170 175
 Gln Gln Ser Asn Pro Ser Phe Glu Gly Phe Gly Thr Leu Ser Ile Leu
 180 185 190

Lys Val Ala Pro Glu Phe Leu Leu Thr Phe Ser Asp Val Thr Ser Asn
 195 200 205
 Gln Ser Ser Ala Val Leu Gly Lys Ser Ile Phe Cys Met Asp Pro Val
 210 215 220

 Ile Ala Leu Met His Glu Leu Thr His Ser Leu His Gln Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Ile Asn Ile Pro Ser Asp Lys Arg Ile Arg Pro Gln Val Ser Glu Gly
 245 250 255
 Phe Phe Ser Gln Asp Gly Pro Asn Val Gln Phe Glu Glu Leu Tyr Thr
 260 265 270
 Phe Gly Gly Leu Asp Val Glu Ile Ile Pro Gln Ile Glu Arg Ser Gln
 275 280 285

 Leu Arg Glu Lys Ala Leu Gly His Tyr Lys Asp Ile Ala Lys Arg Leu
 290 295 300
 Asn Asn Ile Asn Lys Thr Ile Pro Ser Ser Trp Ile Ser Asn Ile Asp
 305 310 315 320
 Lys Tyr Lys Lys Ile Phe Ser Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Asn
 325 330 335
 Thr Gly Asn Phe Val Val Asn Ile Asp Lys Phe Asn Ser Leu Tyr Ser
 340 345 350

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

 Arg Asn Pro Ala Leu Gln Lys Leu Ser Ser Glu Ser Val Val Asp Leu
 420 425 430
 Phe Thr Lys Val Cys Leu Arg Leu Thr Lys Asn Ser Arg Asp Asp Ser

435	440	445	
Thr Cys Ile Lys Val Lys Asn Asn Arg Leu Pro Tyr Val Ala Asp Lys			
450	455	460	
Asp Ser Ile Ser Gln Glu Ile Phe Glu Asn Lys Ile Ile Thr Asp Glu			
465	470	475	480
Thr Asn Val Gln Asn Tyr Ser Asp Lys Phe Ser Leu Asp Glu Ser Ile			
485	490	495	
Leu Asp Gly Gln Val Pro Ile Asn Pro Glu Ile Val Asp Pro Leu Leu			
500	505	510	
Pro Asn Val Asn Met Glu Pro Leu Asn Leu Pro Gly Glu Glu Ile Val			
515	520	525	
Phe Tyr Asp Asp Ile Thr Lys Tyr Val Asp Tyr Leu Asn Ser Tyr Tyr			
530	535	540	
Tyr Leu Glu Ser Gln Lys Leu Ser Asn Asn Val Glu Asn Ile Thr Leu			
545	550	555	560
Thr Thr Ser Val Glu Glu Ala Leu Gly Tyr Ser Asn Lys Ile Tyr Thr			
565	570	575	
Phe Leu Pro Ser Leu Ala Glu Lys Val Asn Lys Gly Val Gln Ala Gly			
580	585	590	
Leu Phe Leu Asn Trp Ala Asn Glu Val Val Glu Asp Phe Thr Thr Asn			
595	600	605	
Ile Met Lys Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Val Ile			
610	615	620	
Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Ser Ala Leu Arg			
625	630	635	640
Gly Asn Phe Asn Gln Ala Phe Ala Thr Ala Gly Val Ala Phe Leu Leu			
645	650	655	
Glu Gly Phe Pro Glu Phe Thr Ile Pro Ala Leu Gly Val Phe Thr Phe			
660	665	670	
Tyr Ser Ser Ile Gln Glu Arg Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile Glu Asn			
675	680	685	

Cys Leu Glu Gln Arg Val Lys Arg Trp Lys Asp Ser Tyr Gln Trp Met
 690 695 700
 Val Ser Asn Trp Leu Ser Arg Ile Thr Thr Gln Phe Asn His Ile Asn
 705 710 715 720
 Tyr Gln Met Tyr Asp Ser Leu Ser Tyr Gln Ala Asp Ala Ile Lys Ala
 725 730 735

 Lys Ile Asp Leu Glu Tyr Lys Lys Tyr Ser Gly Ser Asp Lys Glu Asn
 740 745 750
 Ile Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu Asp Val Lys Ile
 755 760 765
 Ser Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg Glu Cys Ser Val
 770 775 780
 Thr Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile Asp Glu Leu Asn
 785 790 795 800

 Lys Phe Asp Leu Arg Thr Lys Thr Glu Leu Ile Asn Leu Ile Asp Ser
 805 810 815
 His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Arg Leu Lys Ala Lys Val
 820 825 830
 Asn Glu Ser Phe Glu Asn Thr Met Pro Phe Asn Ile Phe Ser Tyr Thr
 835 840 845
 Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Ile Ile Asn Glu Tyr Phe Asn Ser Ile
 850 855 860

 Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys Asn Ala Leu Val
 865 870 875 880
 Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Arg Val Gly Asp Asn Val Gln
 885 890 895
 Leu Asn Thr Ile Tyr Thr Asn Asp Phe Lys Leu Ser Ser Ser Gly Asp
 900 905 910
 Lys Ile Ile Val Asn Leu Asn Asn Asn Ile Leu Tyr Ser Ala Ile Tyr
 915 920 925

 Glu Asn Ser Ser Val Ser Phe Trp Ile Lys Ile Ser Lys Asp Leu Thr

930 935 940
 Asn Ser His Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Ser Ile Glu Gln Asn Ser
 945 950 955 960
 Gly Trp Lys Leu Cys Ile Arg Asn Gly Asn Ile Glu Trp Ile Leu Gln
 965 970 975
 Asp Val Asn Arg Lys Tyr Lys Ser Leu Ile Phe Asp Tyr Ser Glu Ser
 980 985 990

 Leu Ser His Thr Gly Tyr Thr Asn Lys Trp Phe Phe Val Thr Ile Thr
 995 1000 1005
 Asn Asn Ile Met Gly Tyr Met Lys Leu Tyr Ile Asn Gly Glu Leu Lys
 1010 1015 1020
 Gln Ser Gln Lys Ile Glu Asp Leu Asp Glu Val Lys Leu Asp Lys Thr
 1025 1030 1035 1040
 Ile Val Phe Gly Ile Asp Glu Asn Ile Asp Glu Asn Gln Met Leu Trp
 1045 1050 1055

 Ile Arg Asp Phe Asn Ile Phe Ser Lys Glu Leu Ser Asn Glu Asp Ile
 1060 1065 1070
 Asn Ile Val Tyr Glu Gly Gln Ile Leu Arg Asn Val Ile Lys Asp Tyr
 1075 1080 1085
 Trp Gly Asn Pro Leu Lys Phe Asp Thr Glu Tyr Tyr Ile Ile Asn Asp
 1090 1095 1100
 Asn Tyr Ile Asp Arg Tyr Ile Ala Pro Glu Ser Asn Val Leu Val Leu
 1105 1110 1115 1120

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

Gln Asn Cys Val Tyr Ala Leu Lys Leu Gln Ser Asn Leu Gly Asn Tyr
 1185 1190 1195 1200

Gly Ile Gly Ile Phe Ser Ile Lys Asn Ile Val Ser Lys Asn Lys Tyr
 1205 1210 1215

Cys Ser Gln Ile Phe Ser Ser Phe Arg Glu Asn Thr Met Leu Leu Ala
 1220 1225 1230

Asp Ile Tyr Lys Pro Trp Arg Phe Ser Phe Lys Asn Ala Tyr Thr Pro
 1235 1240 1245

Val Ala Val Thr Asn Tyr Glu Thr Lys Leu Leu Ser Thr Ser Ser Phe
 1250 1255 1260

Trp Lys Phe Ile Ser Arg Asp Pro Gly Trp Val Glu
 1265 1270 1275

<210> 14
 <211> 1285
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum D2
 <400> 14

Met Thr Trp Pro Val Lys Asp Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asp
 1 5 10 15

Asn Asp Ile Leu Tyr Leu Arg Ile Pro Gln Asn Lys Leu Ile Thr Thr
 20 25 30

Pro Val Lys Ala Phe Met Ile Thr Gln Asn Ile Trp Val Ile Pro Glu
 35 40 45

Arg Phe Ser Ser Asp Thr Asn Pro Ser Leu Ser Lys Pro Pro Arg Pro
 50 55 60

Thr Ser Lys Tyr Gln Ser Tyr Tyr Asp Pro Ser Tyr Leu Ser Thr Asp
 65 70 75 80

Glu Gln Lys Asp Thr Phe Leu Lys Gly Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg
 85 90 95

Ile Asn Glu Arg Asp Ile Gly Lys Lys Leu Ile Asn Tyr Leu Val Val
 100 105 110

Gly Ser Pro Phe Met Gly Asp Ser Ser Thr Pro Glu Asp Thr Phe Asp

115 120 125
Phe Thr Arg His Thr Thr Asn Ile Ala Val Glu Lys Phe Glu Asn Gly
130 135 140
Ser Trp Lys Val Thr Asn Ile Ile Thr Pro Ser Val Leu Ile Phe Gly

145 150 155 160
Pro Leu Pro Asn Ile Leu Asp Tyr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Gln Gly
165 170 175
Gln Gln Ser Asn Pro Ser Phe Glu Gly Phe Gly Thr Leu Ser Ile Leu
180 185 190
Lys Val Ala Pro Glu Phe Leu Leu Thr Phe Ser Asp Val Thr Ser Asn
195 200 205
Gln Ser Ser Ala Val Leu Gly Lys Ser Ile Phe Cys Met Asp Pro Val

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

275 280 285
Leu Arg Glu Lys Ala Leu Gly His Tyr Lys Asp Ile Ala Lys Arg Leu
290 295 300
Asn Asn Ile Asn Lys Thr Ile Pro Ser Ser Trp Ser Ser Asn Ile Asp
305 310 315 320
Lys Tyr Lys Lys Ile Phe Ser Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Asn
325 330 335
Thr Gly Asn Phe Val Val Asn Ile Asp Lys Phe Asn Ser Leu Tyr Ser

340 345 350
Asp Leu Thr Asn Val Met Ser Glu Val Val Tyr Ser Ser Gln Tyr Asn
355 360 365

Val Lys Asn Arg Thr His Tyr Phe Ser Lys His Tyr Leu Pro Val Phe
 370 375 380
 Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Ile Tyr Thr Ile Ile Asn Gly Phe Asn
 385 390 395 400
 Leu Thr Thr Lys Gly Phe Asn Ile Glu Asn Ser Gly Gln Asn Ile Glu
 405 410 415
 Arg Asn Pro Ala Leu Gln Lys Leu Ser Ser Glu Ser Val Val Asp Leu
 420 425 430
 Phe Thr Lys Val Cys Leu Arg Leu Thr Arg Asn Ser Arg Asp Asp Ser
 435 440 445
 Thr Cys Ile Gln Val Lys Asn Asn Thr Leu Pro Tyr Val Ala Asp Lys
 450 455 460
 Asp Ser Ile Ser Gln Glu Ile Phe Glu Ser Gln Ile Ile Thr Asp Glu
 465 470 475 480
 Thr Asn Val Glu Asn Tyr Ser Asp Asn Phe Ser Leu Asp Glu Ser Ile
 485 490 495
 Leu Asp Ala Lys Val Pro Thr Asn Pro Glu Ala Val Asp Pro Leu Leu
 500 505 510
 Pro Asn Val Asn Met Glu Pro Leu Asn Val Pro Gly Glu Glu Glu Val
 515 520 525
 Phe Tyr Asp Asp Ile Thr Lys Asp Val Asp Tyr Leu Asn Ser Tyr Tyr
 530 535 540
 Tyr Leu Glu Ala Gln Lys Leu Ser Asn Asn Val Glu Asn Ile Thr Leu
 545 550 555 560
 Thr Thr Ser Val Glu Glu Ala Leu Gly Tyr Ser Asn Lys Ile Tyr Thr
 565 570 575
 Phe Leu Pro Ser Leu Ala Glu Lys Val Asn Lys Gly Val Gln Ala Gly
 580 585 590
 Leu Phe Leu Asn Trp Ala Asn Glu Val Val Glu Asp Phe Thr Thr Asn
 595 600 605
 Ile Met Lys Lys Asp Thr Leu Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser Ala Ile

610 615 620
 Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Ser Ala Leu Arg
 625 630 635 640
 Gly Asn Phe Lys Gln Ala Phe Ala Thr Ala Gly Val Ala Phe Leu Leu
 645 650 655
 Glu Gly Phe Pro Glu Phe Thr Ile Pro Ala Leu Gly Val Phe Thr Phe

 660 665 670
 Tyr Ser Ser Ile Gln Glu Arg Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile Glu Asn
 675 680 685
 Cys Leu Glu Gln Arg Val Lys Arg Trp Lys Asp Ser Tyr Gln Trp Met
 690 695 700
 Val Ser Asn Trp Leu Ser Arg Ile Thr Thr Arg Phe Asn His Ile Ser
 705 710 715 720
 Tyr Gln Met Tyr Asp Ser Leu Ser Tyr Gln Ala Asp Ala Ile Lys Ala

 725 730 735
 Lys Ile Asp Leu Glu Tyr Lys Lys Tyr Ser Gly Ser Asp Lys Glu Asn
 740 745 750
 Ile Lys Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Asn Ser Leu Asp Val Lys Ile
 755 760 765
 Ser Glu Ala Met Asn Asn Ile Asn Lys Phe Ile Arg Glu Cys Ser Val
 770 775 780
 Thr Tyr Leu Phe Lys Asn Met Leu Pro Lys Val Ile Asp Glu Leu Asn

 785 790 795 800
 Lys Phe Asp Leu Lys Thr Lys Thr Glu Leu Ile Asn Leu Ile Asp Ser
 805 810 815
 His Asn Ile Ile Leu Val Gly Glu Val Asp Arg Leu Lys Ala Lys Val
 820 825 830
 Asn Glu Ser Phe Glu Asn Thr Ile Pro Phe Asn Ile Phe Ser Tyr Thr
 835 840 845
 Asn Asn Ser Leu Leu Lys Asp Met Ile Asn Glu Tyr Phe Asn Ser Ile

 850 855 860

Asn Asp Ser Lys Ile Leu Ser Leu Gln Asn Lys Lys Asn Thr Leu Met
 865 870 875 880
 Asp Thr Ser Gly Tyr Asn Ala Glu Val Arg Val Glu Gly Asn Val Gln
 885 890 895
 Leu Asn Pro Ile Phe Pro Phe Asp Phe Lys Leu Gly Ser Ser Gly Asp
 900 905 910
 Asp Arg Gly Lys Val Ile Val Thr Gln Asn Glu Asn Ile Val Tyr Asn
 915 920 925
 Ala Met Tyr Glu Ser Phe Ser Ile Ser Phe Trp Ile Arg Ile Asn Lys
 930 935 940
 Trp Val Ser Asn Leu Pro Gly Tyr Thr Ile Ile Asp Ser Val Lys Asn
 945 950 955 960
 Asn Ser Gly Trp Ser Ile Gly Ile Ile Ser Asn Phe Leu Val Phe Thr
 965 970 975
 Leu Lys Gln Asn Glu Asn Ser Glu Gln Asp Ile Asn Phe Ser Tyr Asp
 980 985 990
 Ile Ser Lys Asn Ala Ala Gly Tyr Asn Lys Trp Phe Phe Val Thr Ile
 995 1000 1005
 Thr Thr Asn Met Met Gly Asn Met Met Ile Tyr Ile Asn Gly Lys Leu
 1010 1015 1020
 Ile Asp Thr Ile Lys Val Lys Glu Leu Thr Gly Ile Asn Phe Ser Lys
 1025 1030 1035 1040
 Thr Ile Thr Phe Gln Met Asn Lys Ile Pro Asn Thr Gly Leu Ile Thr
 1045 1050 1055
 Ser Asp Ser Asp Asn Ile Asn Met Trp Ile Arg Asp Phe Tyr Ile Phe
 1060 1065 1070
 Ala Lys Glu Leu Asp Asp Lys Asp Ile Asn Ile Leu Phe Asn Ser Leu
 1075 1080 1085
 Gln Tyr Thr Asn Val Val Lys Asp Tyr Trp Gly Asn Asp Leu Arg Tyr
 1090 1095 1100
 Asp Lys Glu Tyr Tyr Met Ile Asn Val Asn Tyr Met Asn Arg Tyr Met

1105 1110 1115 1120
 Ser Lys Lys Gly Asn Gly Ile Val Phe Asn Thr Arg Lys Asn Asn Asn
 1125 1130 1135
 Asp Phe Asn Glu Gly Tyr Lys Ile Ile Ile Lys Arg Ile Arg Gly Asn
 1140 1145 1150
 Thr Asn Asp Thr Arg Val Arg Gly Glu Asn Val Leu Tyr Phe Asn Thr
 1155 1160 1165
 Thr Ile Asp Asn Lys Gln Tyr Ser Leu Gly Met Tyr Lys Pro Ser Arg

 1170 1175 1180
 Asn Leu Gly Thr Asp Leu Val Pro Leu Gly Ala Leu Asp Gln Pro Met
 1185 1190 1195 1200
 Asp Glu Ile Arg Lys Tyr Gly Ser Phe Ile Ile Gln Pro Cys Asn Thr
 1205 1210 1215
 Phe Asp Tyr Tyr Ala Ser Gln Leu Phe Leu Ser Ser Asn Ala Thr Thr
 1220 1225 1230
 Asn Arg Leu Gly Ile Leu Ser Ile Gly Ser Tyr Ser Phe Lys Leu Gly

 1235 1240 1245
 Asp Asp Tyr Trp Phe Asn His Glu Tyr Leu Ile Pro Val Ile Lys Ile
 1250 1255 1260
 Glu His Tyr Ala Ser Leu Leu Glu Ser Thr Ser Thr His Trp Val Phe
 1265 1270 1275 1280
 Val Pro Ala Ser Glu
 1285
 <210> 15
 <211> 1252
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum E1
 <400> 15
 Met Pro Lys Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp Arg

 1 5 10 15
 Thr Ile Leu Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Cys Gln Glu Phe Tyr Lys Ser
 20 25 30

Phe Asn Ile Met Lys Asn Ile Trp Ile Ile Pro Glu Arg Asn Val Ile
 35 40 45
 Gly Thr Thr Pro Gln Asp Phe His Pro Pro Thr Ser Leu Lys Asn Gly
 50 55 60
 Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Glu Glu Lys
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Leu Lys Ile Val Thr Lys Ile Phe Asn Arg Ile Asn Asn
 85 90 95
 Asn Leu Ser Gly Gly Ile Leu Leu Glu Glu Leu Ser Lys Ala Asn Pro
 100 105 110
 Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Asn Gln Phe His Ile Gly Asp
 115 120 125
 Ala Ser Ala Val Glu Ile Lys Phe Ser Asn Gly Ser Gln Asp Ile Leu
 130 135 140
 Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr
 145 150 155 160
 Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His
 165 170 175
 Gly Phe Gly Ser Ile Ala Ile Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Ser Phe
 180 185 190
 Arg Phe Asn Asp Asn Ser Met Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu
 195 200 205
 Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala
 210 215 220
 Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu
 225 230 235 240
 Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly
 245 250 255
 Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr
 260 265 270
 Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys

275 280 285
 Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu
 290 295 300
 Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn
 305 310 315 320
 Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu

 325 330 335
 Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile
 340 345 350
 Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile
 355 360 365
 Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe
 370 375 380
 Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr

 385 390 395 400
 Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val
 405 410 415
 Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly
 420 425 430
 Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile
 435 440 445
 Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Val Thr Ser Asn Asn Asn Tyr

 450 455 460
 Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala
 465 470 475 480
 Pro Gly Leu Ser Asp Glu Lys Leu Asn Leu Thr Ile Gln Asn Asp Ala
 485 490 495
 Tyr Ile Pro Lys Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Asp Ile Glu Gln His
 500 505 510
 Asp Val Asn Glu Leu Asn Val Phe Phe Tyr Leu Asp Ala Gln Lys Val

 515 520 525

Pro Glu Gly Glu Asn Asn Val Asn Leu Thr Ser Ser Ile Asp Thr Ala
 530 535 540

Leu Leu Glu Gln Pro Lys Ile Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Glu Phe Ile
 545 550 555 560

Asn Asn Val Asn Lys Pro Val Gln Ala Ala Leu Phe Val Ser Trp Ile
 565 570 575

Gln Gln Val Leu Val Asp Phe Thr Thr Glu Ala Asn Gln Lys Ser Thr
 580 585 590

Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Ile Val Val Pro Tyr Ile Gly Leu
 595 600 605

Ala Leu Asn Ile Gly Asn Glu Ala Gln Lys Gly Asn Phe Lys Asp Ala
 610 615 620

Leu Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Glu Pro Glu Leu
 625 630 635 640

Leu Ile Pro Thr Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Phe Leu Gly Ser
 645 650 655

Ser Asp Asn Lys Asn Lys Val Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Lys
 660 665 670

Glu Arg Asp Glu Lys Trp Lys Glu Val Tyr Ser Phe Ile Val Ser Asn
 675 680 685

Trp Met Thr Lys Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met
 690 695 700

Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asn Ala Ile Lys Thr Ile Ile Glu
 705 710 715 720

Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Leu Glu Glu Lys Asn Glu Leu Thr Asn
 725 730 735

Lys Tyr Asp Ile Lys Gln Ile Glu Asn Glu Leu Asn Gln Lys Val Ser
 740 745 750

Ile Ala Met Asn Asn Ile Asp Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser
 755 760 765

Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu

770 775 780
 Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asn Tyr Ile Ile Gln His
 785 790 795 800
 Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Thr
 805 810 815
 Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp
 820 825 830
 Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys

 835 840 845
 Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp
 850 855 860
 Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys
 865 870 875 880
 Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser
 885 890 895
 Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr

 900 905 910
 Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn
 915 920 925
 Lys Ile Val Asn Val Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg
 930 935 940
 Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile
 945 950 955 960
 Trp Thr Leu Gln Asp Asn Ala Gly Ile Asn Gln Lys Leu Ala Phe Asn

 965 970 975
 Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe
 980 985 990
 Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn
 995 1000 1005
 Gly Asn Leu Ile Asp Gln Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile His
 1010 1015 1020

Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Asn Cys Ser Tyr Thr Arg

1025 1030 1035 1040

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

 1045 1050 1055

Thr Glu Ile Gln Thr Leu Tyr Ser Asn Glu Pro Asn Thr Asn Ile Leu

 1060 1065 1070

Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Leu

 1075 1080 1085

Leu Asn Val Leu Lys Pro Asn Asn Phe Ile Asp Arg Arg Lys Asp Ser

 1090 1095 1100

Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ile Arg Ser Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg

1105 1110 1115 1120

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

 1125 1130 1135

Thr Asn Asp Asn Leu Val Arg Lys Asn Asp Gln Val Tyr Ile Asn Phe

 1140 1145 1150

Val Ala Ser Lys Thr His Leu Phe Pro Leu Tyr Ala Asp Thr Ala Thr

 1155 1160 1165

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

 1170 1175 1180

Asn Gln Val Val Val Met Asn Ser Val Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn

1185 1190 1195 1200

Phe Lys Asn Asn Asn Gly Asn Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe Lys Ala

 1205 1210 1215

Asp Thr Val Val Ala Ser Thr Trp Tyr Tyr Thr His Met Arg Asp His

 1220 1225 1230

Thr Asn Ser Asn Gly Cys Phe Trp Asn Phe Ile Ser Glu Glu His Gly

 1235 1240 1245

Trp Gln Glu Lys

 1250

<210> 16

<211> 1252

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum E2

<400> 16

Met Pro Lys Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp Arg

1 5 10 15

Thr Ile Leu Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Cys Gln Glu Phe Tyr Lys Ser

20 25 30

Phe Asn Ile Met Lys Asn Ile Trp Ile Ile Pro Glu Arg Asn Val Ile

35 40 45

Gly Thr Thr Pro Gln Asp Phe His Pro Pro Thr Ser Leu Lys Asn Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Asn Gln Phe His Ile Gly Asp

115 120 125

Ala Ser Ala Val Glu Ile Lys Phe Ser Asn Gly Ile Gln Asp Ile Leu

130 135 140

Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr

145 150 155 160

Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His

165 170 175

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

180 185 190

Arg Phe Asn Asp Asn Ser Met Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu

195 200 205

Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala

210 215 220
 Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu
 225 230 235 240
 Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly
 245 250 255
 Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr
 260 265 270
 Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys

 275 280 285
 Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu
 290 295 300
 Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn
 305 310 315 320
 Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu
 325 330 335
 Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile

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

 405 410 415
 Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly
 420 425 430
 Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile
 435 440 445
 Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Val Thr Ser Asn Asn Asn Tyr
 450 455 460

Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala

 465 470 475 480
 Pro Gly Leu Ser Asp Glu Lys Leu Asn Leu Thr Ile Gln Asn Asp Ala

 485 490 495
 Tyr Ile Pro Lys Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Asp Ile Glu Gln His

 500 505 510
 Asp Val Asn Glu Leu Asn Val Phe Phe Tyr Leu Asp Ala Gln Lys Val

 515 520 525
 Pro Glu Gly Glu Asn Asn Val Asn Leu Thr Ser Ser Ile Asp Thr Ala

 530 535 540
 Leu Leu Glu Gln Pro Lys Ile Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Glu Phe Ile

 545 550 555 560
 Asn Asn Val Asn Lys Pro Val Gln Ala Ala Leu Phe Val Ser Trp Ile

 565 570 575
 Gln Gln Val Leu Val Asp Phe Thr Thr Glu Ala Asn Gln Lys Ser Thr

 580 585 590
 Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Ile Val Val Pro Tyr Ile Gly Leu

 595 600 605
 Ala Leu Asn Ile Gly Asn Glu Ala Gln Lys Gly Asn Phe Lys Asp Ala

 610 615 620
 Leu Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Glu Pro Glu Leu

 625 630 635 640
 Leu Ile Pro Thr Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Phe Leu Gly Ser

 645 650 655
 Ser Asp Asn Lys Asn Lys Val Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Lys

 660 665 670
 Glu Arg Asp Glu Lys Trp Lys Glu Val Tyr Ser Phe Ile Val Ser Asn

 675 680 685
 Trp Met Thr Lys Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met

 690 695 700
 Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asn Ala Ile Lys Thr Ile Ile Glu

705 710 715 720
 Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Leu Glu Glu Lys Asn Glu Leu Thr Asn

 725 730 735
 Lys Tyr Asp Ile Lys Gln Ile Glu Asn Glu Leu Asn Gln Lys Val Ser
 740 745 750
 Ile Ala Met Asn Asn Ile Asp Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser
 755 760 765
 Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu
 770 775 780
 Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asn Tyr Ile Ile Gln His

 785 790 795 800
 Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Thr
 805 810 815
 Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp
 820 825 830
 Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys
 835 840 845
 Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp

 850 855 860
 Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys
 865 870 875 880
 Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser
 885 890 895
 Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr
 900 905 910
 Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn

 915 920 925
 Lys Ile Val Asn Val Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg
 930 935 940
 Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile
 945 950 955 960

Trp Thr Leu Gln Asp Asn Ala Gly Ile Asn Gln Lys Leu Ala Phe Asn
 965 970 975

Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe
 980 985 990

Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn
 995 1000 1005

Gly Asn Leu Ile Asp Gln Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile His
 1010 1015 1020

Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Asn Cys Ser Tyr Thr Arg
 1025 1030 1035 1040

Tyr Ile Gly Ile Arg Tyr Phe Asn Ile Phe Asp Lys Glu Leu Asp Glu
 1045 1050 1055

Thr Glu Ile Gln Thr Leu Tyr Asn Asn Glu Pro Asn Ala Asn Ile Leu
 1060 1065 1070

Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Leu
 1075 1080 1085

Leu Asn Val Leu Lys Pro Asn Asn Phe Ile Asp Arg Arg Thr Asp Ser
 1090 1095 1100

Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ile Arg Ser Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg
 1105 1110 1115 1120

Leu Tyr Ser Gly Ile Lys Val Lys Ile Gln Arg Val Asn Asn Ser Ser
 1125 1130 1135

Thr Asn Asp Asn Leu Val Arg Lys Asn Asp Gln Val Tyr Ile Asn Phe
 1140 1145 1150

Val Ala Ser Lys Thr His Leu Phe Pro Leu Tyr Ala Asp Thr Asn Thr
 1155 1160 1165

Thr Asn Lys Glu Lys Thr Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Asn Arg Phe
 1170 1175 1180

Asn Gln Val Val Val Met Asn Ser Val Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn
 1185 1190 1195 1200

Phe Lys Asn Asn Asn Gly Asn Asn Ile Gly Met Leu Gly Phe Lys Asp

1205 1210 1215
 Asn Thr Leu Val Ala Ser Thr Trp Tyr Tyr Thr His Met Arg Asp Asn
 1220 1225 1230
 Thr Asn Ser Asn Gly Cys Phe Trp Asn Phe Ile Ser Glu Glu His Gly

 1235 1240 1245
 Trp Gln Glu Lys
 1250
 <210> 17
 <211> 1252
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum E3
 <400> 17
 Met Pro Lys Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp Arg
 1 5 10 15
 Thr Ile Leu Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Cys Gln Glu Phe Tyr Lys Ser
 20 25 30
 Phe Asn Ile Met Lys Asn Ile Trp Ile Ile Pro Glu Arg Asn Val Ile

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

 100 105 110
 Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Asn Gln Phe His Ile Gly Asp
 115 120 125
 Ala Ser Ala Val Glu Ile Lys Phe Ser Asn Gly Ser Gln His Ile Leu
 130 135 140
 Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr
 145 150 155 160

Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His
 165 170 175
 Gly Phe Gly Ser Ile Ala Ile Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Ser Phe
 180 185 190
 Arg Phe Asn Asp Asn Ser Ile Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu
 195 200 205
 Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala
 210 215 220
 Lys Gly Ile Thr Thr Thr Cys Ile Ile Thr Gln Gln Gln Asn Pro Leu
 225 230 235 240
 Ile Thr Asn Arg Lys Gly Ile Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly
 245 250 255
 Gly Asn Asp Leu Asn Ile Ile Thr Val Ala Gln Tyr Asn Asp Ile Tyr
 260 265 270
 Thr Asn Leu Leu Asn Asp Tyr Arg Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys
 275 280 285
 Val Gln Val Ser Asn Pro Gln Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Ile Phe Gln
 290 295 300
 Glu Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn
 305 310 315 320
 Ile Asn Lys Phe Asp Asp Ile Leu Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu
 325 330 335
 Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Glu Thr Tyr Ile
 340 345 350
 Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile
 355 360 365
 Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe
 370 375 380
 Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Lys Pro Ile Thr
 385 390 395 400
 Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val

405
410
415

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

420
425
430

Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile

435
440
445

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

450
455
460

Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala

465
470
475
480

Pro Gly Leu Ser Asp Glu Lys Leu Asn Leu Thr Ile Gln Asn Asp Ala

485
490
495

Tyr Ile Pro Lys Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Asp Ile Glu Gln His

500
505
510

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

515
520
525

Pro Glu Gly Glu Asn Asn Val Asn Leu Thr Ser Ser Ile Asp Thr Ala

530
535
540

Leu Leu Glu Gln Pro Lys Ile Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Glu Phe Ile

545
550
555
560

Asn Asn Val Asn Lys Pro Val Gln Ala Ala Leu Phe Val Ser Trp Ile

565
570
575

Gln Gln Val Leu Val Asp Phe Thr Thr Glu Ala Asn Gln Lys Ser Thr

580
585
590

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

595
600
605

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

610
615
620

Leu Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Glu Pro Glu Leu

625
630
635
640

Leu Ile Pro Thr Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Phe Leu Gly Ser

645
650
655

Ser Asp Asn Lys Asn Lys Val Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Lys
 660 665 670

Glu Arg Asp Glu Lys Trp Lys Glu Val Tyr Ser Phe Ile Val Ser Asn
 675 680 685

Trp Met Thr Lys Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met
 690 695 700

Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asn Ala Ile Lys Thr Ile Ile Glu
 705 710 715 720

Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Leu Glu Glu Lys Asn Glu Leu Thr Asn
 725 730 735

Lys Tyr Asp Ile Lys Gln Ile Glu Asn Glu Leu Asn Gln Lys Val Ser
 740 745 750

Ile Ala Met Asn Asn Ile Asp Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser
 755 760 765

Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu
 770 775 780

Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asn Tyr Ile Ile Gln His
 785 790 795 800

Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Thr
 805 810 815

Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp
 820 825 830

Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys
 835 840 845

Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp
 850 855 860

Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys
 865 870 875 880

Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser
 885 890 895

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

900 905 910
 Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn

915 920 925
 Lys Ile Val Asn Val Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg

930 935 940
 Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile

945 950 955 960
 Trp Thr Leu Gln Asp Asn Ala Gly Ile Asn Gln Lys Leu Ala Phe Asn

965 970 975
 Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe

980 985 990
 Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn

995 1000 1005
 Gly Asn Leu Ile Asp Gln Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile His

1010 1015 1020
 Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Asn Cys Ser Tyr Thr Arg

1025 1030 1035 1040
 Tyr Ile Gly Ile Arg Tyr Phe Asn Ile Phe Asp Lys Glu Leu Asp Glu

1045 1050 1055
 Thr Glu Ile Gln Thr Leu Tyr Ser Asn Glu Pro Asn Thr Asn Ile Leu

1060 1065 1070
 Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Leu

1075 1080 1085
 Leu Asn Val Leu Lys Pro Asn Asn Phe Ile Asp Arg Arg Lys Asp Ser

1090 1095 1100
 Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ile Arg Ser Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg

1105 1110 1115 1120
 Leu Tyr Ser Gly Ile Lys Val Lys Ile Gln Arg Val Asn Asn Ser Ser

1125 1130 1135
 Thr Asn Asp Asn Leu Val Arg Lys Asn Asp Gln Val Tyr Ile Asn Phe

1140 1145 1150

Val Ala Ser Lys Thr His Leu Phe Pro Leu Tyr Ala Asp Thr Ala Thr
 1155 1160 1165
 Thr Asn Lys Glu Lys Thr Ile Lys Ile Ser Ser Ser Gly Asn Arg Phe
 1170 1175 1180
 Asn Gln Val Val Val Met Asn Ser Val Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn
 1185 1190 1195 1200
 Phe Lys Asn Asn Asn Gly Asn Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe Lys Ala
 1205 1210 1215
 Asp Thr Val Val Ala Ser Thr Trp Tyr Tyr Thr His Met Arg Asp His
 1220 1225 1230
 Thr Asn Ser Asn Gly Cys Phe Trp Asn Phe Ile Ser Glu Glu His Gly
 1235 1240 1245
 Trp Gln Glu Lys
 1250
 <210> 18
 <211> 1274
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum F1
 <400> 18
 Met Pro Val Ala Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp
 1 5 10 15
 Asp Thr Ile Leu Tyr Met Gln Ile Pro Tyr Glu Glu Lys Ser Lys Lys
 20 25 30
 Tyr Tyr Lys Ala Phe Glu Ile Met Arg Asn Val Trp Ile Ile Pro Glu
 35 40 45
 Arg Asn Thr Ile Gly Thr Asn Pro Ser Asp Phe Asp Pro Pro Ala Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Thr Thr
 65 70 75 80
 Asp Ala Glu Lys Asp Arg Tyr Leu Lys Thr Thr Ile Lys Leu Phe Lys
 85 90 95
 Arg Ile Asn Ser Asn Pro Ala Gly Lys Val Leu Leu Gln Glu Ile Ser

100 105 110
 Tyr Ala Lys Pro Tyr Leu Gly Asn Asp His Thr Pro Ile Asp Glu Phe

 115 120 125
 Ser Pro Val Thr Arg Thr Thr Ser Val Asn Ile Lys Leu Ser Thr Asn
 130 135 140
 Val Glu Ser Ser Met Leu Leu Asn Leu Leu Val Leu Gly Ala Gly Pro
 145 150 155 160
 Asp Ile Phe Glu Ser Cys Cys Tyr Pro Val Arg Lys Leu Ile Asp Pro
 165 170 175
 Asp Val Val Tyr Asp Pro Ser Asn Tyr Gly Phe Gly Ser Ile Asn Ile

 180 185 190
 Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Glu Tyr Thr Phe Asn Asp Ile Ser Gly
 195 200 205
 Gly His Asn Ser Ser Thr Glu Ser Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ile Ser
 210 215 220
 Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala Arg
 225 230 235 240
 Gly Val Thr Tyr Glu Glu Thr Ile Glu Val Lys Gln Ala Pro Leu Met

 245 250 255
 Ile Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly Gly
 260 265 270
 Gln Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Met Lys Glu Lys Ile Tyr Asn
 275 280 285
 Asn Leu Leu Ala Asn Tyr Glu Lys Ile Ala Thr Arg Leu Ser Glu Val
 290 295 300
 Asn Ser Ala Pro Pro Glu Tyr Asp Ile Asn Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe

 305 310 315 320
 Gln Trp Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asn Ala Asp Gly Ser Tyr Thr Val
 325 330 335
 Asn Glu Asn Lys Phe Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr
 340 345 350

Glu Ser Asp Leu Ala Asn Lys Phe Lys Val Lys Cys Arg Asn Thr Tyr
 355 360 365
 Phe Ile Lys Tyr Glu Phe Leu Lys Val Pro Asn Leu Leu Asp Asp Asp
 370 375 380
 Ile Tyr Thr Val Ser Glu Gly Phe Asn Ile Gly Asn Leu Ala Val Asn
 385 390 395 400
 Asn Arg Gly Gln Ser Ile Lys Leu Asn Pro Lys Ile Ile Asp Ser Ile
 405 410 415
 Pro Asp Lys Gly Leu Val Glu Lys Ile Val Lys Phe Cys Lys Ser Val
 420 425 430
 Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu Cys Ile Arg Val
 435 440 445
 Asn Asn Ser Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Ser Ser Tyr Asn Glu
 450 455 460
 Asn Asp Ile Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Thr Asn Leu Asn
 465 470 475 480
 Asn Asn Tyr Arg Asn Asn Leu Asp Glu Val Ile Leu Asp Tyr Asn Ser
 485 490 495
 Gln Thr Ile Pro Gln Ile Ser Asn Arg Thr Leu Asn Thr Leu Val Gln
 500 505 510
 Asp Asn Ser Tyr Val Pro Arg Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Glu Ile
 515 520 525
 Glu Glu Tyr Asp Val Val Asp Phe Asn Val Phe Phe Tyr Leu His Ala
 530 535 540
 Gln Lys Val Pro Glu Gly Glu Thr Asn Ile Ser Leu Thr Ser Ser Ile
 545 550 555 560
 Asp Thr Ala Leu Leu Glu Glu Ser Lys Asp Ile Phe Phe Ser Ser Glu
 565 570 575
 Phe Ile Asp Thr Ile Asn Lys Pro Val Asn Ala Ala Leu Phe Ile Asp
 580 585 590
 Trp Ile Ser Lys Val Ile Arg Asp Phe Thr Thr Glu Ala Thr Gln Lys

595	600	605	
Ser Thr Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Val			
610	615	620	
Gly Leu Ala Leu Asn Ile Ile Ile Glu Ala Glu Lys Gly Asn Phe Glu			
625	630	635	640
Glu Ala Phe Glu Leu Leu Gly Val Gly Ile Leu Leu Glu Phe Val Pro			
	645	650	655
Glu Leu Thr Ile Pro Val Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Tyr Ile			
	660	665	670
Asp Ser Tyr Glu Asn Lys Asn Lys Ala Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ser			
	675	680	685
Leu Ile Glu Arg Glu Ala Lys Trp Lys Glu Ile Tyr Ser Trp Ile Val			
690	695	700	
Ser Asn Trp Leu Thr Arg Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu			
705	710	715	720
Gln Met Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asp Ala Ile Lys Thr Ala			
	725	730	735
Ile Glu Tyr Lys Tyr Asn Asn Tyr Thr Ser Asp Glu Lys Asn Arg Leu			
	740	745	750
Glu Ser Glu Tyr Asn Ile Asn Asn Ile Glu Glu Glu Leu Asn Lys Lys			
755	760	765	
Val Ser Leu Ala Met Lys Asn Ile Glu Arg Phe Met Thr Glu Ser Ser			
770	775	780	
Ile Ser Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Ala Lys Val Gly Lys Leu			
785	790	795	800
Lys Lys Tyr Asp Asn His Val Lys Ser Asp Leu Leu Asn Tyr Ile Leu			
	805	810	815
Asp His Arg Ser Ile Leu Gly Glu Gln Thr Asn Glu Leu Ser Asp Leu			
820	825	830	
Val Thr Ser Thr Leu Asn Ser Ser Ile Pro Phe Glu Leu Ser Ser Tyr			
835	840	845	

Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Ile Tyr Phe Asn Arg Leu Tyr Lys Lys
 850 855 860
 Ile Lys Asp Ser Ser Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu Asn Asn Lys Phe
 865 870 875 880
 Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asn Val
 885 890 895
 Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Ser Arg
 900 905 910
 Leu Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile Ile Tyr Asn Ser
 915 920 925
 Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Lys His
 930 935 940
 Tyr Lys Pro Met Asn His Asn Arg Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met
 945 950 955 960
 Gly Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser Leu Arg Thr Val Arg Asp
 965 970 975
 Cys Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ser Gly Asn Lys Glu Asn
 980 985 990
 Leu Ile Phe Arg Tyr Glu Glu Leu Asn Arg Ile Ser Asn Tyr Ile Asn
 995 1000 1005
 Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Gly Asn Ser Arg
 1010 1015 1020
 Ile Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Ile Val Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu
 1025 1030 1035 1040
 Gly Asp Ile His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Gly Cys
 1045 1050 1055
 Asp Asp Glu Thr Tyr Val Gly Ile Arg Tyr Phe Lys Val Phe Asn Thr
 1060 1065 1070
 Glu Leu Asp Lys Thr Glu Ile Glu Thr Leu Tyr Ser Asn Glu Pro Asp
 1075 1080 1085
 Pro Ser Ile Leu Lys Asn Tyr Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asn Lys

1090 1095 1100
 Lys Tyr Tyr Leu Phe Asn Leu Leu Arg Lys Asp Lys Tyr Ile Thr Leu
 1105 1110 1115 1120
 Asn Ser Gly Ile Leu Asn Ile Asn Gln Gln Arg Gly Val Thr Glu Gly
 1125 1130 1135
 Ser Val Phe Leu Asn Tyr Lys Leu Tyr Glu Gly Val Glu Val Ile Ile

 1140 1145 1150
 Arg Lys Asn Gly Pro Ile Asp Ile Ser Asn Thr Asp Asn Phe Val Arg
 1155 1160 1165
 Lys Asn Asp Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val Asp Arg Gly Val Glu Tyr
 1170 1175 1180
 Arg Leu Tyr Ala Asp Thr Lys Ser Glu Lys Glu Lys Ile Ile Arg Thr
 1185 1190 1195 1200
 Ser Asn Leu Asn Asp Ser Leu Gly Gln Ile Ile Val Met Asp Ser Ile

 1205 1210 1215
 Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe Gln Asn Asn Asn Gly Ser Asn Ile
 1220 1225 1230
 Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Leu Val Ala Ser Ser Trp Tyr
 1235 1240 1245
 Tyr Asn Asn Ile Arg Arg Asn Thr Ser Ser Asn Gly Cys Phe Trp Ser
 1250 1255 1260
 Ser Ile Ser Lys Glu Asn Gly Trp Lys Glu
 1265 1270

<210> 19

<211> 1280

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum F2

<400> 19

Met Pro Val Val Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp
 1 5 10 15
 Glu Thr Ile Leu Tyr Met Gln Lys Pro Tyr Glu Glu Arg Ser Arg Lys
 20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Glu Ile Met Pro Asn Val Trp Ile Met Pro Glu
 35 40 45
 Arg Asp Thr Ile Gly Thr Lys Pro Asp Glu Phe Gln Val Pro Asp Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Thr Thr
 65 70 75 80
 Asp Ala Glu Lys Asp Arg Tyr Leu Lys Thr Met Ile Lys Leu Phe Asn
 85 90 95
 Arg Ile Asn Ser Asn Pro Thr Gly Lys Val Leu Leu Glu Glu Val Ser
 100 105 110
 Asn Ala Arg Pro Tyr Leu Gly Asp Asp Asp Thr Leu Ile Asn Glu Phe
 115 120 125
 Leu Pro Val Asn Val Thr Thr Ser Val Asn Ile Lys Phe Ser Thr Asp
 130 135 140
 Val Glu Ser Ser Ile Ile Ser Asn Leu Leu Val Leu Gly Ala Gly Pro
 145 150 155 160
 Asp Ile Phe Lys Ala Tyr Cys Thr Pro Leu Val Arg Phe Asn Lys Ser
 165 170 175
 Asp Lys Leu Ile Glu Pro Ser Asn His Gly Phe Gly Ser Ile Asn Ile
 180 185 190
 Leu Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Glu His Ile Phe Asn Asp Ile Ser Gly
 195 200 205
 Gly Asn His Asn Ser Thr Glu Ser Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ile Ser
 210 215 220
 Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala Lys
 225 230 235 240
 Ala Val Thr His Lys Glu Ser Leu Val Ala Glu Arg Gly Pro Leu Met
 245 250 255
 Ile Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly Gly
 260 265 270
 Glu Asp Leu Asn Ile Ile Pro Ser Ala Met Lys Glu Lys Ile Tyr Asn

275 280 285
 Asp Leu Leu Ala Asn Tyr Glu Lys Ile Ala Thr Arg Leu Arg Glu Val
 290 295 300
 Asn Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Asp Ile Asn Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe

 305 310 315 320
 Gln Trp Lys Tyr Gly Leu Asp Arg Asn Ala Asp Gly Ser Tyr Thr Val
 325 330 335
 Asn Arg Asn Lys Phe Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr
 340 345 350
 Glu Ile Asp Leu Ala Asn Lys Phe Lys Val Lys Cys Arg Asn Thr Tyr
 355 360 365
 Phe Ile Lys Tyr Gly Phe Val Lys Val Pro Asn Leu Leu Asp Asp Asp

 370 375 380
 Ile Tyr Thr Val Ser Glu Gly Phe Asn Ile Gly Asn Leu Ala Val Asn
 385 390 395 400
 Asn Arg Gly Gln Asn Ile Asn Leu Asn Pro Lys Ile Ile Asp Ser Ile
 405 410 415
 Pro Asp Lys Gly Leu Val Glu Lys Ile Ile Lys Phe Cys Lys Ser Ile
 420 425 430
 Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Gln Ser Pro Ser Leu Cys Ile Arg Val

 435 440 445
 Asn Asn Arg Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Ser Ser Tyr Asn Glu
 450 455 460
 Ser Asp Ile Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Thr Asn Leu Asn
 465 470 475 480
 Asn Asn Tyr Arg Asn Asn Leu Asp Glu Val Ile Leu Asp Tyr Asn Ser
 485 490 495
 Glu Thr Ile Pro Gln Ile Ser Asn Arg Thr Leu Asn Thr Leu Val Gln

 500 505 510
 Asp Asn Ser Tyr Val Pro Arg Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Glu Ile
 515 520 525

Glu Glu Tyr Asp Val Val Asp Phe Asn Val Phe Phe Tyr Leu His Ala
 530 535 540
 Gln Lys Val Pro Glu Gly Glu Thr Asn Ile Ser Leu Thr Ser Ser Ile
 545 550 555 560
 Asp Thr Ala Leu Leu Glu Glu Ser Lys Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser
 565 570 575
 Glu Phe Ile Asp Thr Ile Asn Lys Pro Val Asn Ala Ala Leu Phe Ile
 580 585 590
 Asp Trp Ile Ser Lys Val Ile Arg Asp Phe Thr Thr Glu Ala Thr Gln
 595 600 605
 Lys Ser Thr Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr
 610 615 620
 Val Gly Leu Ala Leu Asn Ile Val Ile Glu Ala Glu Lys Gly Asn Phe
 625 630 635 640
 Glu Glu Ala Phe Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Val
 645 650 655
 Pro Glu Leu Thr Ile Pro Val Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Tyr
 660 665 670
 Ile Asp Ser Tyr Glu Asn Lys Asn Lys Ala Ile Lys Ala Ile Asn Asn
 675 680 685
 Ser Leu Ile Glu Arg Glu Ala Lys Trp Lys Glu Ile Tyr Ser Trp Ile
 690 695 700
 Val Ser Asn Trp Leu Thr Arg Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys
 705 710 715 720
 Glu Gln Met Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asp Ala Ile Lys Thr
 725 730 735
 Ala Ile Glu Tyr Lys Tyr Asn Asn Tyr Thr Ser Asp Glu Lys Asn Arg
 740 745 750
 Leu Glu Ser Lys Tyr Asn Ile Asn Asn Ile Glu Glu Glu Leu Asn Lys
 755 760 765
 Lys Val Ser Leu Ala Met Lys Asn Ile Glu Arg Phe Met Thr Glu Ser

770 775 780
 Ser Ile Ser Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Ala Glu Val Gly Lys
 785 790 795 800
 Leu Lys Glu Tyr Asp Lys His Val Lys Ser Asp Leu Leu Asp Tyr Ile
 805 810 815
 Leu Tyr His Lys Leu Ile Leu Gly Glu Gln Thr Lys Glu Leu Ile Asp

 820 825 830
 Leu Val Thr Ser Thr Leu Asn Ser Ser Ile Pro Phe Glu Leu Ser Ser
 835 840 845
 Tyr Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Ile Tyr Phe Asn Arg Leu Tyr Lys
 850 855 860
 Lys Ile Lys Asp Ser Ser Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu Asn Asn Lys
 865 870 875 880
 Phe Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asn

 885 890 895
 Val Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Ser Gly
 900 905 910
 Arg Leu Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile Ile Tyr Asn
 915 920 925
 Ser Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Thr Ile Pro Lys
 930 935 940
 His Tyr Arg Pro Met Asn Arg Asn Arg Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys

 945 950 955 960
 Met Gly Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser Leu Arg Thr Ile Arg
 965 970 975
 Asp Cys Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ser Gly Asn Lys Glu
 980 985 990
 Lys Leu Ile Phe Arg Tyr Glu Glu Leu Ala Ser Ile Ser Asp Tyr Ile
 995 1000 1005
 Asn Lys Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Gly Asn Ser

 1010 1015 1020

Arg Ile Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Ile Val Glu Lys Ser Ile Ser Asn
 1025 1030 1035 1040

Leu Gly Asp Ile His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Gly
 1045 1050 1055

Cys Asp Asp Glu Thr Tyr Val Gly Ile Arg Tyr Phe Lys Val Phe Asn
 1060 1065 1070

Thr Glu Leu Asp Lys Thr Glu Ile Glu Thr Leu Tyr Ser Asn Glu Pro
 1075 1080 1085

Asp Pro Ser Ile Leu Lys Asp Tyr Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asn
 1090 1095 1100

Lys Lys Tyr Tyr Leu Phe Asn Leu Leu Arg Lys Asp Lys Tyr Ile Thr
 1105 1110 1115 1120

Arg Asn Ser Gly Ile Leu Asn Ile Asn Gln Gln Arg Gly Val Thr Gly
 1125 1130 1135

Gly Ile Ser Val Phe Leu Asn Tyr Lys Leu Tyr Glu Gly Val Glu Val
 1140 1145 1150

Ile Ile Arg Lys Asn Ala Pro Ile Asp Ile Ser Asn Thr Asp Asn Phe
 1155 1160 1165

Val Arg Lys Asn Asp Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val Asp His Gly Val
 1170 1175 1180

Glu Tyr Arg Leu Tyr Ala Asp Ile Ser Ile Thr Lys Ser Glu Lys Ile
 1185 1190 1195 1200

Ile Lys Leu Ile Arg Thr Ser Asn Pro Asn Asp Ser Leu Gly Gln Ile
 1205 1210 1215

Ile Val Met Asp Ser Ile Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe Gln Asn
 1220 1225 1230

Asn Asp Gly Ser Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asp Asp Leu
 1235 1240 1245

Val Ala Ser Ser Trp Tyr Tyr Asn His Ile Arg Arg Asn Thr Ser Ser
 1250 1255 1260

Asn Gly Cys Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His Gly Trp Lys Glu

1265 1270 1275 1280

<210> 20

<211> 1278

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum F3

<400> 20

Met Pro Val Val Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Leu Tyr Met Gln Ile Pro Tyr Glu Glu Lys Ser Lys Lys
 20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Glu Ile Met Arg Asn Val Trp Ile Ile Pro Glu
 35 40 45

Arg Asn Thr Ile Gly Thr Asp Pro Ser Asp Phe Asp Pro Pro Ala Ser
 50 55 60

Leu Glu Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Thr Thr
 65 70 75 80

Asp Ala Glu Lys Asp Arg Tyr Leu Lys Thr Thr Ile Lys Leu Phe Lys
 85 90 95

Arg Ile Asn Ser Asn Pro Ala Gly Glu Val Leu Leu Gln Glu Ile Ser
 100 105 110

Tyr Ala Lys Pro Tyr Leu Gly Asn Glu His Thr Pro Ile Asn Glu Phe
 115 120 125

His Pro Val Thr Arg Thr Thr Ser Val Asn Ile Lys Ser Ser Thr Asn
 130 135 140

Val Lys Ser Ser Ile Ile Leu Asn Leu Leu Val Leu Gly Ala Gly Pro
 145 150 155 160

Asp Ile Phe Glu Asn Ser Ser Tyr Pro Val Arg Lys Leu Met Asp Ser
 165 170 175

Gly Gly Val Tyr Asp Pro Ser Asn Asp Gly Phe Gly Ser Ile Asn Ile
 180 185 190

Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Glu Tyr Thr Phe Asn Asp Ile Ser Gly
 195 200 205

Gly Tyr Asn Ser Ser Thr Glu Ser Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ile Ser
 210 215 220

Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala Arg
 225 230 235 240

Gly Val Thr Tyr Lys Glu Thr Ile Lys Val Lys Gln Ala Pro Leu Met
 245 250 255

Ile Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly Gly
 260 265 270

Gln Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Met Lys Glu Lys Ile Tyr Asn
 275 280 285

Asn Leu Leu Ala Asn Tyr Glu Lys Ile Ala Thr Arg Leu Ser Arg Val
 290 295 300

Asn Ser Ala Pro Pro Glu Tyr Asp Ile Asn Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe
 305 310 315 320

Gln Trp Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asn Ala Asp Gly Ser Tyr Thr Val
 325 330 335

Asn Glu Asn Lys Phe Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr
 340 345 350

Glu Ile Asp Leu Ala Asn Lys Phe Lys Val Lys Cys Arg Asn Thr Tyr
 355 360 365

Phe Ile Lys Tyr Gly Phe Leu Lys Val Pro Asn Leu Leu Asp Asp Asp
 370 375 380

Ile Tyr Thr Val Ser Glu Gly Phe Asn Ile Gly Asn Leu Ala Val Asn
 385 390 395 400

Asn Arg Gly Gln Asn Ile Lys Leu Asn Pro Lys Ile Ile Asp Ser Ile
 405 410 415

Pro Asp Lys Gly Leu Val Glu Lys Ile Val Lys Phe Cys Lys Ser Val
 420 425 430

Ile Pro Arg Lys Gly Thr Lys Ala Pro Pro Arg Leu Cys Ile Arg Val
 435 440 445

Asn Asn Arg Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Ser Ser Tyr Asn Glu

450 455 460
 Asn Asp Ile Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Thr Asn Leu Asn
 465 470 475 480
 Asn Asn Tyr Arg Asn Asn Leu Asp Glu Val Ile Leu Asp Tyr Asn Ser
 485 490 495

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

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

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

 Ser Leu Met Glu Arg Glu Thr Lys Trp Lys Glu Ile Tyr Ser Trp Ile
 690 695 700

Val Ser Asn Trp Leu Thr Arg Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys
 705 710 715 720

Glu Gln Met Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asp Ala Ile Lys Thr
 725 730 735

Val Ile Glu Tyr Lys Tyr Asn Asn Tyr Thr Ser Asp Glu Arg Asn Arg
 740 745 750

Leu Glu Ser Glu Tyr Asn Ile Asn Asn Ile Arg Glu Glu Leu Asn Lys
 755 760 765

Lys Val Ser Leu Ala Met Glu Asn Ile Glu Arg Phe Ile Thr Glu Ser
 770 775 780

Ser Ile Phe Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Ala Lys Val Ser Lys
 785 790 795 800

Leu Arg Glu Tyr Asp Glu Gly Val Lys Glu Tyr Leu Leu Asp Tyr Ile
 805 810 815

Ser Glu His Arg Ser Ile Leu Gly Asn Ser Val Gln Glu Leu Asn Asp
 820 825 830

Leu Val Thr Ser Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Glu Leu Ser Ser
 835 840 845

Tyr Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile Leu Tyr Phe Asn Lys Leu Tyr Lys
 850 855 860

Lys Ile Lys Asp Asn Ser Ile Leu Asp Met Arg Tyr Glu Asn Asn Lys
 865 870 875 880

Phe Ile Asp Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asp
 885 890 895

Val Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Ser Ser
 900 905 910

Lys Pro Ser Glu Val Asn Ile Ala Gln Asn Asn Asp Ile Ile Tyr Asn
 915 920 925

Gly Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Lys
 930 935 940

Tyr Phe Asn Lys Val Asn Leu Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asp Cys

945 950 955 960
 Ile Arg Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys Ile Ser Leu Asn Tyr Asn Lys
 965 970 975
 Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Ala Gly Asn Asn Gln Lys Leu Val
 980 985 990
 Phe Asn Tyr Thr Gln Met Ile Ser Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp
 995 1000 1005

 Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Gly Asn Ser Arg Ile Tyr
 1010 1015 1020
 Ile Asn Gly Asn Leu Ile Asp Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu Gly Asp
 1025 1030 1035 1040
 Ile His Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Gly Cys Asn Asp
 1045 1050 1055
 Thr Arg Tyr Val Gly Ile Arg Tyr Phe Lys Val Phe Asp Thr Glu Leu
 1060 1065 1070

 Gly Lys Thr Glu Ile Glu Thr Leu Tyr Ser Asp Glu Pro Asp Pro Ser
 1075 1080 1085
 Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asn Lys Arg Tyr
 1090 1095 1100
 Tyr Leu Leu Asn Leu Leu Arg Thr Asp Lys Ser Ile Thr Gln Asn Ser
 1105 1110 1115 1120
 Asn Phe Leu Asn Ile Asn Gln Gln Arg Gly Val Tyr Gln Lys Pro Asn
 1125 1130 1135

 Ile Phe Ser Asn Thr Arg Leu Tyr Thr Gly Val Glu Val Ile Ile Arg
 1140 1145 1150
 Lys Asn Gly Ser Thr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Asn Phe Val Arg Lys
 1155 1160 1165
 Asn Asp Leu Ala Tyr Ile Asn Val Val Asp Arg Asp Val Glu Tyr Arg
 1170 1175 1180
 Leu Tyr Ala Asp Ile Ser Ile Ala Lys Pro Glu Lys Ile Ile Lys Leu
 1185 1190 1195 1200

Ile Arg Thr Ser Asn Ser Asn Asn Ser Leu Gly Gln Ile Ile Val Met
 1205 1210 1215
 Asp Ser Ile Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe Gln Asn Asn Asn Gly
 1220 1225 1230
 Gly Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Leu Val Ala Ser
 1235 1240 1245
 Ser Trp Tyr Tyr Asn Asn Ile Arg Lys Asn Thr Ser Ser Asn Gly Cys
 1250 1255 1260

Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His Gly Trp Gln Glu Asn
 1265 1270 1275

<210> 21

<211> 1297

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum G

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Identifty of amino acid is unknown

<400> 21

Met Pro Val Asn Ile Lys Xaa Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asn Asn
 1 5 10 15
 Asp Asp Ile Ile Met Met Glu Pro Phe Asn Asp Pro Gly Pro Gly Thr
 20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Arg Ile Ile Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu
 35 40 45

Arg Phe Thr Tyr Gly Phe Gln Pro Asp Gln Phe Asn Ala Ser Thr Gly
 50 55 60

Val Phe Ser Lys Asp Val Tyr Glu Tyr Tyr Asp Pro Thr Tyr Leu Lys
 65 70 75 80

Thr Asp Ala Glu Lys Asp Lys Phe Leu Lys Thr Met Ile Lys Leu Phe
 85 90 95

Asn Arg Ile Asn Ser Lys Pro Ser Gly Gln Arg Leu Leu Asp Met Ile

100 105 110
 Val Asp Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ala Ser Thr Pro Pro Asp Lys
 115 120 125
 Phe Ala Ala Asn Val Ala Asn Val Ser Ile Asn Lys Lys Ile Ile Gln
 130 135 140
 Pro Gly Ala Glu Asp Gln Ile Lys Gly Leu Met Thr Asn Leu Ile Ile
 145 150 155 160

 Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Ser Asp Asn Phe Thr Asp Ser Met Ile
 165 170 175
 Met Asn Gly His Ser Pro Ile Ser Glu Gly Phe Gly Ala Arg Met Met
 180 185 190
 Ile Arg Phe Cys Pro Ser Cys Leu Asn Val Phe Asn Asn Val Gln Glu
 195 200 205
 Asn Lys Asp Thr Ser Ile Phe Ser Arg Arg Ala Tyr Phe Ala Asp Pro
 210 215 220

 Ala Leu Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Gly Ile Lys Ile Ser Asn Leu Pro Ile Thr Pro Asn Thr Lys Glu Phe
 245 250 255
 Phe Met Gln His Ser Asp Pro Val Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
 260 265 270
 Gly Gly His Asp Pro Ser Val Ile Ser Pro Ser Thr Asp Met Asn Ile
 275 280 285

 Tyr Asn Lys Ala Leu Gln Asn Phe Gln Asp Ile Ala Asn Arg Leu Asn
 290 295 300
 Ile Val Ser Ser Ala Gln Gly Ser Gly Ile Asp Ile Ser Leu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Gln Ile Tyr Lys Asn Lys Tyr Asp Phe Val Glu Asp Pro Asn Gly Lys
 325 330 335
 Tyr Ser Val Asp Lys Asp Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Leu Met
 340 345 350

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

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

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

 Tyr Leu His Ala Gln Thr Phe Pro Ser Asn Ile Glu Asn Leu Gln Leu
 545 550 555 560
 Thr Asn Ser Leu Asn Asp Ala Leu Arg Asn Asn Asn Lys Val Tyr Thr
 565 570 575
 Phe Phe Ser Thr Asn Leu Val Glu Lys Ala Asn Thr Val Val Gly Ala
 580 585 590
 Ser Leu Phe Val Asn Trp Val Lys Gly Val Ile Asp Asp Phe Thr Ser

595	600	605	
Glu Ser Thr Gln Lys Ser Thr Ile Asp Lys Val Ser Asp Val Ser Ile			
610	615	620	
Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala			
625	630	635	640
Lys Glu Asn Phe Lys Asn Ala Phe Glu Ile Gly Gly Ala Ala Ile Leu			
645	650	655	
Met Glu Phe Ile Pro Glu Leu Ile Val Pro Ile Val Gly Phe Phe Thr			
660	665	670	
Leu Glu Ser Tyr Val Gly Asn Lys Gly His Ile Ile Met Thr Ile Ser			
675	680	685	
Asn Ala Leu Lys Lys Arg Asp Gln Lys Trp Thr Asp Met Tyr Gly Leu			
690	695	700	
Ile Val Ser Gln Trp Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile			
705	710	715	720
Lys Glu Arg Met Tyr Asn Ala Leu Asn Asn Gln Ser Gln Ala Ile Glu			
725	730	735	
Lys Ile Ile Glu Asp Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Glu Glu Asp Lys Met			
740	745	750	
Asn Ile Asn Ile Asp Phe Asn Asp Ile Asp Phe Lys Leu Asn Gln Ser			
755	760	765	
Ile Asn Leu Ala Ile Asn Asn Ile Asp Asp Phe Ile Asn Gln Cys Ser			
770	775	780	
Ile Ser Tyr Leu Met Asn Arg Met Ile Pro Leu Ala Val Lys Lys Leu			
785	790	795	800
Lys Asp Phe Asp Asp Asn Leu Lys Arg Asp Leu Leu Glu Tyr Ile Asp			
805	810	815	
Thr Asn Glu Leu Tyr Leu Leu Asp Glu Val Asn Ile Leu Lys Ser Lys			
820	825	830	
Val Asn Arg His Leu Lys Asp Ser Ile Pro Phe Asp Leu Ser Leu Tyr			
835	840	845	

Thr Lys Asp Thr Ile Leu Ile Gln Val Phe Asn Asn Tyr Ile Ser Asn
 850 855 860

Ile Ser Ser Asn Ala Ile Leu Ser Leu Ser Tyr Arg Gly Gly Arg Leu
 865 870 875 880

Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Gly Ala Thr Met Asn Val Gly Ser Asp Val
 885 890 895

Ile Phe Asn Asp Ile Gly Asn Gly Gln Phe Lys Leu Asn Asn Ser Glu
 900 905 910

Asn Ser Asn Ile Thr Ala His Gln Ser Lys Phe Val Val Tyr Asp Ser
 915 920 925

Met Phe Asp Asn Phe Ser Ile Asn Phe Trp Val Arg Thr Pro Lys Tyr
 930 935 940

Asn Asn Asn Asp Ile Gln Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Tyr Thr Ile Ile
 945 950 955 960

Ser Cys Ile Lys Asn Asp Ser Gly Trp Lys Val Ser Ile Lys Gly Asn
 965 970 975

Arg Ile Ile Trp Thr Leu Ile Asp Val Asn Ala Lys Ser Lys Ser Ile
 980 985 990

Phe Phe Glu Tyr Ser Ile Lys Asp Asn Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys
 995 1000 1005

Trp Phe Ser Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asn Ala Asn Ile
 1010 1015 1020

Tyr Ile Asn Gly Ser Leu Lys Lys Ser Glu Lys Ile Leu Asn Leu Asp
 1025 1030 1035 1040

Arg Ile Asn Ser Ser Asn Asp Ile Asp Phe Lys Leu Ile Asn Cys Thr
 1045 1050 1055

Asp Thr Thr Lys Phe Val Trp Ile Lys Asp Phe Asn Ile Phe Gly Arg
 1060 1065 1070

Glu Leu Asn Ala Thr Glu Val Ser Ser Leu Tyr Trp Ile Gln Ser Ser
 1075 1080 1085

Thr Asn Thr Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr

1090 1095 1100
 Gln Tyr Tyr Leu Phe Asn Gln Gly Met Gln Asn Ile Tyr Ile Lys Tyr
 1105 1110 1115 1120

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

Ser Tyr Arg Val Tyr Val Leu Val Asn Ser Lys Glu Ile Gln Thr Gln
 1185 1190 1195 1200
 Leu Phe Leu Ala Pro Ile Asn Asp Asp Pro Thr Phe Tyr Asp Val Leu
 1205 1210 1215
 Gln Ile Lys Lys Tyr Tyr Glu Lys Thr Thr Tyr Asn Cys Gln Ile Leu
 1220 1225 1230
 Cys Glu Lys Asp Thr Lys Thr Phe Gly Leu Phe Gly Ile Gly Lys Phe
 1235 1240 1245

Val Lys Asp Tyr Gly Tyr Val Trp Asp Thr Tyr Asp Asn Tyr Phe Cys
 1250 1255 1260
 Ile Ser Gln Trp Tyr Leu Arg Arg Ile Ser Glu Asn Ile Asn Lys Leu
 1265 1270 1275 1280
 Arg Leu Gly Cys Asn Trp Gln Phe Ile Pro Val Asp Glu Gly Trp Thr
 1285 1290 1295

Glu

<210> 22

<211> 1315

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 22

Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asn
 1 5 10 15
 Asp Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly Leu Asp Ile
 20 25 30
 Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu
 35 40 45
 Arg Tyr Glu Phe Gly Thr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Pro Pro Ser Ser
 50 55 60
 Leu Ile Glu Gly Ala Ser Glu Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Arg Thr
 65 70 75 80
 Asp Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu Gln Thr Met Val Lys Leu Phe Asn
 85 90 95
 Arg Ile Lys Asn Asn Val Ala Gly Glu Ala Leu Leu Asp Lys Ile Ile
 100 105 110
 Asn Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Phe
 115 120 125
 Asp Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Phe Asn Leu Leu Glu Gln Asp Pro
 130 135 140
 Ser Gly Ala Thr Thr Lys Ser Ala Met Leu Thr Asn Leu Ile Ile Phe
 145 150 155 160
 Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Lys Asn Glu Val Arg Gly Ile Val Leu
 165 170 175
 Arg Val Asp Asn Lys Asn Tyr Phe Pro Cys Arg Asp Gly Phe Gly Ser
 180 185 190
 Ile Met Gln Met Ala Phe Cys Pro Glu Tyr Val Pro Thr Phe Asp Asn
 195 200 205
 Val Ile Glu Asn Ile Thr Ser Leu Thr Ile Gly Lys Ser Lys Tyr Phe
 210 215 220
 Gln Asp Pro Ala Leu Leu Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His
 225 230 235 240
 Gly Leu Tyr Gly Met Gln Val Ser Ser His Glu Ile Ile Pro Ser Lys

245 250 255
 Gln Glu Ile Tyr Met Gln His Thr Tyr Pro Ile Ser Ala Glu Glu Leu

260 265 270
 Phe Thr Phe Gly Gly Gln Asp Ala Asn Leu Ile Ser Ile Asp Ile Lys

275 280 285
 Asn Asp Leu Tyr Glu Lys Thr Leu Asn Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Asn
 290 295 300

Lys Leu Ser Gln Val Thr Ser Cys Asn Asp Pro Asn Ile Asp Ile Asp
 305 310 315 320
 Ser Tyr Lys Gln Ile Tyr Gln Gln Lys Tyr Gln Phe Asp Lys Asp Ser

325 330 335
 Asn Gly Gln Tyr Ile Val Asn Glu Asp Lys Phe Gln Ile Leu Tyr Asn

340 345 350
 Ser Ile Met Tyr Gly Phe Thr Glu Ile Glu Leu Gly Lys Lys Phe Asn
 355 360 365

Ile Lys Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Ser Met Asn His Asp Pro Val Lys
 370 375 380
 Ile Pro Asn Leu Leu Asp Asp Thr Ile Tyr Asn Asp Thr Glu Gly Phe

385 390 395 400
 Asn Ile Glu Ser Lys Asp Leu Lys Ser Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Met
 405 410 415

Arg Val Asn Thr Asn Ala Phe Arg Asn Val Asp Gly Ser Gly Leu Val
 420 425 430
 Ser Lys Leu Ile Gly Leu Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile

435 440 445
 Arg Glu Asn Leu Tyr Asn Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly

450 455 460
 Glu Leu Cys Ile Lys Ile Lys Asn Glu Asp Leu Thr Phe Ile Ala Glu

465 470 475 480
 Lys Asn Ser Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gln Asp Glu Ile Val Ser Tyr
 485 490 495

Asn Thr Lys Asn Lys Pro Leu Asn Phe Asn Tyr Ser Leu Asp Lys Ile
 500 505 510
 Ile Val Asp Tyr Asn Leu Gln Ser Lys Ile Thr Leu Pro Asn Asp Arg
 515 520 525
 Thr Thr Pro Val Thr Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Pro Glu Tyr Lys Ser
 530 535 540
 Asn Ala Ala Ser Thr Ile Glu Ile His Asn Ile Asp Asp Asn Thr Ile
 545 550 555 560
 Tyr Gln Tyr Leu Tyr Ala Gln Lys Ser Pro Thr Thr Leu Gln Arg Ile
 565 570 575
 Thr Met Thr Asn Ser Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile
 580 585 590
 Tyr Ser Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser Lys Val Asn Gln Gly Ala Gln
 595 600 605
 Gly Ile Leu Phe Leu Gln Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr
 610 615 620
 Asn Glu Ser Ser Gln Lys Thr Thr Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser
 625 630 635 640
 Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Val Lys Gln Gly
 645 650 655
 Tyr Glu Gly Asn Phe Ile Gly Ala Leu Glu Thr Thr Gly Val Val Leu
 660 665 670
 Leu Leu Glu Tyr Ile Pro Glu Ile Thr Leu Pro Val Ile Ala Ala Leu
 675 680 685
 Ser Ile Ala Glu Ser Ser Thr Gln Lys Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile
 690 695 700
 Asp Asn Phe Leu Glu Lys Arg Tyr Glu Lys Trp Ile Glu Val Tyr Lys
 705 710 715 720
 Leu Val Lys Ala Lys Trp Leu Gly Thr Val Asn Thr Gln Phe Gln Lys
 725 730 735
 Arg Ser Tyr Gln Met Tyr Arg Ser Leu Glu Tyr Gln Val Asp Ala Ile

740	745	750	
Lys Lys Ile Ile Asp Tyr Glu Tyr Lys Ile Tyr Ser Gly Pro Asp Lys			
755	760	765	
Glu Gln Ile Ala Asp Glu Ile Asn Asn Leu Lys Asn Lys Leu Glu Glu			
770	775	780	
Lys Ala Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Ile Phe Met Arg Glu Ser			
785	790	795	800
Ser Arg Ser Phe Leu Val Asn Gln Met Ile Asn Glu Ala Lys Lys Gln			
805	810	815	
Leu Leu Glu Phe Asp Thr Gln Ser Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile			
820	825	830	
Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu			
835	840	845	
Ser Lys Ile Asn Lys Val Phe Ser Thr Pro Ile Pro Phe Ser Tyr Ser			
850	855	860	
Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile			
865	870	875	880
Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile			
885	890	895	
Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala			
900	905	910	
Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn			
915	920	925	
Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn			
930	935	940	
Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys			
945	950	955	960
Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile			
965	970	975	
Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser			
980	985	990	

Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala
 995 1000 1005

Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn
 1010 1015 1020

Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg
 1025 1030 1035 1040

Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met Gly Ser Ala
 1045 1050 1055

Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu
 1060 1065 1070

Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Asn Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys
 1075 1080 1085

Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn Pro Lys Glu Ile Glu Lys Leu
 1090 1095 1100

Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn
 1105 1110 1115 1120

Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser
 1125 1130 1135

Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr
 1140 1145 1150

Asn Ala Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg
 1155 1160 1165

Leu Tyr Asn Gly Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn
 1170 1175 1180

Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val
 1185 1190 1195 1200

Ser Tyr Asn Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn
 1205 1210 1215

Ala Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro
 1220 1225 1230

Gly Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu

1235 1240 1245
 Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala Ser
 1250 1255 1260
 Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp Pro Asn
 1265 1270 1275 1280
 Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His Leu Lys Asp

 1285 1290 1295
 Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr Asp Glu Gly Trp
 1300 1305 1310
 Thr Asn Asp
 1315
 <210> 23
 <211> 1268
 <212> PRT
 <213> Clostridium baratii
 <400> 23
 Met Pro Val Asn Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asn Asn
 1 5 10 15
 Thr Thr Ile Leu Tyr Met Lys Met Pro Tyr Tyr Glu Asp Ser Asn Lys
 20 25 30

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

 Arg Ile Asn Ser Asn Pro Ala Gly Gln Val Leu Leu Glu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Asn Gly Lys Pro Tyr Leu Gly Asn Asp His Thr Ala Val Asn Glu Phe
 115 120 125

Cys Ala Asn Asn Arg Ser Thr Ser Val Glu Ile Lys Glu Ser Asn Gly
 130 135 140
 Thr Thr Asp Ser Met Leu Leu Asn Leu Val Ile Leu Gly Pro Gly Pro
 145 150 155 160

 Asn Ile Leu Glu Cys Ser Thr Phe Pro Val Arg Ile Phe Pro Asn Asn
 165 170 175
 Ile Ala Tyr Asp Pro Ser Glu Lys Gly Phe Gly Ser Ile Gln Leu Met
 180 185 190
 Ser Phe Ser Thr Glu Tyr Glu Tyr Ala Phe Asn Asp Asn Thr Asp Leu
 195 200 205
 Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ile Ser Leu Ala His Glu Leu Ile His Val
 210 215 220

 Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala Lys Gly Val Thr Asn Lys Lys Val Ile
 225 230 235 240
 Glu Val Asp Gln Gly Ala Leu Met Ala Ala Glu Lys Asp Ile Lys Ile
 245 250 255
 Glu Glu Phe Ile Thr Phe Gly Gly Gln Asp Leu Asn Ile Ile Thr Asn
 260 265 270
 Ser Thr Asn Gln Lys Ile Tyr Val Ile Leu Leu Ser Asn Tyr Thr Ala
 275 280 285

 Ile Ala Ser Arg Leu Ser Gln Val Asn Arg Asn Asn Ser Ala Leu Asn
 290 295 300
 Thr Thr Tyr Tyr Lys Asn Phe Phe Gln Trp Lys Tyr Gly Leu Asp Gln
 305 310 315 320
 Asp Ser Asn Gly Asn Tyr Thr Val Asn Ile Ser Lys Phe Asn Ala Ile
 325 330 335
 Tyr Lys Lys Leu Phe Ser Phe Thr Glu Cys Asp Leu Ala Gln Lys Phe
 340 345 350

 Gln Val Lys Asn Arg Ser Asn Tyr Leu Phe His Phe Lys Pro Phe Arg
 355 360 365
 Leu Leu Asp Leu Leu Asp Asp Asn Ile Tyr Ser Ile Ser Glu Gly Phe

370	375	380	
Asn Ile Gly Ser Leu Arg Val Asn Asn Asn Gly Gln Asn Ile Asn Leu			
385	390	395	400
Asn Ser Arg Ile Val Gly Pro Ile Pro Asp Asn Gly Leu Val Glu Arg			
	405	410	415
Phe Val Gly Leu Cys Lys Ser Ile Val Ser Lys Lys Gly Thr Lys Asn			
	420	425	430
Ser Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Arg Asp Leu Phe Phe Val Ala Ser			
	435	440	445
Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Asn Gly Ile Asn Ser Pro Lys Glu Ile Asp			
	450	455	460
Asp Thr Thr Ile Thr Asn Asn Asn Tyr Lys Lys Asn Leu Asp Glu Val			
465	470	475	480
Ile Leu Asp Tyr Asn Ser Asp Ala Ile Pro Asn Leu Ser Ser Arg Leu			
	485	490	495
Leu Asn Thr Thr Ala Gln Asn Asp Ser Tyr Val Pro Lys Tyr Asp Ser			
	500	505	510
Asn Gly Thr Ser Glu Ile Lys Glu Tyr Thr Val Asp Lys Leu Asn Val			
	515	520	525
Phe Phe Tyr Leu Tyr Ala Gln Lys Ala Pro Glu Gly Glu Ser Ala Ile			
530	535	540	
Ser Leu Thr Ser Ser Val Asn Thr Ala Leu Leu Asp Ala Ser Lys Val			
545	550	555	560
Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Phe Ile Asn Thr Val Asn Lys Pro Val			
	565	570	575
Gln Ala Ala Leu Phe Ile Ser Trp Ile Gln Gln Val Ile Asn Asp Phe			
	580	585	590
Thr Thr Glu Ala Thr Gln Lys Ser Thr Ile Asp Lys Ile Ala Asp Ile			
	595	600	605
Ser Leu Ile Val Pro Tyr Val Gly Leu Ala Leu Asn Ile Gly Asn Glu			
610	615	620	

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

 Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Arg Glu Arg Glu Leu Lys Trp Lys
 675 680 685
 Glu Val Tyr Ser Trp Ile Val Ser Asn Trp Leu Thr Arg Ile Asn Thr
 690 695 700
 Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln
 705 710 715 720
 Val Asp Gly Ile Lys Lys Ile Ile Glu Tyr Lys Tyr Asn Asn Tyr Thr
 725 730 735

 Leu Asp Glu Lys Asn Arg Leu Arg Ala Glu Tyr Asn Ile Tyr Ser Ile
 740 745 750
 Lys Glu Glu Leu Asn Lys Lys Val Ser Leu Ala Met Gln Asn Ile Asp
 755 760 765
 Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn
 770 775 780
 Glu Ala Lys Ile Asn Lys Leu Ser Glu Tyr Asp Lys Arg Val Asn Gln
 785 790 795 800

 Tyr Leu Leu Asn Tyr Ile Leu Glu Asn Ser Ser Thr Leu Gly Thr Ser
 805 810 815
 Ser Val Pro Glu Leu Asn Asn Leu Val Ser Asn Thr Leu Asn Asn Ser
 820 825 830
 Ile Pro Phe Glu Leu Ser Glu Tyr Thr Asn Asp Lys Ile Leu Ile His
 835 840 845
 Ile Leu Ile Arg Phe Tyr Lys Arg Ile Ile Asp Ser Ser Ile Leu Asn
 850 855 860

 Met Lys Tyr Glu Asn Asn Arg Phe Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Gly Ser

865 870 875 880
 Asn Ile Ser Ile Asn Gly Asp Ile Tyr Ile Tyr Ser Thr Asn Arg Asn
 885 890 895
 Gln Phe Gly Ile Tyr Ser Ser Arg Leu Ser Glu Val Asn Ile Thr Gln
 900 905 910
 Asn Asn Thr Ile Ile Tyr Asn Ser Arg Tyr Gln Asn Phe Ser Val Ser
 915 920 925

 Phe Trp Val Arg Ile Pro Lys Tyr Asn Asn Leu Lys Asn Leu Asn Asn
 930 935 940
 Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg Asn Asn Asn Ser Gly Trp Lys
 945 950 955 960
 Ile Ser Leu Asn Tyr Asn Asn Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Thr
 965 970 975
 Gly Asn Asn Gln Lys Leu Val Phe Asn Tyr Thr Gln Met Ile Asp Ile
 980 985 990

 Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Thr Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg
 995 1000 1005
 Leu Gly His Ser Lys Leu Tyr Ile Asn Gly Asn Leu Thr Asp Gln Lys
 1010 1015 1020
 Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile His Val Asp Asp Asn Ile Leu Phe
 1025 1030 1035 1040
 Lys Ile Val Gly Cys Asn Asp Thr Arg Tyr Val Gly Ile Arg Tyr Phe
 1045 1050 1055

 Lys Ile Phe Asn Met Glu Leu Asp Lys Thr Glu Ile Glu Thr Leu Tyr
 1060 1065 1070
 His Ser Glu Pro Asp Ser Thr Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr
 1075 1080 1085
 Leu Leu Tyr Asn Lys Lys Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Leu Lys Pro Asn
 1090 1095 1100
 Met Ser Val Thr Lys Asn Ser Asp Ile Leu Asn Ile Asn Arg Gln Arg
 1105 1110 1115 1120

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

Val Glu Lys Thr Ile Lys Leu Arg Arg Ile Ser Asn Ser Asn Tyr Asn
 1185 1190 1195 1200
 Ser Asn Gln Met Ile Ile Met Asp Ser Ile Gly Asp Asn Cys Thr Met
 1205 1210 1215
 Asn Phe Lys Thr Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly Leu Leu Gly Phe His
 1220 1225 1230
 Leu Asn Asn Leu Val Ala Ser Ser Trp Tyr Tyr Lys Asn Ile Arg Asn
 1235 1240 1245

Asn Thr Arg Asn Asn Gly Cys Phe Trp Ser Phe Ile Ser Lys Glu His
 1250 1255 1260

Gly Trp Gln Glu
 1265

<210> 24

<211> 1251

<212> PRT

<213> Clostridium butyricum 1

<400> 24

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

Phe Asn Ile Met Lys Asn Ile Trp Ile Ile Pro Glu Arg Asn Val Ile
 35 40 45

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

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

 Asn Leu Ser Gly Arg Ile Leu Leu Glu Glu Leu Ser Lys Ala Asn Pro
 100 105 110
 Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Gly Asp Phe Ile Ile Asn Asp
 115 120 125
 Ala Ser Ala Val Pro Ile Gln Phe Ser Asn Gly Ser Gln Ser Ile Leu
 130 135 140
 Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr
 145 150 155 160

 Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His
 165 170 175
 Gly Phe Gly Ser Ile Ala Ile Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Ser Phe
 180 185 190
 Arg Phe Lys Asp Asn Ser Met Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu
 195 200 205
 Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala
 210 215 220

 Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu
 225 230 235 240
 Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly
 245 250 255
 Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr
 260 265 270
 Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys
 275 280 285

 Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu
 290 295 300

Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn
 305 310 315 320

Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu
 325 330 335

Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile
 340 345 350

Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile
 355 360 365

Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe
 370 375 380

Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr
 385 390 395 400

Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val
 405 410 415

Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly
 420 425 430

Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile
 435 440 445

Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Val Thr Ser Asn Asn Asn Tyr
 450 455 460

Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala
 465 470 475 480

Pro Gly Leu Ser Asp Glu Lys Leu Asn Leu Thr Ile Gln Asn Asp Ala
 485 490 495

Tyr Ile Pro Lys Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Asp Ile Glu Gln His
 500 505 510

Asp Val Asn Glu Leu Asn Val Phe Phe Tyr Leu Asp Ala Gln Lys Val
 515 520 525

Pro Glu Gly Glu Asn Asn Val Asn Leu Thr Ser Ser Ile Asp Thr Ala
 530 535 540

Leu Leu Glu Gln Pro Lys Ile Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Glu Phe Ile

545 550 555 560
 Asn Asn Val Asn Lys Pro Val Gln Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp Ile
 565 570 575
 Gln Gln Val Leu Val Asp Phe Thr Thr Glu Ala Asn Gln Lys Ser Thr
 580 585 590
 Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Ile Val Val Pro Tyr Ile Gly Leu
 595 600 605

 Ala Leu Asn Ile Gly Asn Glu Ala Gln Lys Gly Asn Phe Lys Asp Ala
 610 615 620
 Leu Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Glu Pro Glu Leu
 625 630 635 640
 Leu Ile Pro Thr Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Phe Leu Gly Ser
 645 650 655
 Ser Asp Asn Lys Asn Lys Val Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Lys
 660 665 670

 Glu Arg Asp Glu Lys Trp Lys Glu Val Tyr Ser Phe Ile Val Ser Asn
 675 680 685
 Trp Met Thr Lys Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met
 690 695 700
 Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asn Ala Leu Lys Ala Ile Ile Glu
 705 710 715 720
 Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Leu Glu Glu Lys Asn Glu Leu Thr Asn
 725 730 735

 Lys Tyr Asp Ile Glu Gln Ile Glu Asn Glu Leu Asn Gln Lys Val Ser
 740 745 750
 Ile Ala Met Asn Asn Ile Asp Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser
 755 760 765
 Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu
 770 775 780
 Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asp Tyr Ile Ile Lys His
 785 790 795 800

Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Ile
 805 810 815

Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp
 820 825 830

Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys
 835 840 845

Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp
 850 855 860

Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Asp Val Tyr Lys
 865 870 875 880

Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Gly Ile Tyr Asn Asp Lys Leu Ser
 885 890 895

Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr
 900 905 910

Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn
 915 920 925

Lys Ile Val Asn Val Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg
 930 935 940

Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile
 945 950 955 960

Trp Thr Leu Gln Asp Asn Ser Gly Ile Asn Gln Lys Leu Ala Phe Asn
 965 970 975

Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe
 980 985 990

Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn
 995 1000 1005

Gly Asn Leu Ile Asp Lys Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile His
 1010 1015 1020

Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Asn Cys Ser Tyr Thr Arg
 1025 1030 1035 1040

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

1045 1050 1055

Thr Glu Ile Gln Thr Leu Tyr Asn Asn Glu Pro Asn Ala Asn Ile Leu

 1060 1065 1070

Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Leu

 1075 1080 1085

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

 1090 1095 1100

Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ile Arg Ser Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg

1105 1110 1115 1120

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

 1125 1130 1135

Thr Asn Asp Asn Leu Val Arg Lys Asn Asp Gln Val Tyr Ile Asn Phe

 1140 1145 1150

Val Ala Ser Lys Thr His Leu Leu Pro Leu Tyr Ala Asp Thr Ala Thr

 1155 1160 1165

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

 1170 1175 1180

Asn Gln Val Val Val Met Asn Ser Val Gly Asn Cys Thr Met Asn Phe

1185 1190 1195 1200

Lys Asn Asn Asn Gly Asn Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe Lys Ala Asp

 1205 1210 1215

Thr Val Val Ala Ser Thr Trp Tyr Tyr Thr His Met Arg Asp Asn Thr

 1220 1225 1230

Asn Ser Asn Gly Phe Phe Trp Asn Phe Ile Ser Glu Glu His Gly Trp

 1235 1240 1245

Gln Glu Lys

 1250

<210> 25

<211> 1251

<212> PRT

<213> Clostridium butyricum 2

<400> 25

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

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

 115 120 125
 Ala Ser Ala Val Glu Ile Lys Phe Ser Asn Gly Ser Gln Asp Ile Leu
 130 135 140
 Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr
 145 150 155 160
 Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His
 165 170 175
 Gly Phe Gly Ser Ile Ala Ile Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Ser Phe

 180 185 190
 Arg Phe Asn Asp Asn Ser Met Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu
 195 200 205
 Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala
 210 215 220
 Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu
 225 230 235 240

Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly
 245 250 255
 Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr
 260 265 270
 Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys
 275 280 285
 Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu
 290 295 300
 Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn
 305 310 315 320
 Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu
 325 330 335
 Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile
 340 345 350
 Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile
 355 360 365
 Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe
 370 375 380
 Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr
 385 390 395 400
 Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val
 405 410 415
 Ser Val Lys Gly Ile Arg Lys Ser Ile Cys Ile Glu Ile Asn Asn Gly
 420 425 430
 Glu Leu Phe Phe Val Ala Ser Glu Asn Ser Tyr Asn Asp Asp Asn Ile
 435 440 445
 Asn Thr Pro Lys Glu Ile Asp Asp Thr Val Thr Ser Asn Asn Asn Tyr
 450 455 460
 Glu Asn Asp Leu Asp Gln Val Ile Leu Asn Phe Asn Ser Glu Ser Ala
 465 470 475 480
 Pro Gly Leu Ser Asp Glu Lys Leu Asn Leu Thr Ile Gln Asn Asp Ala

485 490 495
 Tyr Ile Pro Lys Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Ser Asp Ile Glu Gln His

500 505 510
 Asp Val Asn Glu Leu Asn Val Phe Phe Tyr Leu Asp Ala Gln Lys Val

515 520 525
 Pro Glu Gly Glu Asn Asn Val Asn Leu Thr Ser Ser Ile Asp Thr Ala

530 535 540
 Leu Leu Glu Gln Pro Lys Ile Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Glu Phe Ile

545 550 555 560
 Asn Asn Val Asn Lys Pro Val Gln Ala Ala Leu Phe Val Ser Trp Ile

565 570 575
 Gln Gln Val Leu Val Asp Phe Thr Thr Glu Ala Asn Gln Lys Ser Thr

580 585 590
 Val Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Ile Val Val Pro Tyr Ile Gly Leu

595 600 605
 Ala Leu Asn Ile Gly Asn Glu Ala Gln Lys Gly Asn Phe Lys Asp Ala

610 615 620
 Leu Glu Leu Leu Gly Ala Gly Ile Leu Leu Glu Phe Val Pro Glu Leu

625 630 635 640
 Leu Ile Pro Thr Ile Leu Val Phe Thr Ile Lys Ser Phe Leu Gly Ser

645 650 655
 Ser Asp Asn Lys Asn Lys Val Ile Lys Ala Ile Asn Asn Ala Leu Lys

660 665 670
 Glu Arg Asp Glu Lys Trp Lys Glu Val Tyr Ser Phe Ile Val Ser Asn

675 680 685
 Trp Met Thr Lys Ile Asn Thr Gln Phe Asn Lys Arg Lys Glu Gln Met

690 695 700
 Tyr Gln Ala Leu Gln Asn Gln Val Asn Ala Leu Lys Thr Ile Ile Glu

705 710 715 720
 Phe Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Leu Glu Glu Lys Lys Glu Leu Lys Asn

725 730 735

Asn Tyr Asp Ile Glu Gln Ile Glu Asn Glu Leu Asn Gln Lys Val Ser
 740 745 750
 Ile Ala Met Asn Asn Ile Asp Arg Phe Leu Thr Glu Ser Ser Ile Ser
 755 760 765
 Tyr Leu Met Lys Leu Ile Asn Glu Val Lys Ile Asn Lys Leu Arg Glu
 770 775 780
 Tyr Asp Glu Asn Val Lys Thr Tyr Leu Leu Asp Tyr Ile Ile Gln His
 785 790 795 800
 Gly Ser Ile Leu Gly Glu Ser Gln Gln Glu Leu Asn Ser Met Val Ile
 805 810 815
 Asp Thr Leu Asn Asn Ser Ile Pro Phe Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Asp
 820 825 830
 Asp Lys Ile Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Lys Phe Phe Lys Arg Ile Lys
 835 840 845
 Ser Ser Ser Val Leu Asn Met Arg Tyr Lys Asn Asp Lys Tyr Val Asp
 850 855 860
 Thr Ser Gly Tyr Asp Ser Asn Ile Asn Ile Asn Gly Glu Ile Phe Ile
 865 870 875 880
 Tyr Pro Thr Asn Lys Asn Gln Phe Thr Ile Phe Asn Ser Lys Pro Ser
 885 890 895
 Glu Val Asn Ile Ser Gln Asn Asp Tyr Ile Ile Tyr Asp Asn Lys Tyr
 900 905 910
 Lys Asn Phe Ser Ile Ser Phe Trp Val Arg Ile Pro Asn Tyr Asp Asn
 915 920 925
 Lys Ile Val Asn Ile Asn Asn Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Arg
 930 935 940
 Asp Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu Asn His Asn Glu Ile Ile
 945 950 955 960
 Trp Thr Leu Gln Asp Asn Ala Arg Ile Asn Gln Lys Leu Val Phe Lys
 965 970 975
 Tyr Gly Asn Ala Asn Gly Ile Ser Asp Tyr Ile Asn Lys Trp Ile Phe

980 985 990
 Val Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Gly Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Asn
 995 1000 1005
 Gly His Leu Ile Asp Gln Lys Ser Ile Leu Asn Leu Gly Asn Ile His

 1010 1015 1020
 Val Ser Asp Asn Ile Leu Phe Lys Ile Val Asn Cys Ser Tyr Thr Arg
 1025 1030 1035 1040
 Tyr Ile Gly Ile Arg Tyr Phe Asn Ile Phe Asp Lys Glu Leu Asp Glu
 1045 1050 1055
 Thr Glu Ile Gln Thr Leu Tyr Ser Asn Glu Pro Asn Thr Asn Ile Leu
 1060 1065 1070
 Lys Asp Phe Trp Gly Asn Tyr Leu Leu Tyr Asp Lys Gly Tyr Tyr Leu

 1075 1080 1085
 Leu Asn Val Leu Lys Pro Asn Asn Phe Ile Asp Arg Arg Lys Asp Ser
 1090 1095 1100
 Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ile Arg Ser Thr Ile Leu Leu Ala Asn Arg
 1105 1110 1115 1120
 Leu Tyr Ser Gly Ile Lys Val Lys Ile Gln Arg Val Asn Asp Ser Ser
 1125 1130 1135
 Thr Asn Asp Arg Phe Val Arg Lys Asn Asp Gln Val Tyr Ile Asn Tyr

 1140 1145 1150
 Ile Ser Asn Ser Ser Ser Tyr Ser Leu Tyr Ala Asp Thr Asn Thr Thr
 1155 1160 1165
 Asp Lys Glu Lys Thr Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Asn Arg Phe Asn
 1170 1175 1180
 Gln Val Val Val Met Asn Ser Val Gly Asn Asn Cys Thr Met Asn Phe
 1185 1190 1195 1200
 Lys Asn Asn Asn Gly Asn Asn Ile Gly Leu Leu Gly Phe Lys Ala Asp

 1205 1210 1215
 Thr Val Val Ala Ser Thr Trp Tyr Tyr Thr His Met Arg Asp His Thr
 1220 1225 1230

Asn Ser Asn Gly Cys Phe Trp Asn Phe Ile Ser Glu Glu His Gly Trp

1235 1240 1245

Gln Glu Lys

1250

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BoNT/A di-chain loop region

<400> 26

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> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BoNT/B di-chain loop region

<400> 27

Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys

1 5 10

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BoNT/C1 di-chain loop region

<400> 28

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

1 5 10 15

Cys

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BoNT/D di-chain loop region

<400> 29

Cys Leu Arg Leu Thr Lys Asn Ser Arg Asp Asp Ser Thr Cys

1 5 10

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BoNT/E di-chain loop region

<400> 30

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

1 5 10 15

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BoNT/F di-chain loop region

<400> 31

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

1 5 10 15

Cys

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BoNT/G di-chain loop region

<400> 32

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

1 5 10 15

<210> 33

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TeNT di-chain loop region

<400> 33

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> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BaNT di-chain loop region

<400> 34

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

1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BuNT di-chain loop region

<400> 35

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

1 5 10 15

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Bovine enterokinase protease cleavage site

<400> 36

Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

3722

<211> 7

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

consensus sequence

<221> VARIANT

<222> 2, 3, 5

<223> Xaa can be amino amino acid

<400> 37

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Gly

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

consensus sequence

<221> VARIANT

<222> 2, 3, 5

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 38

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Ser

1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

<400> 39

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

<400> 40

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser

1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

<400> 41

Glu Asn Ile Tyr Thr Gln Gly

1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

<400> 42

Glu Asn Ile Tyr Thr Gln Ser

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

<400> 43

Glu Asn Ile Tyr Leu Gln Gly

1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

<400> 44

Glu Asn Ile Tyr Leu Gln Ser

1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

<400> 45

Glu Asn Val Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

<400> 46

Glu Asn Val Tyr Ser Gln Ser

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

<400> 47

Glu Asn Val Tyr Ser Gln Gly

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Etch Virus protease cleavage site

<400> 48

Glu Asn Val Tyr Ser Gln Ser

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Vein Mottling Virus protease cleavage site

consensus sequence

<221> VARIANT

<222> 1, 2

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 49

Xaa Xaa Val Arg Phe Gln Gly

1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Vein Mottling Virus protease cleavage site
consensus sequence

<221> VARIANT

<222> 1, 2

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 50

Xaa Xaa Val Arg Phe Gln Ser

1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Vein Mottling Virus protease cleavage site

<400> 51

Glu Thr Val Arg Phe Gln Gly

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Vein Mottling Virus protease cleavage site

<400> 52

Glu Thr Val Arg Phe Gln Ser

1 5

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Vein Mottling Virus protease cleavage site

<400> 53

Asn Asn Val Arg Phe Gln Gly

1 5

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Tobacco Vein Mottling Virus protease cleavage site

<400> 54

Asn Asn Val Arg Phe Gln Ser

1 5

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human Rhinovirus 3C protease cleavage site

consensus sequence

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa can be amino acid, with D or E preferred

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa can be G, A, V, L, I, M, S or T

<400> 55

Xaa Xaa Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human Rhinovirus 3C protease cleavage site

<400> 56

Glu Ala Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human Rhinovirus 3C protease cleavage site

<400> 57

Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human Rhinovirus 3C protease cleavage site

<400> 58

Glu Leu Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human Rhinovirus 3C protease cleavage site

<400> 59

Asp Ala Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human Rhinovirus 3C protease cleavage site

<400> 60

Asp Val Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human Rhinovirus 3C protease cleavage site

<400> 61

Asp Leu Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 62

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Subtilisin cleavage site consensus sequence

<221> VARIANT

<222> 1, 2, 3, 4

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 62

Xaa Xaa Xaa Xaa His Tyr

1 5

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Subtilisin cleavage site consensus sequence

<221> VARIANT

<222> 1, 2, 3, 4

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 63

Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr His

1 5

<210> 64

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Subtilisin cleavage site

<400> 64

His Tyr

1

<210> 65

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Subtilisin cleavage site

<400> 65

Tyr His

1

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Subtilisin cleavage site

<400> 66

Pro Gly Ala Ala His Tyr

1 5

<210> 67

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hydroxylamine cleavage site

<400> 67

Asn Gly Asn Gly Asn Gly

1 5

<210> 68

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hydroxylamine cleavage site

<400> 68

Asn Gly

1

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SUMO/ULP-1 protease cleavage site consensus

sequence

<221> VARIANT

<222> 3, 4, 5

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 69

Gly Gly Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 70

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SUMO/ULP-1 protease cleavage site

<400> 70

Met Ala Asp Ser Glu Val Asn Gln Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro

1 5 10 15

Glu Val Lys Pro Glu Thr His Ile Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser

20 25 30

Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg Leu

35 40 45

Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg

50 55 60

Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu Asp

65 70 75 80

Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile

85 90 95

Gly Gly

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Caspase 3 protease cleavage site consensus

sequence

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa can be any amino acid with E preferred

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa can be any amino acid

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa can be any amino acid with G or S preferred

<400> 71

Asp Xaa Xaa Asp Xaa

1 5

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Caspase 3 protease cleavage site

<400> 72

Asp Glu Val Asp Gly

1 5

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Caspase 3 protease cleavage site

<400> 73

Asp Glu Val Asp Ser

1 5

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Caspase 3 protease cleavage site
<400> 74
Asp Glu Pro Asp Gly
1 5
<210> 75
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
> Caspase 3 protease cleavage site
<400> 75
Asp Glu Pro Asp Ser
1 5
<210> 76
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Caspase 3 protease cleavage site
<400> 76
Asp Glu Leu Asp Gly
1 5
<210> 77
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Caspase 3 protease cleavage site
<400> 77
Asp Glu Leu Asp Ser
1 5
<210> 78

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible G-spacer

<400> 78

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible G-spacer

<400> 79

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 80

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible A-spacer

<400> 80

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Flexible A-spacer

<400> 81

Ala Ala Ala Ala Val

1 5
<210> 82
<211> 5

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 82
Tyr Gly Gly Phe Leu

1 5
<210> 83
<211> 5

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 83
Tyr Gly Gly Phe Met

1 5
<210> 84
<211> 8

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 84
Tyr Gly Gly Phe Met Arg Gly Leu

1 5
<210> 85
<211> 7

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 85
Tyr Gly Gly Phe Met Arg Phe

1 5
<210> 86
<211> 22

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Met Asp

1 5 10 15

Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly

20

<210> 87

<211> 22

<212> PRT

<213> *Necturus maculosus*

<400> 87

Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Leu Asp

1 5 10 15

Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly

20

<210> 88

<211> 22

<212> PRT

<213> *Bombina orientalis*

<400> 88

Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Gln Asp

1 5 10 15

Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly

20

<210> 89

<211> 22

<212> PRT

<213> *Xenopus laevis*

<400> 89

Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Glu Asp

1 5 10 15

Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly

20

<210> 90

<211> 22

<212> PRT

<213> *Neoceratodus forsteri*

<400> 90

Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu Trp Lys Leu Asp

1 5 10 15

Asn Gln Lys Arg Tyr Gly

20

<210> 91

<211> 21

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 91

Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Val Gly Arg Pro Asp Trp Trp Gln Glu

1 5 10 15

Ser Lys Arg Tyr Gly

20

<210> 92

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 92

Tyr Pro Trp Phe

1

<210> 93

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 93

Tyr Pro Phe Phe

1

<210> 94

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 94
 Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr
 1 5 10 15

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Lys Tyr Pro Lys
 1 5 10

<210> 96

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

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

<210> 97

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

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

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Lys Tyr Pro

1 5

<210> 99

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr

1 5 10 15

Leu

<210> 100

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys Trp Asp Asn

1 5 10 15

<210> 101

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys

1 5 10

<210> 102

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Gly Gly Phe Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys Trp Asp Asn Gln

1 5 10 15

<210> 103

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Gly Gly Phe Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys

1 5 10

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> Xenopus laevis

<400> 104

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Arg Trp Asp Asn

1 5 10 15

Gln

<210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> Xenopus laevis

<400> 105

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Ile Arg Pro Arg Leu Arg Trp Asp Asn

1 5 10 15

Gln

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> Protopterus annectens

<400> 106

Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Ile Arg Pro Lys Ile Arg Trp Asp Asn

1 5 10 15

Gln

<210> 107

<211> 17

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 107

Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Arg Trp Asp Asn

1 5 10 15

Gln

<210> 108

<211> 17

<212> PRT

<213> *Anguilla rostrata*

<400>

> 108

Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys Trp Asp Ser

1 5 10 15

Gln

<210> 109

<211> 29

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 109

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Val Thr Arg Ser Gln

1 5 10 15

Glu Asp Pro Asn Ala Tyr Ser Gly Glu Leu Phe Asp Ala

20 25

<210> 110

<211> 28

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 110

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Val Thr Arg Ser Gln

1 5 10 15

Glu Asn Pro Asn Thr Tyr Ser Glu Asp Leu Asp Val

20 25

<210> 111

<211> 28

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 111

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Val Thr Arg Ser Gln

1 5 10 15

Glu Ser Pro Asn Thr Tyr Ser Glu Asp Leu Asp Val

20 25

<210> 112

<211> 29

<212> PRT

<213> *Cavia porcellus*

<400> 112

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Val Thr Arg Ser Gln

1 5 10 15

Glu Asp Pro Asn Ala Tyr Ser Glu Glu Phe Phe Asp Val

20 25

<210> 113

<211> 29

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<400> 113

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Val Thr Arg Ser Gln

1 5 10 15

Glu Asp Pro Asn Ala Tyr Tyr Glu Glu Leu Phe Asp Val

20 25

<210> 114

<211> 29

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 114

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Val Thr Arg Ser Gln
 1 5 10 15

Glu Asp Pro Asn Ala Tyr Ser Gly Glu Leu Leu Asp Gly
 20 25

<210> 115

<211> 29

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 115

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Val Thr Arg Ser Gln
 1 5 10 15

Glu Asp Pro Ser Ala Tyr Tyr Glu Glu Leu Phe Asp Val
 20 25

<210> 116

<211> 29

<212> PRT

<213> Bufo marinus

<400> 116

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Thr Thr Arg Ser Glu
 1 5 10 15

Glu Asp Pro Ser Thr Phe Ser Gly Glu Leu Ser Asn Leu
 20 25

<210> 117

<211> 29

<212> PRT

<213> Bombina orientalis

<400> 117

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Thr Thr Arg Ser Glu
 1 5 10 15

Glu Glu Pro Gly Ser Phe Ser Gly Glu Ile Ser Asn Leu
 20 25

<210> 118

<211> 29

<212> PRT

<213> *Xenopus laevis*

<400> 118

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Asn Ala Arg Ser Glu

1 5 10 15

Glu Asp Pro Thr Met Phe Ser Asp Glu Leu Ser Tyr Leu

 20 25

<210> 119

<211> 29

<212>

> PRT

<213> *Xenopus laevis*

<400> 119

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Asn Ala Arg Ser Glu

1 5 10 15

Glu Asp Pro Thr Met Phe Ser Gly Glu Leu Ser Tyr Leu

 20 25

<210> 120

<211> 29

<212> PRT

<213> *Polypterus senegalus*

<400> 120

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg His Phe Lys Ile Ser Val Arg Ser Asp

1 5 10 15

Glu Glu Pro Ser Ser Tyr Ser Asp Glu Val Leu Glu Leu

 20 25

<210> 121

<211> 27

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 121

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg His Phe Lys Ile Ser Val Arg Ser Asp

1 5 10 15

Glu Glu Pro Ser Ser Tyr Glu Asp Tyr Ala Leu

20 25

<210> 122

<211> 27

<212> PRT

<213> *Anguilla rostrata*

<400> 122

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg His Phe Lys Ile Ser Val Arg Ser Asp

1 5 10 15

Glu Glu Pro Gly Ser Tyr Asp Val Ile Gly Leu

20 25

<210> 123

<211> 29

<212> PRT

<213> *Neoceratodus forsteri*

<400> 123

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg His Phe Lys Ile Thr Val Arg Ser Asp

1 5 10 15

Glu Asp Pro Ser Pro Tyr Leu Asp Glu Phe Ser Asp Leu

20 25

<210> 124

<211> 27

<212> PRT

<213> *Oncorhynchus masou*

<400> 124

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg His Tyr Lys Leu Ser Val Arg Ser Asp

1 5 10 15

Glu Glu Pro Ser Ser Tyr Asp Asp Phe Gly Leu

20 25

<210> 125

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 125

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Val Thr

1 5 10

<210> 126

<211> 13

<212> PRT

<213> *Bufo marinus*

<400> 126

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Thr Thr

1 5 10

<210> 127

<211> 13

<212> PRT

<213> *Xenopus laevis*

<400> 127

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Asn Ala

1 5 10

<210> 128

<211> 13

<212> PRT

<213> *Polypterus senegalus*

<400> 128

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg His Phe Lys Ile Ser Val

1 5 10

<210> 129

<211> 13

<212> PRT

<213> *Neoceratodus forsteri*

<400> 129

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg His Phe Lys Ile Thr Val

1 5 10

<210> 130

<211> 13

<212> PRT

<213> *Oncorhynchus masou*

<400> 130

Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg His Tyr Lys Leu Ser Val

1 5 10

<210> 131

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 131

Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys Arg Lys Asn

1 5 10 15

Gln

<210> 132

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 132

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

1 5 10 15

Gln

<210> 133

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 133

Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys Tyr Ala Asn

1 5 10 15

Gln

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala

1 5 10

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 135

Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Tyr Ala

1 5 10

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Tyr

1 5 10

<210> 137

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys

1 5 10

<210> 138

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Met Pro Arg Val Arg Ser Leu Phe Gln Glu Gln Glu Glu Pro Glu Pro

1 5 10 15

Gly Met Glu Glu Ala Gly Glu Met Glu Gln Lys Gln Leu Gln
 20 25 30

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Phe Ser Glu Phe Met Arg Gln Tyr Leu Val Leu Ser Met Gln Ser Ser
 1 5 10 15

Gln

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Thr Leu His Gln Asn Gly Asn Val

1 5

<210> 141

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe

1 5 10

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe

1 5

<210> 143

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe

1 5

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe

1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg

1 5

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln

1 5

<210> 147

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln

1 5

<210> 148

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 149

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Leu Val Val Tyr Pro Trp

1 5

<210> 150

<211> 268

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant Green Fluorescent Protein (GFP)

<400> 150

Met Glu Gly Pro Val Thr Gly Thr Gly Ser Arg Tyr Leu Gly Gly Arg

1 5 10 15

Ser Ala Ser Phe Ala Asn Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser Lys Gly

20 25 30

Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly

35 40 45

Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp

50 55 60

Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys

65 70 75 80

Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Cys Tyr Gly Val

85 90 95

Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg His Asp Phe Phe

100 105 110
 Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe
 115 120 125
 Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly
 130 135 140
 Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu
 145 150 155 160

Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His
 165 170 175
 Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn
 180 185 190
 Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp
 195 200 205
 His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro
 210 215 220

Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn
 225 230 235 240
 Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
 245 250 255
 Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp
 260 265

<210> 151

<211> 804

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Open reading frame encoding recombinant Green Fluorescent Protein (GFP)

<400> 151

atggagggcc cggttaccgg taccggatcc agatatctgg gcggccgctc agcaagcttc 60
 gcgaattcgg gaggcggagg tggagctagc aaaggagaag aactcttcac tggagttgct 120
 ccaattcttg ttgaattaga tggatgatgtt aacggccaca agttctctgt cagtggagag 180
 ggtgaagggtg atgcaacata cggaaaactt acctgaagt tcactctgcac tactggcaaa 240
 ctgcctgttc catggccaac actagtcact actctgtgct atggtgttca atgcttttca 300

agatacccg atcatatgaa acggcatgac tttttcaaga gtgcatgcc cgaaggttat 360
 gtacaggaaa ggaccatctt cttcaagat gacggcaact acaagacacg tgctgaagtc 420

aagtttgaag gtgataccct tgtaataga atcgagttaa aaggtattga cttcaaggaa 480
 gatggcaaca ttctgggaca caaattggaa tacaactata actcacacia tgtatacatc 540
 atggcagaca aacaaaagaa tggaatcaaa gtgaacttca agaccgcca caacattgaa 600
 gatggaagcg ttcaactagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg cgatggccct 660
 gtccttttac cagacaacca ttacctgtcc acacaatctg ccttttcgaa agatccaac 720
 gaaaagagag accacatggt ccttcttgag tttgtaacag ctgctgggat tacacatggc 780
 atggatgaac tgiacaacat cgat 804

<210> 152

<211> 710

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant Green Fluorescent Protein (GFP)-BoNT/A light chain fusion protein

<400> 152

Met Glu Gly Pro Val Thr Gly Thr Gly Ser Arg Tyr Leu Gly Gly Arg

1 5 10 15

Ser Ala Ser Phe Ala Asn Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser Lys Gly

20 25 30

Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly

35 40 45

Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp

50 55 60

Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys

65 70 75 80

Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Cys Tyr Gly Val

85 90 95

Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg His Asp Phe Phe

100 105 110

Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe

115 120 125

Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly
 130 135 140
 Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu
 145 150 155 160
 Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His
 165 170 175

 Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn
 180 185 190
 Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp
 195 200 205
 His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro
 210 215 220
 Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn
 225 230 235 240

 Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
 245 250 255
 Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp Gly Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly
 275 280 285
 Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro
 290 295 300

 Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg
 305 310 315 320
 Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu
 325 330 335
 Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr
 340 345 350
 Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu
 355 360 365

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

370 375 380
 Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys
 385 390 395 400
 Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr
 405 410 415
 Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile
 420 425 430

 Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr
 435 440 445
 Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe
 450 455 460
 Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu
 465 470 475 480
 Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu
 485 490 495

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

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

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

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg
 690 695 700

Gly Ile Ile Thr Ser Lys
 705 710

<210> 153

<211> 2130

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Open Reading Frame encoding recombinant Green Fluorescent Protein (GFP)-BoNT/A light chain fusion protein

<400> 153

atggagggcc cggttaccgg taccggatcc agatatctgg gcggccgctc agcaagcttc 60
 gcgaattcgg gaggcggagg tggagctagc aaaggagaag aactcttcac tggagtgtc 120

 ccaattcttg ttgaattaga tggatgatgtt aacggccaca agttctctgt cagtggagag 180
 ggtgaagggtg atgcaacata cggaaaactt accctgaagt tcatctgcac tactggcaaa 240
 ctgcctgttc catggccaac actagtcact actctgtgct atggtgttca atgcttttca 300
 agatacccg atcatatgaa acggcatgac tttttcaaga gtgccatgcc cgaaggttat 360
 gtacaggaaa ggaccatctt cttcaaatgat gacggcaact acaagacacg tgctgaagtc 420
 aagtttgaag gtgataacct tgttaataga atcgagttaa aaggtattga cttcaaggaa 480
 gatggcaaca ttctgggaca caaattggaa tacaactata actcacacaa tgtatacatc 540

 atggcagaca aacaaaagaa tggaatcaaa gtgaacttca agaccgcca caacattgaa 600
 gatggaagcg ttcaactagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg cgatggccct 660
 gtccctttac cagacaacca ttacctgtcc acacaatctg ccctttcgaa agatccaac 720
 gaaaagagag accacatggt ctttcttgag tttgtaacag ctgctgggat tacacatggc 780

atggatgaac tgiacaacat cgatggaggc ggaggtggac cttttgttaa taaacaattt 840
aattataaag atcctgtaaa tgggtttgat attgcttata taaaaattcc aaatgcagga 900
caaatgcaac cagtaaaagc ttttaaaatt cataataaaa tatgggttat tccagaaaga 960

gatacattta caaatcctga agaaggagat ttaaatccac caccagaagc aaaacaagtt 1020
ccagtttcat attatgattc aacatattta agtacagata atgaaaaaga taattattta 1080
aagggagtta caaaattatt tgagagaatt tattcaactg atcttggag aatgtttgta 1140
acatcaatag taaggggaat accattttgg ggtggaagta caatagatac agaattaaaa 1200
gttattgata ctaattgtat taatgtgata caaccagatg gtagttag atcagaagaa 1260
cttaatctag taataatagg accctcagct gatattatac agtttgaatg taaaagcttt 1320
ggacatgaag ttttgaatct tacgcgaaat ggttatggct ctactcaata cattagattt 1380

agcccagatt ttacatttgg ttttgaggag tcacttgaag ttgatacaaa tectctttta 1440
ggtgcaggca aatttgctac agatccagca gtaacattag cacatgaact tatacatgct 1500
ggacatagat tatatggaat agcaattaat ccaaataggg tttttaaagt aaataactaat 1560
gcctattatg aaatgagtgg gttagaagta agctttgagg aacttagaac atttggggga 1620
catgatgcaa agtttataga tagtttacag gaaaacgaat ttcgtctata ttattataat 1680
aagtttaaag atatagcaag tacacttaat aaagctaaat caatagtagg tactactgct 1740
tcattacagt atatgaaaaa tgtttttaa gagaaatata tcctatctga agatacatct 1800

ggaaaatfff cggtagataa attaaaatff gataagttat acaaaatggt aacagagatt 1860
tacacagagg ataattttgt taagtttttt aaagtactta acagaaaaac atatttgaat 1920
tttgataaag ccgtatttaa gataaatata gtacctaagg taaattacac aatatatgat 1980
ggatttaatt taagaaatac aaatttagca gcaaaactta atggtcaaaa tacagaaatt 2040
aataatatga atttactaa actaaaaaat ttactggat tgtttgaatt ttataagttg 2100
ctatgtgtaa gagggataat cacttcgaaa 2130

<210> 154

<211> 694

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant Green Fluorescent Protein (GFP)-BoNT/B light chain fusion protein

<400> 154

Met Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile
 225 230 235 240
 Asp Gly Gly Gly Gly Gly Lys Gly Pro Val Thr Gly Thr Gly Ser Pro
 245 250 255
 Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn Asn Asn

260 265 270
 Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg Tyr Tyr
 275 280 285
 Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Ile Pro Glu Arg Tyr
 290 295 300
 Thr Phe Gly Tyr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Lys Ser Ser Gly Ile Phe

 305 310 315 320
 Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn Thr Asn
 325 330 335
 Asp Lys Lys Asn Ile Phe Leu Gln Thr Met Ile Lys Leu Phe Asn Arg
 340 345 350
 Ile Lys Ser Lys Pro Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Met Ile Ile Asn
 355 360 365
 Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Asp Arg Arg Val Pro Leu Glu Glu Phe Asn

 370 375 380
 Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn Pro Gly
 385 390 395 400
 Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile Phe Gly
 405 410 415
 Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly Ile Gln
 420 425 430
 Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln Met Lys

 435 440 445
 Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu Asn Lys
 450 455 460
 Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro Ala Leu
 465 470 475 480
 Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr Gly Ile
 485 490 495
 Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe Phe Met

 500 505 510

Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe Gly Gly
 515 520 525

Gln Asp Pro Ser Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile Tyr Asp
 530 535 540

Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn Lys Val
 545 550 555 560

Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr Lys Asn
 565 570 575

Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly Lys Tyr
 580 585 590

Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu Met Phe
 595 600 605

Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys Thr Arg
 610 615 620

Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys Asn Leu
 625 630 635 640

Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile Ser Asp
 645 650 655

Lys Asp Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile Asn Lys
 660 665 670

Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr Lys Ile
 675 680 685

Gln Met Cys Lys Ser Val
 690

<210> 155

<211> 2082

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Open Reading Frame encoding recombinant Green Fluorescent Protein (GFP)-BoNT/B light chain fusion protein

<400> 155

atggctagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat 60

ggtgatgtta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaaggtga tgcaacatac 120
 ggaaaactta cctgaagtt catctgcact actggcaaac tgcctgttcc atggccaaca 180
 ctagtacta ctctgtgcta tgggtttcaa tgcttttcaa gataccgga tcatatgaaa 240
 cggcatgact tttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc 300

 ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt 360
 gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggcaacat tctgggacac 420
 aaattggaat acaactataa ctcacacaat gtatacatca tggcagacaa aaaaagaat 480
 ggaatcaaag tgaacttcaa gaccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca 540
 gaccattatc acaaaaatac tccaattggc gatggcctg tccttttacc agacaacat 600
 tacctgtcca cacaatctgc cttttcgaag gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc 660
 cttcttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaacatc 720

 gatggaggcg gaggtggaag gggcccgtt accggtaccg gatccccagt tacaataaat 780
 aattttaatt ataagatcc tattgataat aataatatta ttatgatgga gcctccattt 840
 gcgagaggta cggggagata ttataaagct tttaaaatca cagatcgat ttggataata 900
 ccggaagat atacttttgg atataaacct gaggatttta ataaaagttc cggtattttt 960
 aatagagatg tttgtgaata ttatgatcca gattacttaa atactaatga taaaaagaat 1020
 atatttttac aaacaatgat caagttattt aatagaatca aatcaaaacc attgggtgaa 1080
 aagttattag agatgattat aaatggtata ccttatcttg gagatagacg tgttccactc 1140

 gaagagtta acacaaacat tgctagtgtc actgttaata aattaatcag taatccagga 1200
 gaagtggagc gaaaaaagg tattttcgca aatttaataa tatttggacc tgggccagtt 1260
 ttaaatgaaa atgagactat agatataggt atacaaaatc attttgcac aagggaaggc 1320
 ttcgggggta taatgcaaat gaagttttgc ccagaatag taagcgtatt taataatggt 1380
 caagaaaaca aaggcgcaag tatatttaat agacgtggat atttttcaga tccagccttg 1440
 atattaatgc atgaacttat acatgtttta catggattat atggcattaa agtagatgat 1500
 ttaccaattg taccaaatga aaaaaattt tttatgcaat ctacagatgc tatacaggca 1560

 gaagaactat atacatttgg aggacaagat ccagcatca taactccttc tacggataaa 1620
 agtatctatg ataaagtttt gcaaaaattt agagggatag ttgatagact taacaaggtt 1680
 ttagtttgc taatcagatcc taacattaat attaatatat ataaaaataa atttaagat 1740
 aaataataat tcgttgaaga ttctgaggga aaatatagta tagatgtaga aagttttgat 1800
 aaattatata aaagcttaat gtttggtttt acagaaaacta atatagcaga aaattataaa 1860
 ataaaaacta gagcttctta ttttagtgat tccttaccac cagtaaaaat aaaaaattta 1920

ttagataatg aaatctatac tatagaggaa gggtttaata tatctgataa agatatggaa 1980

aaagaatata gaggtcagaa taaagctata aataaacaag cttatgaaga aattagcaag 2040

gagcatttgg ctgtatataa gatacaaatg tgtaaaagtg tt 2082

<210> 156

<211> 706

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant Green Fluorescent Protein (GFP)-BoNT/C1 light chain fusion protein

<400> 156

Met Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50 55 60

Leu Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65 70 75 80

Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

115 120 125

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

130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile
 225 230 235 240

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Lys Gly Pro Val Thr Gly Thr Gly Asp Val
 245 250 255

Ser Ile Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val
 260 265 270

Asp Asn Lys Asn Ile Leu Tyr Leu Asp Thr His Leu Asn Thr Leu Ala
 275 280 285

Asn Glu Pro Glu Lys Ala Phe Arg Ile Thr Gly Asn Ile Trp Val Ile
 290 295 300

Pro Asp Arg Phe Ser Arg Asn Ser Asn Pro Asn Leu Asn Lys Pro Pro
 305 310 315 320

Arg Val Thr Ser Pro Lys Ser Gly Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Ser
 325 330 335

Thr Asp Ser Asp Lys Asp Thr Phe Leu Lys Glu Ile Ile Lys Leu Phe
 340 345 350

Lys Arg Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu
 355 360 365

Ser Thr Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr
 370 375 380

Phe Asp Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln
 385 390 395 400

Gly Asn Asn Trp Val Lys Thr Gly Ser Ile Asn Pro Ser Val Ile Ile
 405 410 415

Thr Gly Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys

	420	425	430	
Leu Thr Asn Asn Thr Phe Ala Ala Gln Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ser				
	435	440	445	
Ile Ile Ser Ile Ser Pro Arg Phe Met Leu Thr Tyr Ser Asn Ala Thr				
	450	455	460	
Asn Asp Val Gly Glu Gly Arg Phe Ser Lys Ser Glu Phe Cys Met Asp				
	465	470	475	480
Pro Ile Leu Ile Leu Met His Glu Leu Asn His Ala Met His Asn Leu				
	485	490	495	
Tyr Gly Ile Ala Ile Pro Asn Asp Gln Thr Ile Ser Ser Val Thr Ser				
	500	505	510	
Asn Ile Phe Tyr Ser Gln Tyr Asn Val Lys Leu Glu Tyr Ala Glu Ile				
	515	520	525	
Tyr Ala Phe Gly Gly Pro Thr Ile Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ala Arg				
	530	535	540	
Lys Tyr Phe Glu Glu Lys Ala Leu Asp Tyr Tyr Arg Ser Ile Ala Lys				
	545	550	555	560
Arg Leu Asn Ser Ile Thr Thr Ala Asn Pro Ser Ser Phe Asn Lys Tyr				
	565	570	575	
Ile Gly Glu Tyr Lys Gln Lys Leu Ile Arg Lys Tyr Arg Phe Val Val				
	580	585	590	
Glu Ser Ser Gly Glu Val Thr Val Asn Arg Asn Lys Phe Val Glu Leu				
	595	600	605	
Tyr Asn Glu Leu Thr Gln Ile Phe Thr Glu Phe Asn Tyr Ala Lys Ile				
	610	615	620	
Tyr Asn Val Gln Asn Arg Lys Ile Tyr Leu Ser Asn Val Tyr Thr Pro				
	625	630	635	640
Val Thr Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Val Tyr Asp Ile Gln Asn Gly				
	645	650	655	
Phe Asn Ile Pro Lys Ser Asn Leu Asn Val Leu Phe Met Gly Gln Asn				
	660	665	670	

Leu Ser Arg Asn Pro Ala Leu Arg Lys Val Asn Pro Glu Asn Met Leu

675 680 685

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

690 695 700

Ser Asp

705

<210> 157

<211> 2118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Open Reading Frame encoding recombinant Green Fluorescent Protein (GFP)-BoNT/C1 light chain fusion protein

<400> 157

```

atggctagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat      60
ggatgatgta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaaggtga tgcaacatac     120
ggaaaactta cctgaagtt catctgcact actggcaaac tgccctgttc atggccaaca     180
ctagtacta ctctgtgcta tgggtttcaa tgcctttcaa gatacccgga tcatatgaaa     240
cggcatgact tttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc     300
ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgatacctt     360
gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggcaacat tetgggacac     420

aaattggaat acaactataa ctcacacaat gtatacatca tggcagacaa acaaaagaat     480
ggaatcaaag tgaacttcaa gaccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca     540
gaccattatc acaaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat     600
tacctgtcca cacaatctgc cttttcgaag gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc     660
cttcttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaacatc     720
gatggaggcg gaggtggaaa gggcccgggt accggtaccg gagatgtag tattatgcca     780
ataacaatta acaactttaa ttattcagat cctggtgata ataaaaatat tttatattta     840

gatactcatt taatacact agctaatagag cctgaaaaag cctttcgcat tacaggaat     900
atatgggtaa tacctgatag attttcaaga aattctaac caaatttaa taaacctcct     960
cgagttacaa gcctaaaag tggttattat gatcctaatt atttgagtac tgattctgac    1020
aaagatacat ttttaaaaga aattataaag ttatttaaaa gaattaattc tagagaaata    1080
ggagaagaat taatataatg actttcgaca gatatacct ttctgggaa taacaatact    1140

```


ccaattaata cttttgattt tgatgtagat tttaacagtg ttgatgttaa aactagacaa 1200
 ggtaacaact gggttaaaac tggtagcata aatcctagtg ttataataac tggacctaga 1260

gaaaacatta tagatccaga aacttctacg tttaaattaa ctaacaatac ttttgcggca 1320
 caagaaggat ttggtgcttt atcaataatt tcaatatcac ctagatttat gctaacatat 1380
 agtaatgcaa ctaatgatgt aggagagggt agattttcta agtctgaatt ttgcatggat 1440
 ccaatactaa ttttaatgca tgaacttaat catgcaatgc ataatttata tggaaatagct 1500
 ataccaaatg atcaacaat ttcactgtga actagtaata tttttattc tcaatataat 1560
 gtgaaattag agtatgcaga aatatatgca tttggaggtc caactataga ctttattcct 1620
 aaaagtgcaa ggaatatatt tgaggaaaag gcattggatt attatagatc tatagctaaa 1680

agacttaata gtataactac tgcaaatcct tcaagcttta ataaatatat aggggaatat 1740
 aaacagaaac ttattagaaa gtatagattc gtagtagaat cttcaggatga agttacagta 1800
 aatcgtaata agtttgttga gttatataat gaacttacac aaatatttac agaatttaac 1860
 tacgctaaaa tatataatgt acaaaaatagg aaaatatatc tttcaaatgt atatactccg 1920
 gttacggcga atatattaga cgataatggt tatgatatac aaaatggatt taatatacct 1980
 aaaagtaatt taaatgtact atttatgggt caaaatttat ctcgaaatcc agcattaaga 2040
 aaagtcaatc ctgaaaatat gctttattta tttacaaaat tttgtcataa agcaatagat 2100

gtagatcga attctgac 2118

<210> 158
 <211> 681
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant Green Fluorescent Protein (GFP)-BoNT/E light chain fusion protein
 <400> 158

Met Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

Leu Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile
 225 230 235 240
 Asp Gly Gly Gly Gly Gly Lys Gly Pro Val Thr Gly Thr Gly Ser Pro
 245 250 255
 Lys Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp Arg Thr Ile
 260 265 270
 Leu Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Cys Gln Glu Phe Tyr Lys Ser Phe Asn
 275 280 285

 Ile Met Lys Asn Ile Trp Ile Ile Pro Glu Arg Asn Val Ile Gly Thr
 290 295 300
 Thr Pro Gln Asp Phe His Pro Pro Thr Ser Leu Lys Asn Gly Asp Ser

305 310 315 320
 Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Glu Glu Lys Asp Arg
 325 330 335
 Phe Leu Lys Ile Val Thr Lys Ile Phe Asn Arg Ile Asn Asn Asn Leu
 340 345 350

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

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

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

 Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu Ala Lys
 545 550 555 560

Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn Ile Asn
 565 570 575
 Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu Phe Asp
 580 585 590
 Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile Gly Gln
 595 600 605

Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile Tyr Asn
 610 615 620
 Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe Arg Gly
 625 630 635 640
 Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr Gly Arg
 645 650 655
 Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val Ser Val
 660 665 670

Lys Gly Ile Arg Lys Leu Arg Glu Phe
 675 680

<210> 159

<211> 2043

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Open Reading Frame encoding recombinant Green Fluorescent Protein (GFP)-BoNT/E light chain fusion protein

<400> 159

```

atggctagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat      60
ggatgatgta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaaggtga tgcaacatac      120
ggaaaactta cctgaagtt catctgcact actggcaaac tgcctgttcc atggccaaca      180
ctagtcacta ctctgtgcta tgggtttcaa tgcttttcaa gatacccgga tcatatgaaa      240

cgcatgact tttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc      300
ttcaaatgat acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgatacctt      360
gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggcaacat tctgggacac      420
aaattggaat acaactataa ctacacacat gtatacatca tggcagacaa acaaaagaat      480
ggaatcaaag tgaacttcaa gaccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca      540
    
```

gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacccat 600
 tacctgtcca cacaatctgc cctttcgaaa gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc 660

cttcttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaacatc 720
 gatggaggcg gaggtggaaa gggcccgggt accggtaccg gatcccaaaa aattaatagt 780
 ttttaattata atgatcctgt taatgataga acaattttat atattaaacc aggcggttgt 840
 caagaatfff ataatcatt taatattatg aaaaatattt ggataattcc agagagaaat 900
 gtaattggta caacccccca agattttcat cgcctactt cattaaaaaa tggagatagt 960
 agttattatg accctaatta tttacaaagt gatgaagaaa aggatagatt tttaaaaata 1020
 gtcacaaaaa tatttaatag aataaataat aatctttcag gagggatttt attagaagaa 1080

ctgtcaaaaag ctaatccata tttagggatgataaactc cagataatca attccatatt 1140
 ggtgatgcat cagcagtga gattaatc tcaaatggta gccaaagacat actattacct 1200
 aatgttatta taatgggagc agagcctgat ttatttgaac ctaacagttc caatatttct 1260
 ctaagaata attatatgcc aagcaatcac ggttttggat caatagctat agtaacattc 1320
 tcacctgaat attcttttag atttaatgat aatagtatga atgaatttat tcaagatcct 1380
 gctcttcat taatgcatga attaatacat tcattacatg gactatatgg ggctaaaggg 1440
 attactacaa agtatactat aacacaaaaa caaaatcccc taataacaaa tataagaggt 1500

acaaatattg aagaattctt aacttttggg ggtactgatt taaacattat tactagtgct 1560
 cagtccaatg atatctatac taatcttcta gctgattata aaaaaatagc gtctaaactt 1620
 agcaaagtac aagtatctaa tccactactt aatccttata aagatgtttt tgaagcaaag 1680
 tatggattag ataaagatgc tagcgggaatt tattcggtaa atataaacia atttaatgat 1740
 atttttaaaa aattatacag ctttacggaa tttgatttag caactaaatt tcaagttaaa 1800
 tgtaggcaaa cttatattgg acagtataaa tacttcaaac tttcaactt gttaaatgat 1860
 tctatttata atatatcaga aggctataat ataaataatt taaaggtaaa ttttagagga 1920

cagaatgcaa atttaaatcc tagaattatt acaccaatta caggtagagg actagtaaaa 1980
 aaaatcatta gattttgtaa aaatattggt tctgtaaaag gcataaggaa gcttcgcaaa 2040
 ttc 2043