SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-133183- -00000-0000

Fecha: 2011-10-07 16:16:41 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 722

Act. 411 PRESENTACION Folios: 719

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE ENDOPEPTIDASA REDIRIGIDA BASADOS EN INMUNOENSAYOS.

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** ALLERGAN, INC

DOMICILIO 2525 Dupont Drive, Irvine, California 92612, E.U.A

74. **APODERADO** JERÓNIMO CASTILLO BONILLA

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____

(FORMA P-10)

PE

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-133183- -00000-0000

Fecha: 2011-10-07 16:16:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 722

Act. 411 PRESENTACION Folios: 719

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTES PCT, ENTRADA FASE NACIONAL

SOLICITUD DE REGISTRO DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente Modelo de Utilidad

☐ Capitulo I ☒ Capitulo II

SOLICITANTE	Nombre: **ALLERGAN, INC** Dirección: **2525 Dupont Drive, Irvine, California 92612, Estados Unidos de América** Domicilio: **estadounidense** Lugar de Constitución: **Delaware** Teléfono: Fax: E-mail:	**IDENTIFICACIÓN** ☐ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Cúal Número:
REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: **JERONIMO CASTILLO BONILLA** Dirección: **Calle 93A No. 14-17, Ofc 311 Bogotá, D.C.** Teléfono: **2 363493** Fax: **2 182351** E-mail: **info@pcastillopineda.com**	**IDENTIFICACIÓN** ☒ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Número: **79462057** TP: **106167**
INVENTORES	Nombre: **Birgitte P.S., JACKY** Dirección: **166 N. Waverly Street, Orange, California 92866, Estados Unidos de América** Nacionalidad o Domicilio: **estadounidense**	

PCT

Solicitud Internacional No.: **PCT/US2010/027244** Fecha: **Marzo 12, 2010**
Publicación Internacional No.: **WO 2010/105236 A1** Fecha: **Septiembre 16, 2010**

Titulo: **ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE ENDOPEPTIDASA REDIRIGIDA BASADOS EN INMUNOENSAYOS**

Clasificación Internacional:

Prioridad

☒ SI ☐ NO

País de Origen	Fecha	Número de Solicitud
US	Marzo 13, 2009	61/160,199

Comprobante de pago No: **Fecha:**

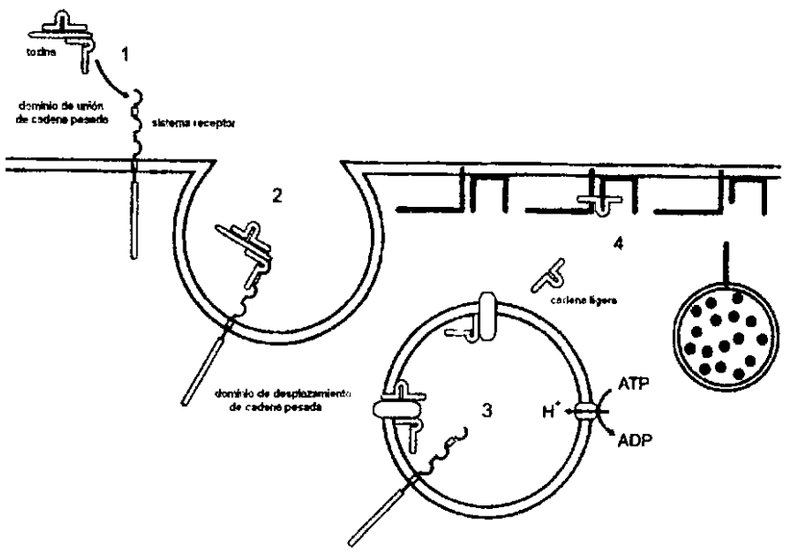
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

Anexos

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [X] Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- [X] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [X] Arte final 12x12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros **Publicación Internacional**

FIGURA CARACTERÍSTICA:

FIG. 1B.



Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JHONNY CASTILLO CORTES

FIRMA:

C.C. 79462057 **T.P.** 104167

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(Continuación Inventores)

Nombre : Joanne, WANG
Dirección : 37 Bristlecone, Irvine, California 92620, Estados Unidos de América
Nacionalidad : estadounidense

Nombre : Hong, ZHU
Dirección : 11408 Pacific Shores Way, San Diego, California 92130, Estados Unidos de América
Nacionalidad : estadounidense

Nombre : Dianne D. HODGES
Dirección : 14351 Pinewood Road, Tustin, California 92780 Estados Unidos de América
Nacionalidad : estadounidense

Nombre : Ester FERNANDEZ-SALAS
Dirección : 1710 Rocky Road, Fullerton, California 92831, Estados Unidos de América
Nacionalidad : estadounidense

LAW OFFICES
PEDRO CASTILLO PINEDA &
ASSOCIATES
P.O. BOX 48362
Bogotá, Colombia / South America

IMPORTANT NOTE
The lodging of this GENERAL POWER with the Patent Office obviates the need of presenting special powers with each individual trade mark application.

FOR PATENTS AND TRADE MARKS IN
COLOMBIA

	Poder General	**General Power of Attorney**
1 Applicant's name	(1)	ALLERGAN, INC.
2 Applicant's address	domiciliado en (2)	domiciled in (2) 2525 Dupont Drive Irvine, CA 92612 USA

nombra al Dr. JERONIMO CASTILLO BONILLA y/o Dra. XIMENA BONILLA PEREIRA, y/o Dr. ALVARO CASTILLO GRAU, Calle 93A N° 14-17 Oficina 311 en Bogotá, Colombia, como sus representantes con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades Colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en primera o segunda instancia, la obtención de Patentes de Invención, Registro de Marcas, de Modelos y de Dibujos Industriales, de Nombres Comerciales y Enseñas, Lemas Comerciales y Denominaciones de Origen, lo mismo que traspasos, extensiones, renovaciones, cambios de nombre, registro de licencias de explotación y registro de licencias de uso referentes a tales actuaciones, cancelación de Registros de marca, a cuyo efecto les faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar la aplicación de medidas cautelares; solicitar la nulidad de Patentes de Invención, modelos de utilidad, diseños industriales, así como la de registros de marcas ante la autoridad nacional competente; aceptar en nuestro nombre y representación la Cesión de derechos de invención y de patente de invención que se nos haga por cualquier persona, abonar todos los impuestos, cuotas y pagos determinados por la ley, recibir todos los documentos y valores dando el descargo respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos, desistir y tomar en fin todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses y en caso de presentarse oposiciones y/o observaciones para que intervengan como demandantes o como demandados, con todas las demás facultades necesarias, así como iniciar y tramitar procesos jurisdiccionales relativos a competencia desleal. Este poder comprende además las facultades de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar sustituciones, conciliar, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

hereby appoint, JERONMO CASTILLO BONILLA and/or XIMENA BONILLA PEREIRA, and/or ALVARO CASTILLO GRAU, Calle 93A N° 14-17 Office 311 en Bogotá, Colombia, as our representatives with special, ample and sufficient power to obtain from the offices and Colombian authorities, administrative, judicial and police, in first or in second instance, Privileged Patents of invention, Registration of Trade Marks, of Models and Industrial Drawings, of Commercial Names and ensigns, Commercial slogans and Origin Denominations as well as assignments, extensions, renewals, changes of name, registration of license of exploitation and of license of use referred to said actions, Cancellation Actions against trademark Registrations, who are empowered to take before said authorities all of the necessary steps for the purposes indicated, to file applications, to formulate descriptions, corrections, protests, declarations, appeals, and claims, apply for precautionary measures; apply for the nullity of Patent Inventions, Utility Models, Industrial Designs, as well as for Trademark Registrations before the competent national authority; to accept on our behalf and representation the assignment of rights of inventions and titles of invention that may be done to us by any person, to pay all taxes, quotas and payments prescribed by law, to receive all the documents and proceeds giving the respective acquittance or receipt, to fulfill any other requisites to desist and take in fact any other measures that may be deemed conducive to the safeguard of our interests, and in case that oppositions and/or observations are presented to intervene as complainant and defendant, with all necessary legal faculties, as well as to file jurisdictional processes related to disloyal competition. This power of attorney includes the faculties to receive, desist, compromise, transact substitute it in all or in part, to revoke substitutions, to conciliate, to receive notifications and to appoint extra-judicial or judicial attorneys.

3 Date: Dado y firmado en (3)..... Given and signed in (3)..... Irvine, California

April 12, 2005

4 Applicant's signature

4)Signature (s)

Martin A. Voet
Assistant Secretary

Rosa Mercedes Romero Pinto
Notaría Treinta
DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ
COLOMBIA
23 SEP 2011
ESTE DOCUMENTO ES COPIA DEL ORIGINAL QUE FUE PRESENTADA PARA EL PRESENTE DILIGENCIA DE AUTENTICACIÓN

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by TAMARA J. HALLEN*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of TAMARA J. HALLEN, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 21st day of April 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 236021*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*

BRUCE McPHERSON
Secretary of State

BY

NP-24 A (REV. 2-05)

OSP 05 88438

4

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of Orange } ss.

On April 12, 2005 (Date) before me, Tamara J. Hallen, Notary Public (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")),

personally appeared Martin A. Voet (Name(s) of Signer(s)),

☑ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/~~she/they~~ executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity(~~ies~~), and that by his/~~her/their~~ signature(~~s~~) on the instrument the person(~~s~~), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

TAMARA J. HALLEN
Commission # 1414872
Notary Public - California
Orange County
My Comm. Expires May 29, 2007

WITNESS my hand and official seal.

Tamara J. Hallen
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: General Power of Attorney - Colombia

Document Date: April 12, 2005 Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: none

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: Martin A. Voet

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): Assistant Secretary
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other:

Signer Is Representing: Allergan, Inc.

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

Rosa Mercedes Romero Pinto
Notaria Treinta
DEL CIRCULO DE BOGOTA
23 SEP 2011
ESTE DOCUMENTO ES COPIA DEL ORIGINAL QUE FUE PRESENTADA PARA ESTA DILIGENCIA
30

Pedro Castillo Pineda Y Asoc.

AFFIDAVIT

I, (name), hereby solemnly and truly declare that I am (post of) for ALLERGAN, INC, domiciled at 2525 Dupont Drive, Irvine, California 92612, United States of America, Corporation organized in accordance with the laws of the State of ~~California~~ Delaware and that I am empowered to grant this declaration.

Signed this 19th day of July, 2006.

ALLERGAN, INC

By: (Signature)
Name

Martin A. Voet, Assistant Secretary

Note: Notarized and Legalized up by Apostille

Rosa Mercedes Romero Pinto Notaria
Notaria Treinta
DEL CIRCULO DE BOGOTA
COLOMBIA

23 SEP 2011

ESTE DOCUMENTO
ES COPIA DEL ORIGINAL
QUE FUE PRESENTADA PARA
DILIGENCIA DE AUTENTICACION

6

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by Angel Cardenas*
3. *acting in the capacity of Deputy Clerk-Recorder, County of Orange, State of California*
4. *bears the seal/stamp of the County of Orange, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 3rd day of August 2006*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 297443*
9. *Seal/Stamp:*

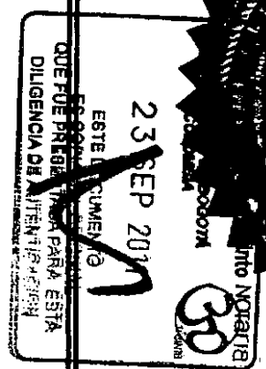


10. *Signature*

Secretary of State

BY





NP-24 A (REV. 4-05)

OSP 05 90772

STATE OF CALIFORNIA

County of Orange

I, **TOM DALY**, County Clerk-Recorder in and for said County, having by law a seal do hereby certify that **MARY LOU MC NOWN** whose name is subscribed to the attached certificate of acknowledgement, proof of affidavit, was at the time of taking such acknowledgment, proof or affidavit, a Notary Public IN AND FOR ORANGE COUNTY, duly commissioned and sworn and residing in said County, and was, as such, an officer of said State, duly authorized by the laws thereof to take and certify the same, as well as to take and certify the proof and acknowledgment of deeds and other instruments in writing to be recorded in said State, and that full faith and credit are and ought to be given to his official acts; that the impression of his official seal is not required by law to be filed in the office of the County Clerk-Recorder. I further certify that I am well acquainted with his hand writing and verily believe that the signature to the attached certificate is his genuine signature, and further that the annexed instrument is executed and acknowledged according to the laws of the State of California.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of said County Clerk-Recorder.

This 25th day of JULY 2006

TOM DALY
County Clerk-Recorder in and for
the County of Orange

By _____ Deputy
ANGEL CARDENAS

Rosa Mercedes Romero Pinto Notaria
Notaria Treinta
DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ
COLOMBIA
23 SEP 2011
ESTE DOCUMENTO
ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL
QUE FUE PRESENTADA PARA ESTA
DILIGENCIA DE AUTENTICACIÓN

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of ORANGE } ss.

On JULY 19 2006 Date before me, MARY LOU MCNOWN, NOTARY PUBLIC
Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared MARTIN A. VOET
Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Mary Lou McNown
Signature of Notary Public

MARY LOU MC NOWN
Commission # 1431736
Notary Public - California
Orange County
My Comm. Expires Aug 16, 2007

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☒ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

Trustees Roberto Pinto and Maria Trieta
ESTE DOCUMENTO ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA Y QUE PRESENTA UNA APARIENCIA DE DILIGENCIA

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
16 September 2010 (16.09.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/105236 A1

(51) International Patent Classification:
G01N 33/50 (2006.01) *C12Q 1/37* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/027244

(22) International Filing Date:
12 March 2010 (12.03.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/160,217 13 March 2009 (13.03.2009) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **ALLERGAN, INC.** [US/US]; 2525 Dupont Drive, Irvine, CA 92612 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **WANG, Joanne** [US/US]; 37 Bristlecone, Irvine, CA 92620 (US). **ZHU, Hong** [US/US]; 11408 Pacific Shores Way, San Diego, CA 92130 (US). **HODGES, D., Diane** [US/US]; 14351 Pinewood Road, Tustin, CA 92780 (US). **FERNANDEZ-SALES, Ester** [US/US]; 1710 Rocky Road, Fullerton, CA 92831 (US).

(74) Agents: **GERMAN, Joel, B.** et al.; Allergan, Inc., 2525 Dupont Drive, Irvine, CA 92512 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

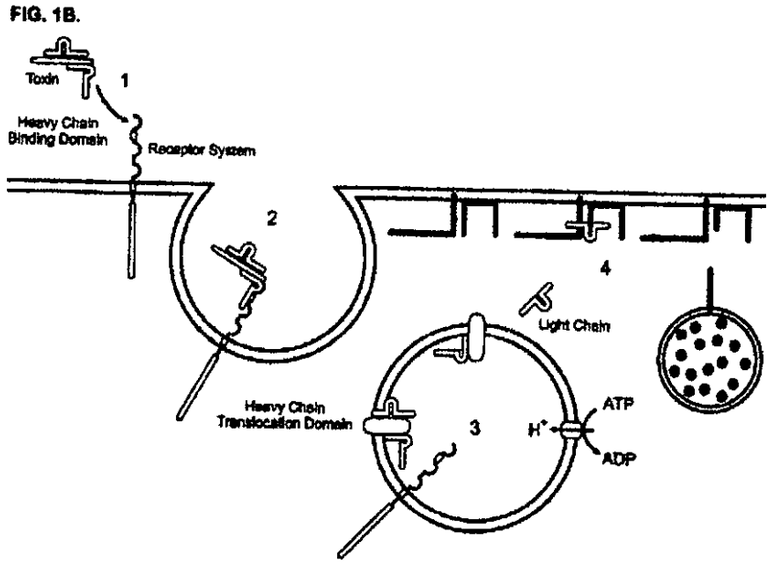
— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: IMMUNO-BASED RETARGETED ENDOPEPTIDASE ACTIVITY ASSAYS

FIG. 1B.



(57) Abstract: The present specification discloses SNAP-25 immune response inducing compositions, methods of making α-SNAP-25 antibodies that selectively binds to an epitope comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, α-SNAP-25 antibodies that selectively bind to an epitope comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, methods of detecting retargeted endopeptidase activity, and methods of detecting neutralizing α-re-targeted endopeptidase antibodies.

WO 2010/105236 A1

Immuno-Based Retargeted Endopeptidase Activity Assays

[01] This patent application claims priority pursuant to 35 U.S.C. § 119(e) to U. S. Provisional Patent Application Serial No. 61/160,217 filed March 13, 2009, which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[02] The sequences discosed in the present specification are contained in the Sequence Listing submitted with the present specification which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[03] The ability of Clostridial toxins, such as, *e.g.*, Botulinum neurotoxins (BoNTs), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F and BoNT/G, and Tetanus neurotoxin (TeNT), to inhibit neuronal transmission are being exploited in a wide variety of therapeutic and cosmetic applications, see e.g., William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin (Slack, Inc., 2004). Clostridial toxins commercially available as pharmaceutical compositions include, BoNT/A preparations, such as, e.g., BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, England), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Germany), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, South Korea), BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China); and BoNT/B preparations, such as, e.g., MYOBLOC®/NEUROBLOC® (Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA). As an example, BOTOX® is currently approved in one or more countries for the following indications: achalasia, adult spasticity, anal fissure, back pain, blepharospasm, bruxism, cervical dystonia, essential tremor, glabellar lines or hyperkinetic facial lines, headache, hemifacial spasm, hyperactivity of bladder, hyperhidrosis, juvenile cerebral palsy, multiple sclerosis, myoclonic disorders, nasal labial lines, spasmodic dysphonia, strabismus and VII nerve disorder.

[04] A Clostridial toxin treatment inhibits neurotransmitters and neuropeptide release by disrupting the exocytotic process used to secrete the neurotransmitters and neuropeptides into the synaptic cleft. There is a great desire by the pharmaceutical industry to expand the use of Clostridial toxin therapies beyond its current myo-relaxant applications to treat sensory nerve-based ailment, such as, e.g., various kinds of chronic pain, neurogenic inflammation and urogenital disorders, as well as other disorders, such as, e.g., pancreatitis. One approach that is currently being exploited to expand Clostridial toxin-based therapies *involves modifying a* Clostridial toxin so that the *modified* toxin has an altered cell targeting capability for a neuronal or non-nuronal cell of interest. Called either re-targeted endopeptidase or Targeted Vesicular Exocytosis Modulator Proteins (TVEMPs), these molecules achieve their exocytosis inhibitory effects by using a target receptor present on the neuronal or non-neuronal target cell of interest. This re-targeted capability is achieved by replacing a naturally-occurring binding domain of a Clostridial toxin with a targeting domain showing a selective binding activity for a non-Clostridial toxin receptor present in a neuronal or non-neuronal target cell of interest. Such modifications to a binding domain result in a molecule that is able to selectively bind to a non-Clostridial toxin receptor present on the target cell. A re-

targeted endopeptidase can bind to a target receptor, translocate into the cytoplasm, and exert its proteolytic effect on the SNARE complex of the neuronal or non-neuronal target cell of interest.

[05] One group of re-targeted endopeptidase comprises molecules having an opioid targeting domain. These opioid re-targeted endopeptidases comprise an opioid targeting domain, a Clostridial toxin translocation domain, and a Clostridial toxin enzymatic domain. Non-limiting examples of opioid re-targeted endopeptidase, or opioid-TVEMPs, are described in, *e.g.*, Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. Patent 5,989,545; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, U.S. Patent 7,132,259; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. Patent 7,244,437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. Patent 7,413,742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. Patent 7,415,338; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. Patent 7,514,088; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, U.S. Patent Publication 2008/0064092; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, U.S. Patent Publication 2009/0035822; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. Patent Publication 2009/0048431; Keith A. Foster, *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, U.S. Patent Publication 2009/0162341; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, International Patent Publication WO 2005/023309; and Lance E. Steward, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells*, International Patent Application WO 2008/008805; each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[06] One general difference between re-targeted endopeptidases and Clostridial toxins is that because re-targeted endopeptidases typically do not target motor neurons, the lethality associated with over-dosing a mammal with a re-targeted endopeptidase is greatly minimized, if not avoided altogether. For example, opioid re-targeted endopeptidases can be administered at 10,000 times the therapeutically effective dose before evidence of lethality is observed, and this lethality is due to the passive diffusion of the molecule and not via the intoxication process. Thus, for all practical purposes re-targeted endopeptidases are non-lethal molecules. Although this non-lethal property is of great therapeutic benefit, a manufacturing problem arises because the standard activity assay used to manufacture Clostridial toxin-based biologics is a mouse LD_{50} bioassay, a lethality test. S. S. Arnon et al., JAMA 285: 1059-1070 (2001). Currently a mouse LD_{50} bioassay is used by all pharmaceutical manufacturers to express the potency of their Clostridial toxin preparations. In fact, the activity units for Clostridial toxins are mouse LD_{50} units. However, because re-targeted endopeptidases are essentially non-lethal, a mouse LD_{50} bioassay cannot be used to assess the potency of these molecules. Thus, a simple, reliable, validated, and governmental agency acceptable activity assay that can evaluate the integrity of all the steps necessary in re-targeted endopeptidase uptake would be of significant value.

12

[07] The present specification provides novel compositions, cells, and methods for assaying the activity of re-targeted endopeptidases useful for various industries, such as, *e.g.*, the pharmaceutical and food industries, and provides related advantages as well. Such compositions, cells, and methods do not use live animals or tissues taken from live animals, but can evaluate all the steps necessary for re-targeted endopeptidase action.

DETAILED DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[08] **FIG. 1** shows a schematic of the current paradigm of neurotransmitter release and Clostridial toxin intoxication in a central and peripheral neuron. FIG. 1A shows a schematic for the neurotransmitter release mechanism of a central and peripheral neuron. The release process can be described as comprising two steps: 1) vesicle docking, where the vesicle-bound SNARE protein of a vesicle containing neurotransmitter molecules associates with the membrane-bound SNARE proteins located at the plasma membrane; and 2) neurotransmitter release, where the vesicle fuses with the plasma membrane and the *neurotransmitter molecules are exocytosed. FIG. 1B shows a schematic of the intoxication mechanism* for tetanus and botulinum toxin activity in a central and peripheral neuron. This intoxication process can be described as comprising four steps: 1) receptor binding, where Clostridial toxin binds to a Clostridial receptor complex and initiates the intoxication process; 2) complex internalization, where after toxin binding, a vesicle containing a toxin/receptor system complex is endocytosed into the cell; 3) light chain translocation, where multiple events are thought to occur, including changes in the internal pH of the vesicle, formation of a channel pore comprising the H_N domain of Clostridial toxin heavy chain, separation of the Clostridial toxin light chain from the heavy chain, and release of the light chain and 4) enzymatic target modification, where the light chain of Clostridial toxin proteolytically cleaves its target SNARE substrates, such as, *e.g.*, SNAP-25, VAMP or Syntaxin, thereby preventing vesicle docking and neurotransmitter release.

[09] **FIG. 2** shows a full dose response to the re-targeted endopeptidase Noc/A in the ORL-1Clone #6 clonal cell line overexpressing ORL-1. Specific uptake of Noc/A can be observed in the ORL-1Clone #6 clonal cell line overexpressing ORL-1. The treatment with Noc/A (LHN/A plus binding ligand nociceptin variant) and LH_N/A (LC/A and H_N without any binding domain) performed on ORL-1 stable cell line clone #6 in the ECL ELISA for cleaved $SNAP\text{-}25_{197}$ demonstrated that uptake of Noc/A is specific in this clonal cell line. The clonal cell line also show great sensitivity for Noc/A with an EC_{50} of 1.2 nM.

[010] **FIG. 3** shows a full dose response to Noc/A in the SK-N-DZ single-cell derived clones #3 and #22. Specific uptake of Noc/A on SK-N-DZ clones #3 and #22 when compared to LH_N/A (n=4 independent experiments run). Cells were plated on poly-D-lysine 96-well plates in RPMI SFM +N2+B27+NGF. Treatment with compounds was for 22 hours. ECL ELISA for cleaved $SNAP\text{-}25_{197}$ demonstrated that uptake of Noc/A is specific in this clonal cell lines. The clonal cell lines also show great sensitivity for Noc/A with an EC_{50} of 0.3 nM for clone #3 and an EC_{50} of 0.9 nM for clone #22.

13

[011] FIG. 4 shows an ECL sandwich ELISA assay results from ORL1 ND7 clones 1C11, 4B7, and 4C9 treated with re-targeted endopeptidase Noc/A. Parental ND7 and ORL1 ND7 clones were treated for 24 hours with Noc/A followed by two days of incubation. Parental ND7 EC_{50} could not be calculated since it only reached approximately 50% SNAP-25_{197} cleavage. Clones 4B7 and 1C11 reach more than 80% SNAP-25_{197} cleavage. EC_{50} values were calculated to be 5.7±0.5, 6.7±1, and 8.6±2 nM respectively.

[012] FIG. 5 shows an anti-nociceptin polyclonal antibodies can block re-targeted endopeptidase Noc/A uptake in SK-N-DZ clone #3, clone #22, and AGN P33 ORL-1 clone #6 cell lines. Cells were plated on poly-D-lysine 96-well plates in RPMI SFM+N2+B27+NGF and treated for 22 hours in serum-free media containing with the Anti-nociceptin polyclonal antibodies at different dilutions (0-3 µg/mL) in 1 nM Noc/A.

[013] FIG. 6 shows cells from SiMa clone AF4 and the established cell line PC-12 were treated with the re-targeted endopeptidase Dyn/A at concentrations from 0.017 nM to 1 µM as depicted in the Western blot image. Dose-dependent uptake could be observed for both cell lines.

[014] FIG. 7 shows normalized BIAcore SPR curves of 7.8 nM of the antibodies 2E2A6, 1D3B8, 3C1A5 and 2C9B10 and commercial MC-6050 and MC-6053. FIG. 7A shows the normalized data for the on-rate of each antibody. FIG. 7B shows the normalized data for the off-rate of each antibody.

DETAILED DESCRIPTION

[015] The present specification provides novel assays for determining the presence or absence of an active retargeted endopeptidase in a sample and for determining the activity/potency of a re-targeted endopeptidase. The novel cell-based assays disclosed in the present specification rely on cells, reagents and detection methods that enable the assay to detect nanomolar quantities of a re-targeted endopeptidase in a sample. The cell-based assays disclosed in the present specification serve to analyze multiple functions a re-targeted endopeptidase, namely, re-targeted endopeptidase binding to a cell surface receptor, internalization of the endopeptidase-receptor complex, enzymatic domain translocation into the cytoplasm, enzymatic domain cleavage of substrate. As discussed further below, the novel methods and compositions can be used to analyze crude and bulk samples as well as highly purified di-chain re-targeted endopeptidases and formulated re-targeted endopeptidase products and further are amenable to automated high throughput assay formats.

[016] Thus, one aspect disclosed in the present specification provides immune response inducing compositions for producing α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to an epitope comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. Immune response inducing compositions can comprise an adjuvant and an immune response inducing composition including a SNAP-25 antigen, a carrier linked to a SNAP-25 antigen, or a

4

carrier linked to a flexible spacer linked to a SNAP-25 antigen, where the flexible linker intervenes between the SNAP-25 antigen and the carrier. It is envisioned that any and all SNAP-25 antigens that triggers an immune response that produce a α-SNAP-25 antibody that can selectively bind to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be useful as a SNAP-25 antigen, including, without limitation, a SNAP-25 antigen derived from a naturally occurring SNAP-25, a SNAP-25 antigen derived from a non-naturally occurring SNAP-25, and a SNAP-25 antigen comprising an immunoreactive fragment of the SNAP-25, the SNAP-25 from a naturally occurring SNAP-25 or a non-naturally occurring SNAP-25. SNAP-25 antigens useful for producing α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond include, without limitation, SNAP-25 antigens comprising a SNAP-25 peptide having a carboxylated C-terminal glutamine linked to a carrier peptide, including, without limitation SEQ ID NO: 38. Other immune response inducing compositions useful for making α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond include, without limitation, an immune response inducing composition comprising a carrier linked to a flexible linker linked to a SNAP-25 antigen a carboxylated C-terminal glutamine, wherein the flexible linker intervenes between the SNAP-25 antigen and the carrier. It is envisioned that any and all adjuvants can be useful in such an immune response inducing composition, including, without limitation, polyethylene glycol (PEG), monomethoxypolyethylene glycol (mPEG), polyvinyl alcohol (PVA), complete and incomplete Freund's adjuvant.

[017] Another aspect disclosed in the present specification provides methods of producing an α-SNAP-25 antibody that can selectively bind to an epitope comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. Aspects of this method comprise the steps of (a) administering to an animal a SNAP-25 immune response inducing composition disclosed in the present specification; (b) collecting from the animal a sample containing an α-SNAP-25 antibody or α-SNAP-25 antibody-producing cell; and (c) isolating the α-SNAP-25 antibody from the sample. The methods disclosed are useful for making either α-SNAP-25 monoclonal antibodies that can selectively bind to an epitope comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond or α-SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to an epitope comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

[018] Still another aspect disclosed in the present specification provides α-SNAP-25 antibodies that selectively bind to an epitope comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. Such α-SNAP-25 antibodies include both naturally-occurring and non-naturally-occurring antibodies, as well as, monoclonal α-SNAP-25 antibodies or polyclonal α-SNAP-25 antibodies. Monoclonal α-SNAP-25 antibodies useful as α-SNAP-25 antibodies that selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile

bond, include, without limitation, the monoclonal α-SNAP-25 antibodies produced from hybridoma cell lines 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 and 3C3E2.

[019] Yet another aspect disclosed in the present specification provides immuno-based methods of detecting re-targeted endopeptidase activity. Aspects of this method comprise the steps of (a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a re-targeted endopeptidase, wherein the cell from an established cell line is susceptible to re-targeted endopeptidase activity by the re-targeted endopeptidase; (b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; (c) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody disclosed in the present specification; and (d) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; wherein detection by the antibody-antigen complex is indicative of re-targeted endopeptidase activity. The α-SNAP-25 antibody of step (c) can optionally be linked to a solid phase support.

[020] Yet another aspect disclosed in the present specification provides immuno-based methods of detecting opioid-TVEMP activity. Aspects of this method comprise the steps of (a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a re-targeted endopeptidase, wherein the cell from an established cell line can uptake a re-targeted endopeptidase; (b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; (c) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody disclosed in the present specification; and (d) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; wherein detection by the antibody-antigen complex is indicative of re-targeted endopeptidase activity. The α-SNAP-25 antibody of step (c) can optionally be linked to a solid phase support.

[021] A further aspect disclosed in the present specification provides methods of determining re-targeted endopeptidase immunoresistance in a mammal. Aspects of this method comprise the steps of (a) adding a re-targeted endopeptidase to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α-re-targeted endopeptidase neutralizing antibodies; (b) treating a cell from an established cell line with the test sample, wherein the cell from an established cell line is susceptible to re-targeted endopeptidase activity; (c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; (d) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody disclosed in the present specification; (e) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; (f) repeating steps a-e with a negative control sample instead of a

test sample; and (g) comparing the amount of antibody-antigen complex detected in step (e) to the amount of antibody-antigen complex detected in step (f), wherein detection of a lower amount of antibody-antigen complex detected in step (e) relative to the amount of antibody-antigen complex detected in step (f) is indicative of the presence of α-re-targeted endopeptidase neutralizing antibodies. The α-SNAP-25 antibody of step (d) can optionally be linked to a solid phase support. The control sample in step (f) can also include a positive control sample, in addition to the negative control sample.

[022] Clostridia toxins produced by *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum* are the most widely used in therapeutic and cosmetic treatments of humans and other mammals. Strains of *C. botulinum* produce seven antigenically-distinct serotypes of botulinum toxins (BoNTs), which have been identified by investigating botulism outbreaks in man (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E and BoNT/F), animals (BoNT/C1 and BoNT/D), or isolated from soil (BoNT/G). While all seven botulinum toxin serotypes have similar structure and biological properties, each also displays heterogeneous characteristics, such as, *e.g.*, different pharmacological properties. In contrast, tetanus toxin (TeNT) is produced by a uniform group of *C. tetani*. Two other species of Clostridia, *C. baratii* and *C. butyricum*, also produce toxins similar to BoNT/F and BoNT/E, respectively.

[023] Clostridial toxins are each translated as a single chain polypeptide of approximately 150 kDa that is subsequently cleaved by proteolytic scission within a disulfide loop by a naturally-occurring protease, such as, e.g., an endogenous Clostridial toxin protease or a naturally-occurring protease produced in the environment. This posttranslational processing yields a di-chain molecule comprising an approximately 50 kDa light chain (LC) and an approximately 100 kDa heavy chain (HC) held together by a single disulfide bond and noncovalent interactions. Each mature di-chain molecule comprises three functionally distinct domains: 1) an enzymatic domain located in the LC that includes a metalloprotease region containing a zinc-dependent endopeptidase activity which specifically targets core components of the neurotransmitter release apparatus; 2) a translocation domain contained within the amino-terminal half of the HC (H_N) that facilitates release of the LC from intracellular vesicles into the cytoplasm of the target cell; and 3) a binding domain found within the carboxyl-terminal half of the HC (H_C) that determines the binding activity and binding specificity of the toxin to the receptor complex located at the surface of the target cell.

[024] The binding, translocation and enzymatic activity of these three functional domains are all necessary for toxicity. While all details of this process are not yet precisely known, the overall cellular intoxication mechanism whereby Clostridial toxins enter a neuron and inhibit neurotransmitter release is similar, regardless of serotype or subtype. Although the applicants have no wish to be limited by the following description, the intoxication mechanism can be described as comprising at least four steps: 1) receptor binding, 2) complex internalization, 3) light chain translocation, and 4) enzymatic target modification (FIG. 1). The process is initiated when the HC domain of a Clostridial toxin binds to a toxin-specific receptor system located on the plasma membrane surface of a target cell. The binding specificity

19

of a receptor complex is thought to be achieved, in part, by specific combinations of gangliosides and protein receptors that appear to distinctly comprise each Clostridial toxin receptor complex. Once bound, the toxin/receptor complexes are internalized by endocytosis and the internalized vesicles are sorted to specific intracellular routes. The translocation step appears to be triggered by the acidification of the vesicle compartment. This process seems to initiate important pH-dependent structural rearrangements that increase hydrophobicity, promote pore formation, and facilitate separation of the heavy and light chains of the toxin. Once separated, the light chain endopeptidase of the toxin is released from the intracellular vesicle into the cytosol where it appears to specifically target core components of the neurotransmitter release apparatus. These core proteins, vesicle-associated membrane protein (VAMP)/synaptobrevin, synaptosomal-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) and Syntaxin, are necessary for synaptic vesicle docking and fusion at the nerve terminal and constitute members of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein-receptor (SNARE) family. BoNT/A and BoNT/E cleave SNAP-25 in the carboxyl terminal region, releasing a nine or twenty six amino acid fragment, respectively, and BoNT/C1 also cleaves SNAP-25 near the carboxyl terminus releasing an eight amino acid fragment. The botulinum serotypes BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F and BoNT/G, and tetanus toxin, act on the conserved central portion of VAMP, and release the amino terminal portion of VAMP into the cytosol. BoNT/C1 cleaves syntaxin at a single site near the cytosolic membrane surface. The selective proteolysis of synaptic SNAREs accounts for the block of neurotransmitter release caused by Clostridial toxins in vivo. The SNARE protein targets of Clostridial toxins are common to exocytosis in a variety of non-neuronal types; in these cells, as in neurons, light chain peptidase activity inhibits exocytosis, see, e.g., Yann Humeau et al., *How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release*, 82(5) Biochimie. 427-446 (2000); Kathryn Turton et al., *Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility*, 27(11) Trends Biochem. Sci. 552-558. (2002); Giovanna Lalli et al., *The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons*, 11(9) Trends Microbiol. 431-437, (2003).

[025] Re-targeted endopeptidases generally substitute the naturally-occurring di-chain loop protease cleavage site with an exogenous protease cleavage site. *See e.g.*, Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. Patent 7,419,676, which is hereby incorporated by reference. Although re-targeted endopeptidases vary in their overall molecular weight because of the size of the targeting moiety, the activation process and its reliance on cleavage at the exogenous cleavage site to produce a di-chain molecule is essentially the same as that for Clostridial toxins. *See e.g.*, Steward, L.E. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. Patent Publication 2009/0005313; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, U.S. Patent Application 11/776,075; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity for Clostridial Toxin Target Cells*, U.S. Patent Publication 2008/0241881, each of which is hereby incorporated by reference.

[026] Aspects of the present disclosure comprise, in part, an immune response inducing composition for producing α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. As used herein, the term "immune response inducing composition" refers to a composition comprising a SNAP-25 antigen which, when administered to an animal, stimulates an immune response against the SNAP-25 antigen, thereby producing α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. The term "immune response" refers to any response by the immune system of an animal to an immune response inducing composition. Exemplary immune responses include, but are not limited to, cellular as well as local and systemic humoral immunity, such as, *e.g.*, CTL responses, including antigen-specific induction of CD8+ CTLs, helper T-cell responses, including T-cell proliferative responses and cytokine release, and B-cell responses including, *e.g.*, an antibody producing response. The term "inducing an immune response" refers to administration of an immune response inducing composition or a polynucleotide encoding the immune response inducing composition, where an immune response is affected, *i.e.*, stimulated, initiated or induced.

[027] An SNAP-25 immune response inducing composition comprises a SNAP-25 antigen. As used herein, the term "antigen" refers to a molecule that elicits an immune response and includes, without limitation, peptides, polysaccharides and conjugates of lipids, such as, *e.g.*, lipoproteins and glycolipids. As used herein, the term "SNAP-25 antigen" refers to any antigen which has a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond that can elicit an immune response. A SNAP-25 antigen used in an immune response inducing composition must be large enough to be substantially unique in sequence, thus reducing the possibility of producing antibodies that are cross reactive against antigens other than SNAP-25. In addition, a SNAP-25 antigen used in an immune response inducing composition must be small enough to only trigger an immune response substantially against a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, thus increasing the possibility of producing α-SNAP-25 antibodies that can distinguish a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 lacking a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. Furthermore, it is also very desirable to generate α-SNAP-25 antibodies of a single amino acid sequence in a good yield that are reproducibly selective and which bind with acceptable avidity in order to permit the design of a highly sensitive assay.

[028] The sequence surrounding a BoNT/A cleavage site present in SNAP-25 is denoted as P_5–P_4–P_3–P_2–P_1–P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5', with P_1–P_1' representing the scissile bond. Upon cleavage by retargeted endopeptidase, the resulting cleavage products produced comprise a fragment including the P_5–P_4–P_3–P_2–P_1 sequence and a fragment including the P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5'. Thus, as used herein, the term "SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond" refers to any SNAP-25 having the P_1 residue as its carboxyl-terminal amino acid. For example, Q_{197}–R_{198} of human SNAP-25 (SEQ ID NO: 5) represents the P_1–P_1' scissile bond for the BoNT/A cleavage site. As

such, "SNAP-25 having a carboxyl-terminus glutamine of the BoNT/A cleavage site scissile bond" would be any SNAP-25 cleavage product having a glutamine at its carboxyl-terminal amino acid where the glutamine represents Q_{197} of the scissile bond. As another example, K_{204}–H_{205} of *Torpedo marmorata* SNAP-25 (SEQ ID NO: 16) represents the P_1–P_1' scissile bond for the BoNT/A cleavage site. As such, "SNAP-25 having a carboxyl-terminus lysine of the BoNT/A cleavage site scissile bond" would be any SNAP-25 cleavage product having a lysine at its carboxyl-terminal amino acid where the lysine represents K_{204} of the scissile bond.

[029] The SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from the BoNT/A cleavage site can be modified to enhance the immunogenicity of a SNAP-25 antigen, a hapten, or any other antigenic compound that is immunogenic, non-immunogenic, or weakly immunogenic when not associated with the modification. In an aspect of this embodiment, the carboxyl-terminal P_1 residue from the scissile bond of a SNAP-25 antigen can be carboxylated. Carboxylation increases the desired immunogenic properties of a SNAP-25 antigen in two respects. First, because charged amino acids enhance immunogenicity, adding a COO^- group to the carboxyl-terminal residue will increase the overall immunogenicity of a SNAP-25 antigen. Second, because the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond is in a charged state upon cleavage, adding a COO^- group to the carboxyl-terminal residue will better mimic the actual antigen that the α-SNAP-25 antibodies disclosed in the present specification are designed to selectively bind.

[030] In an aspect of this embodiment, the amino-terminal residue from a SNAP-25 antigen can be modified by the addition of an amino acid adapted to attach the SNAP-25 antigen to a carrier protein, such as, *e.g.*, a keyhole limpet hemacyanin (KLH), an ovalbumin (OVA), a thyroglobulin (THY), a bovine serum albumin (BSA), a soybean trypsin inhibitor (STI), or a multiple attachment peptide (MAP). For example, a cysteine residue can be placed at the amino-terminus in order to conjugate the carrier protein KLH.

[031] Thus, an embodiment, a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be, *e.g.*, at least 5, at least 6, at least 7, at least 8, at least 9, at least 10, at least 11, at least 12, at least 13, at least 14, at least 15, at least 16, at least 17, at least 18, at least 19, at least 20, at least 25, or at least 30 amino acids in length. In another embodiment, a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be, *e.g.*, at most 5, at most 6, at most 7, at most 8, at most 9, at most 10, at most 11, at most 12, at most 13, at most 14, at most 15, at most 16, at most 17, at most 18, at most 19, at most 20, at most 25, or at most 30 amino acids in length. In still another embodiment, a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be, *e.g.*, between 7-12 amino acids, between 10-15 amino acids, or between 13-18 amino acids.

[032] In another embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 33. In aspects of this embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, or SEQ ID NO: 39. In a further embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 40.

[033] In yet another embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 41. In aspects of this embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46. In a further embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 47.

[034] It is envisioned that any and all SNAP-25 antigens that triggers an immune response that produces α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be useful as a SNAP-25 antigen. Thus, amino acid sequence variants comprising SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, or SEQ ID NO: 46 can be useful as a SNAP-25 antigen to trigger an immune response that produces α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. Thus, in an embodiment, a SNAP-25 antigen can substitute at least 1, at least 2, at least 3, at least 4, or at least 5 amino acid substitutions, deletions or additions to the SNAP-25 antigens comprising SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, or SEQ ID NO: 46. In still another embodiment, a SNAP-25 antigen can have at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity to the SNAP-25 antigens comprising SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, or SEQ ID NO: 46.

[035] It is envisioned that one or more carriers may be linked to a SNAP-25 antigen in order to enhance the immunogenicity of a SNAP-25 antigen that is immunogenic, non-immunogenic, or weakly immunogenic when not associated with the carrier. Non-limiting examples, include, *e.g.*, a keyhole limpet hemacyanin (KLH), an ovalbumin (OVA), a thyroglobulin (THY), a bovine serum albumin (BSA), a soybean trypsin inhibitor (STI), or a multiple attachment peptide (MAP). As is well known in the art, a non-antigenic or weakly antigenic antigen can be made antigenic by coupling the antigen to a carrier. Various other carrier and methods for coupling an antigen to a carrier are well known in the art. See, *e.g.*,

Harlow and Lane, supra, 1998a; Harlow and Lane, supra, 1998b; and David W. Waggoner, Jr. et al., *Immunogenicity-enhancing carriers and compositions thereof and methods of using the same*, U.S. Patent Publication No. 20040057958 (Mar. 25, 2004). An epitope can also be generated by expressing the epitope as a fusion protein. Methods for expressing polypeptide fusions are well known to those skilled in the art as described, for example, in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999). As the carboxyl-terminal end of the SNAP-25 antigen must be the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, a carrier must be linked to the amino end of the SNAP-25 antigen.

[036] It is envisioned that one or more flexible spacers may be linked to a SNAP-25 antigen in order to enhance the immunogenicity of a SNAP-25 antigen that is immunogenic, non-immunogenic, or weakly immunogenic when not associated with the flexible linkers. A flexible spacer increases the overall peptide length of the SNAP-25 antigen and provides flexibility, thereby facilitating the proper presentation of the SNAP-25 antigen to the immune cells. As a non-limiting example, a SNAP-25 immune response inducing composition can comprise a SNAP-25 antigen linked to one or more flexible spacers in tandem to better present SNAP-25 antigen to immune cells, thereby facilitating the immune response.

[037] A flexible space comprising a peptide is at least one amino acid in length and comprises non-charged amino acids with small side-chain R groups, such as, *e.g.*, glycine, alanine, valine, leucine or serine. Thus, in an embodiment a flexible spacer can be, *e.g.*, at least 1, at least 2, at least 3, at least 4, at least 5, at least 6, at least 7, at least 8, at least 9, or at least 10 amino acids in length. In another embodiment, a flexible spacer can be, *e.g.*, at least 1, at most 2, at most 3, at most 4, at most 5, at most 6, at most 7, at most 8, at most 9, or at most 10 amino acids in length. In still another embodiment, a flexible spacer can be, *e.g.*, between 1-3 amino acids, between 2-4 amino acids, between 3-5 amino acids, between 4-6 amino acids, or between 5-7 amino acids. Non-limiting examples of a flexible spacer include, *e.g.*, a G-spacers such as GGG, GGGG (SEQ ID NO: 57), and GGGGS (SEQ ID NO: 58) or an A-spacers such as AAA, AAAA (SEQ ID NO: 59) and AAAAV (SEQ ID NO: 60). A flexible spacer is linked in-frame to the SNAP-25 antigen as a fusion protein.

[038] As discussed above, a flexible spacer is used, in part, to increase the overall peptide length of the SNAP-25 antigen. For example, a 5-10 amino acid SNAP-25 antigen can have its overall length increased by linking a 3-5 amino acid flexible space to the amino-end of the SNAP-25 antigen. As another example, a 5-10 amino acid SNAP-25 antigen can have its overall length increased by linking a 4-6 amino acid flexible space to the amino-end of the SNAP-25 antigen. As another example, a 5-10 amino acid SNAP-25 antigen can have its overall length increased by linking a 7-10 amino acid flexible space to the amino-end of the SNAP-25 antigen. As another example, a 7-12 amino acid SNAP-25 antigen can have its overall length increased by linking a 1-3 amino acid flexible space to the amino-end of the SNAP-25 antigen. As another example, a 7-12 amino acid SNAP-25 antigen can have its overall length increased by linking a 4-6 amino acid flexible space to the amino-end of the SNAP-25 antigen.

The increased length provided by the flexible spacer allows for the selection of a small sized SNAP-25 antigen, thereby increasing the likelihood that the SNAP-25 antigen will only trigger an immune response substantially against a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, thus increasing the possibility of producing α-SNAP-25 antibodies that can distinguish a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 lacking a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

[039] It is envisioned that a SNAP-25 immune response inducing composition disclosed in the present specification can optionally comprise a SNAP-25 antigen disclosed in the present specification and one or more adjuvants. As used herein, the term "adjuvant" when used in reference to a SNAP-25 immune response inducing composition refers to any substance or mixture of substances that increases or diversifies the immune response to a SNAP-25 antigen. An immune response inducing adjuvant can, for example, serve to reduce the number of immunizations or the amount of antigen required for protective immunization. The use of immune response inducing adjuvants in an immune response inducing composition is well known. The main objective of these adjuvants is to allow an increase in the immune response. Non-limiting adjuvants include, *e.g.*, liposomes, oily phases, including, without limitation, the Freund type of adjuvants, such as, *e.g.*, Freund's complete adjuvant (FCA); Freund's incomplete adjuvant (FIA); sapogenin glycosides, such as, *e.g.*, saponins; carbopol; N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (commonly known as muramyl dipeptide or "MDP"); and lipopolysaccharide (LPS). Such adjuvants are generally used in the form of an emulsion with an aqueous phase, or, more commonly, may consist of water-insoluble inorganic salts. These inorganic salts may consist, for example, of aluminum hydroxide, zinc sulfate, colloidal iron hydroxide, calcium phosphate or calcium chloride. Aluminum hydroxide ($Al(OH)_3$) is a commonly used adjuvant. Currently, the only FDA-approved adjuvant for use in humans is aluminum salts (Alum) which are used to "depot" antigens by precipitation of the antigens. Adjuvants provided above are merely exemplary. In fact, any immune response inducing adjuvant may be used in an immune response inducing composition disclosed in the present specification as long as the adjuvant satisfies the requisite characteristics for inducing an immune response.

[040] A carrier disclosed in the present specification may also act as an adjuvant. Specific adjuvants and methods of making and using are described in, *e.g.*, Gupta et al. Vaccine, 11: 993-306, 1993; Amon, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987; and David W. Waggoner, Jr. et al., *Immunogenicity-Enhancing Carriers and Compositions Thereof and Methods of Using the Same*, U.S. Patent Publication No. 20040057958 (Mar. 25, 2004). Additional adjuvants include any compound described in Chapter 7 (pp 141-227) of "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell, M. F. and Newman, M. J.) Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Plenum Press (New York). Examples from this compendium include Muramyl Dipeptide (MDP) and Montanide 720. Molecules such as Poly Inosine:Cytosine (Poly I:C) or plasmid DNA containing CpG motifs can also be administered as adjuvants in combination with antigens encapsulated in microparticles. In another example, the

adjuvant is an agent that facilitates entry of the antigenic compound into the cytoplasm of a cell such as listeriolysin, streptolysin or a mixture thereof.

[041] Thus, in an embodiment, a SNAP-25 immune response inducing composition comprises a SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal glutamine linked to a carrier peptide. In aspects of this embodiment, a SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal glutamine comprises SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, or SEQ ID NO: 39. In another aspect of this embodiment, a SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 40. In aspects of this embodiment, the carrier peptide is a keyhole limpet hemacyanin (KLH), an ovalbumin (OVA), a thyroglobulin (THY), a bovine serum albumin (BSA), a soybean trypsin inhibitor (STI) or a multiple attachment peptide (MAP).

[042] In another embodiment, a SNAP-25 immune response inducing composition comprises a SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal lysine linked to a carrier peptide. In aspects of this embodiment, SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal lysine comprises SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, or SEQ ID NO: 46. In another aspect of this embodiment, a SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 47. In aspects of this embodiment, the carrier peptide is a keyhole limpet hemacyanin (KLH), an ovalbumin (OVA), a thyroglobulin (THY), a bovine serum albumin (BSA), a soybean trypsin inhibitor (STI) or a multiple attachment peptide (MAP).

[043] In yet another embodiment, a SNAP-25 immune response inducing composition comprises a SNAP-25 antigen having a carboxylated C-terminal glutamine linked to one or more flexible linkers and a carrier peptide wherein the flexible linkers intervene between the SNAP-25 antigen and the carrier peptide. In aspects of this embodiment, SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal glutamine comprises SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, or SEQ ID NO: 39. In another embodiment, a SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 46. In aspects of this embodiment, the carrier peptide is a keyhole limpet hemacyanin (KLH), an ovalbumin (OVA), a thyroglobulin (THY), a bovine serum albumin (BSA), a soybean trypsin inhibitor (STI) or a multiple attachment peptide (MAP). In aspects of this embodiment, the flexible linker is a G-spacer or an A-spacer.

[044] In still another embodiment, a SNAP-25 immune response inducing composition comprises a SNAP-25 antigen having a carboxylated C-terminal lysine linked to a flexible linker and a carrier peptide wherein the flexible linker intervenes between the SNAP-25 antigen and the carrier peptide. In aspects of this embodiment, SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal lysine comprises SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, or SEQ ID NO: 46. In another aspect of this embodiment, a SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 47. In aspects of this embodiment, the carrier peptide is a keyhole limpet hemacyanin (KLH), an ovalbumin (OVA), a thyroglobulin (THY), a bovine serum albumin (BSA), a soybean trypsin inhibitor (STI) or a multiple

attachment peptide (MAP). In aspects of this embodiment, the flexible linker is a G-spacer or an A-spacer.

[045] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a method for producing α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. An α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be produced by a wide variety of methods that are well known in the art. Specific protocols for making and using antibodies as well as detecting, and measuring antibody binding specificity, binding affinity and binding avidity are known in the art. *See, e.g.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998a); and USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL No. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001; and Current Protocols in Molecular Biology, 2004; David Anderson et al., *Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use*, U.S. Patent 7,034,132 (Apr. 25, 2005); and Beatriz M. Carreno et al., *Antibodies Against CTLA4*, U.S. Patent 7,034,121 (Apr. 25, 2006).

[046] As a non-limiting example, α-SNAP-25 polyclonal antibodies that selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be produced by injecting an animal, such as, *e.g.*, a rabbit, a goat, a mouse or another mammal, with one or more injections of an immune response inducing composition disclosed in the present specification. As another non-limiting example, α-SNAP-25 polyclonal antibodies that selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be produced by injecting an egg, such as, *e.g.*, a chicken egg, with one or more injections of an immune response inducing composition disclosed in the present specification. The antibody titer in the immunized animal can be monitored over time by standard techniques, such as with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized antigen or a cell-based activity assay. If desired, polyclonal antibodies for an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be isolated from the mammal (*e.g.*, from the blood) and further purified by well known techniques, such as protein A affinity chromatography to obtain the IgG fraction, or by affinity purification against the peptide used for producing the antibodies.

[047] As another non-limiting example, α-SNAP-25 monoclonal antibody that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be produced using a hybridoma method. See e.g., Chapter 6 *Monoclonal Antibodies*, pp. 196-244, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; and Chapter 7 *Growing Hybridomas*, pp. 245-282, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; and Goding, pp. 59-103, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986). In this method, a host animal, such as, e.g., a mouse, a hamster, or another appropriate host animal, is typically exposed to one or more injections of a SNAP-25 antigen disclosed in the present specification to elicit

lymphocytes that produce or are capable of producing α-SNAP-25 antibodies that will specifically bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. The antibody titer in the immunized animal can be monitored over time by standard techniques, such as with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized antigen or a cell-based activity assay. Alternatively, the lymphocytes can be immunized in vitro using a suitable cell culture line. At an appropriate time after immunization, *e.g.*, when the antibody titers are highest, antibody-producing cells are isolated from the animal. Generally, either peripheral blood lymphocytes are used, if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used, if non-human mammalian sources are desired. The isolated antibody-producing cells are fused with an immortal cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell. Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Typically, a murine myeloma cell line is fused with splenocytes harvested from an appropriately immunized mouse to produce the hybridoma. Preferred immortal cell lines are mouse myeloma cell lines that are sensitive to culture medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine (HAT). Any of a number of myeloma cell lines can be used as a fusion partner according to standard techniques, *e.g.*, the P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 or Sp2/O-Ag14 myeloma lines. Hybridoma cells resulting from the fusion are then selected using HAT medium, which kills unfused and unproductively fused myeloma cells (unfused splenocytes die after several days in culture because they are not transformed). The culture medium in which the hybridoma cells are grown can then be assayed for the presence of α-SNAP-25 monoclonal antibodies that selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. For example, hybridoma supernatants can be screened using α-SNAP-25 positive media in an immunoprecipitation assay, in vitro binding assay, such as, *e.g.*, a radioimmunoassay (RIA) or an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA), or in a cell-based activity assay. Such techniques and assays are known in the art. See e.g., Chapter 11 *Immunoprecipitation*, pp. 421-470, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; Chapter 12 *Immunoblotting*, pp. 471-510, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; Chapter 14 *Immunoassays*, pp. 553-612, Harlow & Lane, *supra*, 1998a. Additional studies can then be done to determine whether the antibody is also unreactive to a SNAP-25 lacking a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. The binding affinity of an α-SNAP-25 monoclonal antibody can also be determined, *e.g.*, by Scatchard analysis. *See, e.g.*, Peter J. Munson and David Rodbard, *Ligand: A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand-Binding Systems*, 107(1) Anal. Biochem. 220-239 (1980). After the desired hybridoma cells are identified, limiting dilution procedures are used to isolate clones originating from a single cell until a clonal cell line expressing the desired monoclonal antibody is obtained. Those antibodies sufficiently selective for a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond and bind with sufficiently high avidity are chosen for further characterization and study.

[048] Another alternative for preparing an α-SNAP-25 monoclonal antibody that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond is by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library, such as, *e.g.*, an antibody phage display

library, with a SNAP-25 peptide and isolate immunoglobulin library members that bind a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available, such as, e.g., the Recombinant Phage Antibody System (Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ); and the SurfZAP™ Phage Display Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Additionally, examples of methods and reagents useful in generating and screening antibody display library can be found in, for example, Ladner *et al.* U.S. Patent 5,223,409; Borrebaeck et al. U.S. Patent 5,712,089; Griffiths et al. U.S. Patent 5,885,793; Griffiths et al. U.S. Patent 5,962,255; McCafferty et al. U.S. Patent 5,969,108; Griffiths et al. U.S. Patent 6,010,884; Jespers et al. U.S. Patent 6,017,732; Borrebaeck et al. U.S. Patent 6,027,930; Johnson et al. U.S. Patent 6,140,471; McCafferty et al. U.S. Patent 6,172,197, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[049] Aspects of the present disclosure comprise, in part, collecting a sample containing an α-SNAP-25 antibody or α-SNAP-25 antibody-producing cells. As used herein, the term "sample containing an α-SNAP-25 antibody or α-SNAP-25 antibody-producing cell" refers to any biological matter that contains or potentially contains at least one an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. It is envisioned that any and all samples that can contain an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be used in this method, including, without limitation, blood, plasma, serum and lymph fluid. It is also envisioned that any cell capable of producing an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be used in this method, including, without limitation, a CD8 cells, a CTL cell, a helper T-cell and a B-cell. A variety of well known methods can be used for collecting from an individual a sample containing the α-SNAP-25 antibody or α-SNAP-25 antibody-producing cell, see, *e.g.*, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; and Harlow & Lane, *supra*, 1998b. Similarly, a variety of well known methods can be used for processing a sample to isolate an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. A procedure for collecting a sample can be selected based on the type of antibody to be isolated. As a non-limiting example, when isolating an α-SNAP-25 polyclonal antibodies that selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, an appropriate sample can be a blood sample containing such α-SNAP-25 antibodies, whereas when isolating an α-SNAP-25 monoclonal antibodies that selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, an appropriate sample can be an α-SNAP-25 antibody-producing cell such as a spleen cell or hybridoma.

[050] Aspects of the present disclosure comprise, in part, isolating an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from the sample. Methods of isolating an such α-SNAP-25 antibodies, such as, *e.g.*, α-SNAP-25 polyclonal antibodies that selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus

at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond or α-SNAP-25 monoclonal antibodies that selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond are well known to those skilled in the art. See, *e.g.*, Harlow and Lane, supra, 1998a; and Harlow and Lane, supra, 1998b. For example, such α-SNAP-25 polyclonal antibodies can be isolated from the sample by well known techniques, such as, *e.g.*, affinity chromatography using protein A or protein G, which provide primarily the IgG fraction of immune serum. Subsequently, or alternatively, a specific SNAP-25 antigen can be immobilized on a column or magnetic beads to purify the α-SNAP-25 polyclonal antibodies that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond by immunoaffinity chromatography. An α-SNAP-25 monoclonal antibody that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be isolated from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, *e.g.*, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

[051] Thus, in an embodiment, a method of producing a α-SNAP-25 antibody that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises the steps (a) administering to an animal a SNAP-25 immune response inducing composition comprising a SNAP-25 antigen having a carboxylated C-terminal glutamine linked to a carrier peptide; (b) collecting from the animal a sample containing an α-SNAP-25 antibody or α-SNAP-25 antibody-producing cell; and (c) isolating the α-SNAP-25 antibody component from the sample. In an aspect of this embodiment, the α-SNAP-25 antibody that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond is a polyclonal antibody. In another aspect of this embodiment, α-SNAP-25 antibody that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond is a monoclonal antibody. In a further aspect of this embodiment, an α-SNAP-25 monoclonal antibody that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond produced is an IgG subtype. In other aspects of this embodiment, SNAP-25 immune response inducing composition further comprises an adjuvant, such as, *e.g.*, polyethylene glycol (PEG), monomethoxypolyethylene glycol (mPEG), or polyvinyl alcohol (PVA).

[052] In another embodiment, a method of producing α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises the steps (a) administering to an animal a SNAP-25 immune response inducing composition comprising a SNAP-25 peptide having a carboxylated C-terminal glutamine linked to a flexible linker and a carrier peptide wherein the flexible linker intervenes between the SNAP-25 peptide and the carrier peptide; (b) collecting from the animal a sample containing an α-SNAP-25 antibody or α-SNAP-25 antibody-producing cell; and (c) isolating the α-SNAP-25 antibody from the sample. In an aspect of this embodiment, the α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond is a polyclonal antibody. In another

aspect of this embodiment, α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond is a monoclonal antibody. In a further aspect of this embodiment, α-SNAP-25 monoclonal antibody that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond produced in an IgG subtype. In other aspects of this embodiment, SNAP-25 immune response inducing composition further comprises an adjuvant, such as, *e.g.*, polyethylene glycol (PEG), monomethoxypolyethylene glycol (mPEG), or polyvinyl alcohol (PVA).

[053] Aspects of the present disclosure comprise, in part, an isolated α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. As used herein, the term "antibody" refers to a molecule generated by an immune system that was made in response to a particular antigen that specifically binds to that antigen, and includes both naturally occurring antibodies and non-naturally occurring antibodies. As used herein, the term "isolated" refers to separating a molecule from its natural environment by the use of human intervention. For example, an antibody can be a polyclonal antibody, a monoclonal antibody, a dimer, a multimer, a multispecific antibody, a humanized antibody, a chimeric antibody, bi-functional antibody, a cell-associated antibody like an Ig receptor, a linear antibody, a diabody, or a minibody, so long as the fragment exhibits the desired biological activity, and single chain derivatives of the same. An antibody can be a full-length immunoglobulin molecule comprising the V_H and V_L domains, as well as a light chain constant domain (C_L) and heavy chain constant domains, C_{H1}, C_{H2} and C_{H3}, or an immunologically active fragment of a full-length immunoglobulin molecule, such as, *e.g.*, a Fab fragment, a $F(ab')_2$ fragment, a Fc fragment, a Fd fragment, a Fv fragment. An antibody can be derived from any vertebrate species (*e.g.*, human, goat, horse, donkey, murine, rat, rabbit, or chicken), and can be of any type (*e.g.*, IgG, IgE, IgM, IgD, and IgA), class (*e.g.*, IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM) or subclass (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2). For general disclosure on the structure of naturally occurring antibodies, non-naturally occurring antibodies, and antigenic compound-binding fragments thereof, see, *e.g.*, Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrabeck, Antibody Engineering, 2d ed. (Oxford University Press 1995), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[054] Naturally-occurring antibodies are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end. The constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light-chain variable domain is aligned with the variable domain of the

heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light chain and heavy chain variable domains.

[055] The complete antigen-recognition and antigen-binding site is contained within the variable domains of the antibody, *i.e.*, the Fv fragment. This fragment includes a dimer of one heavy chain variable domain (V_H) and one light chain variable domain (V_L) in tight, non-covalent association. Each domain comprises four framework regions (FR), which largely adopting a β-sheet configuration, connected by three hypervariable regions, which form loops connecting, and in some cases form part of, the β-sheet structure. Each hypervariable region comprises an amino acid sequence corresponding to a complementarity determining region (CDRs). Collectively, it the three-dimensional configuration of the six CDR regions that define an antigen-binding site on the surface of the V_H–V_L dimmer that confers antigen-binding specificity. *See e.g.*, Cyrus Chothia, et al., *Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions*, Nature 342(6252): 877-883 (1989); Elvin A. Kabat, et al *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), each of which is incorporated by reference in its entirety. The constant domains of the antibody are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody dependent cellular cytotoxicity.

[056] A target antigen generally has one or more binding sites, also called epitopes, which are recognized by the CDR-formed antigen-binding site. As used herein, an "epitope" is synonymous with "antigenic determinant" and refers to the site on a target antigen, such as, *e.g.*, a peptide, polysaccharide or lipid-containing molecule, capable of specific binding to an immunoglobulin or T-cell receptor or otherwise interacting with a molecule. Each antibody that specifically binds to a different epitope has a different structure. Thus, one antigen may have more than one corresponding antibody.

[057] Polyclonal antibodies refer to a heterogeneous population of antibody molecules that contain at least two species of antibody capable of binding to a particular antigen. By definition, a polyclonal antibody includes two different antibodies that bind to at least two different epitopes. As used herein, the term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibodies" refer to a substantially homogeneous population of antibody molecules that contain only one species of antibody capable of binding a particular antigen *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. By definition, a monoclonal antibody binds to a single epitope. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibodies, each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they may be synthesized uncontaminated by other antibodies. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present disclosure may be

made by the hybridoma method first described by Kohler et al (1975) Nature 256:495, or may be made by recombinant DNA methods (see for example: U.S. Pat. No. 4,816,567; U.S. Pat. No. 5,807,715). The monoclonal antibodies may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597; for example.

[058] Thus, in an embodiment, an α-SNAP-25 antibody comprises a heavy chain variable domain (V_H) and a light chain variable domain (V_L) that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. In an aspect of this embodiment, the heavy chain variable domain (V_H) is SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, or SEQ ID NO: 133. In another aspect of this embodiment, the light chain variable domain (V_L) is SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, or SEQ ID NO: 92.

[059] In another embodiment, a nucleic acid sequence encodes an α-SNAP-25 antibody comprising a heavy chain variable domain (V_H) and a light chain variable domain (V_L) that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. In an aspect of this embodiment, the heavy chain variable domain (V_H) is encoded by the nucleic acid sequence SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, or SEQ ID NO: 132. In another aspect of this embodiment, the heavy chain variable domain (V_H) is encoded by a nucleic acid sequence that is at least 70% identical to, at least 75% identical to, at least 80% identical to, at least 85% identical to, at least 90% identical to, at least 95% identical, at least 96% identical, at least 97% identical, at least 98% identical, or at least 99% identical to SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, or SEQ ID NO: 132. In yet another aspect of this embodiment, the light chain variable domain (V_L) is encoded by SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, or SEQ ID NO: 91. In still another aspect of this embodiment, the light chain variable domain (V_L) is encoded by a nucleic acid sequence that is at least 70% identical to, at least 75% identical to, at least 80% identical to, at least 85% identical to, at least 90% identical to, at least 95% identical, at least 96% identical, at least 97% identical, at least 98% identical, or at least 99% identical to SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, or SEQ ID NO: 91.

[060] In another embodiment, an α-SNAP-25 antibody comprises a heavy chain variable domain (V_H) CDR1 region, a CDR2 region, a CDR3 region, or any combination thereof that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. In an aspect of this embodiment, the heavy chain variable domain (V_H) CDR1 region is SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, or SEQ ID NO: 120. In another aspect of this embodiment, the heavy chain variable domain (V_H) CDR2 region is SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, or SEQ ID NO: 123. In yet another aspect of this embodiment, the heavy chain variable domain (V_H) CDR3 region is SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 134, or SEQ ID NO: 135.

[061] In another embodiment, an α-SNAP-25 antibody comprises a light chain variable domain (V_L) CDR1 region, a CDR2 region, a CDR3 region, or any combination thereof that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. In an aspect of this embodiment, the light chain variable domain (V_L) CDR1 region is SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, or SEQ ID NO: 129. In another aspect of this embodiment, the light chain variable domain (V_L) CDR2 region is SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, or SEQ ID NO: 112. In yet another aspect of this embodiment, the light chain variable domain (V_L) CDR3 region is SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, or SEQ ID NO: 117.

[062] In yet another embodiment, an α-SNAP-25 antibody specifically binds an epitope comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. In an aspect of this embodiment, the epitope comprises SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, or SEQ ID NO: 37. In an aspect of this embodiment, the epitope comprises SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, or SEQ ID NO: 44.

[063] As discussed above, the sequence surrounding a BoNT/A cleavage site present in SNAP-25 is denoted P_5–P_4–P_3–P_2–P_1–P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5', with P_1–P_1' representing the scissile bond. Upon cleavage by BoNT/A, the resulting cleavage products produced comprise a fragment including the P_5–P_4–P_3–P_2–P_1 sequence and a fragment including the P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5'. As used herein, the term "α-SNAP-25 antibodies that selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond" refers to α-SNAP-25 antibodies that selectively bind to any SNAP-25 cleavage product fragment comprising the P_5–P_4–P_3–P_2–P_1 sequence, but not to any SNAP-25 cleavage product fragment comprising the P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5' sequence or to any SNAP-25 having an intact P_1–P_1' scissile bond of a BoNT/A cleavage site. As used herein, the term "α-SNAP-25_{197} antibody" refers to an antibody that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus P_1 residue that corresponds to glutamine 197 of SEQ ID NO: 5. As used herein, the term "α-SNAP-25_{204} antibody" refers to an antibody that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus P_1 residue that corresponds to lysine 204 of SEQ ID NO: 16.

[064] As used herein, the term "selectively" refers to having a unique effect or influence or reacting in only one way or with only one thing. As used herein, the term "selectively binds", or "selective binding" when made in reference to an antibody, refers to the discriminatory binding of the antibody to the indicated target epitope such that the antibody does not substantially cross react with non-target epitopes. The minimal size of a peptide epitope, as defined herein, is about five amino acids, and a peptide epitope typically comprises at least 5, at least 6, at least 7, at least 8, at least 9, at least 10, at least 15, or at least 20 amino acids. A peptide epitope may be discontinuous, *i.e.*, it comprises amino acid residues that are not adjacent in the primary structure of the peptide but are brought together into an epitope by way of the

secondary, tertiary, or quaternary structure of the peptide. Furthermore, it is also noted that an epitope might comprise a portion of a molecule other than an amino acid sequence, such as, *e.g.*, a carbohydrate moiety, a lipid moiety like lipoproteins or glycolipids, or a chemically-modified amino acid moiety like a phosphorylated amino acid. In aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can selectively bind a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprising at least 5, at least 6, at least 7, at least 8, at least 9, at least 10, at least 15, or at least 20 amino acids. In other aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can selectively bind a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprising at most 5, at most 6, at most 7, at most 8, at most 9, at most 10, at most 15, or at most 20 amino acids.

[065] Selective binding includes binding properties such as, *e.g.*, binding affinity, binding specificity, and binding avidity. See David J. King, *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*, pp. 240 (1998). Binding affinity refers to the length of time the antibody resides at its epitope binding site, and can be viewed as the strength with which an antibody binds its epitope. Binding affinity can be described an antibody's equilibrium dissociation constant (KD), which is defined as the ratio Kd/Ka at equillibrium. Where Ka is the antibody's association rate constant and kd is the antibody's dissociation rate constant. Binding affinity is determined by both the association and the dissociation and alone neither high association or low dissociation can ensure high affinity. The association rate constant (Ka), or on-rate constant (Kon), measures the number of binding events per unit time, or the propensity of the antibody and the antigen to associate reversibly into its antibody-antigen complex. The association rate constant is expressed in M^{-1} s^{-1}, and is symbolized as follows: [Ab] x [Ag] x Kon. The larger the association rate constant, the more rapidly the antibody binds to its antigen, or the higher the binding affinity between antibody and antigen. The dissociation rate constant (Kd), or off-rate constant (Koff), measures the number of dissociation events per unit time propensity of an antibody-antigen complex to separate (dissociate) reversibly into its component molecules, namely the antibody and the antigen. The dissociation rate constant is expressed in s^{-1}, and is symbolized as follows: [Ab + Ag] x Koff. The smaller the dissociation rate constant, the more tightly bound the antibody is to its antigen, or the higher the binding affinity between antibody and antigen. The equilibrium dissociation constant (KD) measures the rate at which new antibody-antigen complexes formed equals the rate at which antibody-antigen complexes dissociate at equilibrium. The equilibrium dissociation constant is expressed in M, and is defined as Koff/Kon=[Ab] x [Ag]/[Ab + Ag], where [Ab] is the molar concentration of the antibody, [Ag] is the molar concentration of the antigen, and [Ab + Ag] is the of molar concentration of the antibody-antigen complex, where all concentrations are of such components when the system is at equilibrium. The smaller the equilibrium dissociation constant, the more tightly bound the antibody is to its antigen, or the higher the binding affinity between antibody and antigen.

[066] Thus, in an embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have an association rate constant of, *e.g.*, less than 1×10^5 M^{-1} s^{-1}, less than 1×10^6 M^{-1} s^{-1}, less than 1×10^7 M^{-1} s^{-1}, or less than 1×10^8 M^{-1} s^{-1}. In another embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have an association rate constant of, *e.g.*, more than 1×10^5 M^{-1} s^{-1}, more than 1×10^6 M^{-1} s^{-1}, more than 1×10^7 M^{-1} s^{-1}, or more than 1×10^8 M^{-1} s^{-1}. In other aspects, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have an association rate constant between 1×10^5 M^{-1} s^{-1} to 1×10^8 M^{-1} s^{-1}, 1×10^6 M^{-1} s^{-1} to 1×10^8 M^{-1} s^{-1}, 1×10^5 M^{-1} s^{-1} to 1×10^7 M^{-1} s^{-1}, or 1×10^6 M^{-1} s^{-1} to 1×10^7 M^{-1} s^{-1}.

[067] In another embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have a disassociation rate constant of less than 1×10^{-3} s^{-1}, less than 1×10^{-4} s^{-1}, or less than 1×10^{-5} s^{-1}. In other aspects of this embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have a disassociation rate constant of, *e.g.*, less than 1.0×10^{-4} s^{-1}, less than 2.0×10^{-4} s^{-1}, less than 3.0×10^{-4} s^{-1}, less than 4.0×10^{-4} s^{-1}, less than 5.0×10^{-4} s^{-1}, less than 6.0×10^{-4} s^{-1}, less than 7.0×10^{-4} s^{-1}, less than 8.0×10^{-4} s^{-1}, or less than 9.0×10^{-4} s^{-1}. In another embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have a disassociation rate constant of, *e.g.*, more than 1×10^{-3} s^{-1}, more than 1×10^{-4} s^{-1}, or more than 1×10^{-5} s^{-1}. In other aspects of this embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have a disassociation rate constant of, *e.g.*, more than 1.0×10^{-4} s^{-1}, more than 2.0×10^{-4} s^{-1}, more than 3.0×10^{-4} s^{-1}, more than 4.0×10^{-4} s^{-1}, more than 5.0×10^{-4} s^{-1}, more than 6.0×10^{-4} s^{-1}, more than 7.0×10^{-4} s^{-1}, more than 8.0×10^{-4} s^{-1}, or more than 9.0×10^{-4} s^{-1}.

[068] In another embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have an equilibrium disassociation constant of less than 0.500 nM. In aspects of this embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have an equilibrium disassociation constant of, *e.g.*, less than 0.500 nM, less than 0.450 nM, less than 0.400 nM, less than 0.350 nM, less than 0.300 nM, less than 0.250 nM, less than 0.200 nM, less than 0.150 nM, less than 0.100 nM, or less than 0.050 nM. In another embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have an equilibrium disassociation constant of more than 0.500 nM. In

aspects of this embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have an equilibrium disassociation constant of, *e.g.*, more than 0.500 nM, more than 0.450 nM, more than 0.400 nM, more than 0.350 nM, more than 0.300 nM, more than 0.250 nM, more than 0.200 nM, more than 0.150 nM, more than 0.100 nM, or more than 0.050 nM.

[069] In yet another embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have an association rate constant of for the intact SNAP-25 of, *e.g.*, less than 1×10^0 M^{-1} s^{-1}, less than 1×10^1 M^{-1} s^{-1}, less than 1×10^2 M^{-1} s^{-1}, less than 1×10^3 M^{-1} s^{-1}, or less than 1×10^4 M^{-1} s^{-1}. In another embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have an association rate constant of for the intact SNAP-25 of, *e.g.*, at most 1×10^0 M^{-1} s^{-1}, at most 1×10^1 M^{-1} s^{-1}, at most 1×10^2 M^{-1} s^{-1}, at most 1×10^3 M^{-1} s^{-1}, or at most 1×10^4 M^{-1} s^{-1}.

[070] Binding specificity is the ability of an antibody to discriminate between a molecule containing its epitope and a molecule that does not contain that epitope. One way to measure binding specificity is to compare the Kon association rate of the antibody for a molecule containing its epitope relative to the Kon association rate of the antibody for a molecule that does not contain that epitope. For example, comparing the association rate constant (Ka) of an α-SNAP-25 antibody for a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond relative to a SNAP-25 not comprising that epitope, such as, *e.g.*, a SNAP-25 epitope lacking a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond or a SNAP-25 epitope having an intact P_1–P_1' scissile bond of a BoNT/A cleavage site. In aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond has an association rate constant (Ka) for a SNAP-25 not comprising its epitope(s) of, *e.g.*, less than 1×10^0 M^{-1} s^{-1}, less than 1×10^1 M^{-1} s^{-1}, less than 1×10^2 M^{-1} s^{-1}, less than 1×10^3 M^{-1} s^{-1} or less than 1×10^4 M^{-1} s^{-1}. In other aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond has an association rate constant (Ka) for a SNAP-25 not comprising its epitope(s) of, *e.g.*, at most 1×10^0 M^{-1} s^{-1}, at most 1×10^1 M^{-1} s^{-1}, at most 1×10^2 M^{-1} s^{-1}, at most 1×10^3 M^{-1} s^{-1} or at most 1×10^4 M^{-1} s^{-1}.

[071] In yet aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond has an association rate constant (Ka) for its epitope relative to a SNAP-25 not comprising that epitope of, *e.g.*, at least 2-fold more, at least 3-fold more, at least 4-fold more, at least 5-fold more, at least 6-fold more, at least 7-fold more, at least 8-fold more, or at least 9-fold more. In further aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond has an association rate constant (Ka) for its epitope

relative to a SNAP-25 not comprising that epitope of, *e.g.*, at least 10-fold more, at least 100-fold more, at least 1,000-fold more or at least 10,000-fold more. In yet other aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond has an association rate constant (Ka) for its epitope relative to a SNAP-25 not comprising that epitope of, *e.g.*, at most 1-fold more, at most 2-fold more, at most 3-fold more, at most 4-fold more, at most 5-fold more, at most 6-fold more, at most 7-fold more, at most 8-fold more, or at most 9-fold more. In yet other aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond has an association rate constant (Ka) for its epitope relative to a SNAP-25 not comprising that epitope of, *e.g.*, at most 10-fold more, at most 100-fold more, at most 1,000-fold more or at most 10,000-fold more.

[072] The binding specificity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can also be characterized as a ratio that such an α-SNAP-25 antibody can discriminate its SNAP-25 epitope relative to a SNAP-25 not comprising that epitope, such as, *e.g.*, a SNAP-25 epitope lacking a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond or a SNAP-25 epitope having an intact P_1–P_1' scissile bond of a BoNT/A cleavage site. In aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond has a binding specificity ratio for its SNAP-25 epitope relative to a SNAP-25 not comprising that epitope of, *e.g.*, at least 2:1, at least 3:1, at least 4:1, at least 5:1, at least 64:1, at least 7:1, at least 8:1, at least 9:1, at least 10:1, at least 15:1, at least 20:1, at least 25:1, at least 30:1, at least 35:1, or at least 40:1. In yet other aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond has a binding specificity ratio for its SNAP-25 epitope relative to a SNAP-25 lacking a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond of, *e.g.*, at least 2:1, at least 3:1, at least 4:1, at least 5:1, at least 6:1, at least 7:1, at least 8:1, at least 9:1, at least 10:1, at least 15:1, at least 20:1, at least 25:1, at least 30:1, at least 35:1, or at least 40:1. In still other aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond has a binding specificity ratio for its SNAP-25 epitope relative to a SNAP-25 having an intake P_1–P_1' scissile bond of a BoNT/A cleavage site of, *e.g.*, at least 2:1, at least 3:1, at least 4:1, at least 5:1, at least 64:1, at least 7:1, at least 8:1, at least 9:1, at least 10:1, at least 15:1, at least 20:1, at least 25:1, at least 30:1, at least 35:1, or at least 40:1.

[073] Binding avidity, also known as functional affinity, refers to the sum total of the functional binding strength between a multivalent antibody and its antigen. Antibody molecules can have more than one binding site (*e.g.*, 2 for IgG, 10 for IgM), and many antigens contain more than one antigenic site. While binding avidity of an antibody depends on the binding affinities of the individual antibody binding sites,

binding avidity is greater than the binding affinity as all the antibody-antigen interactions must be broken simultaneously for the antibody to dissociate completely. It is envisioned that an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can selectively bind to any and all epitopes for that antibody.

[074] Thus, in an embodiment, an α-SNAP-25 antibody is an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. In aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody is an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus glutamine or an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus lysine. In other aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody is an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus P_1 residue that corresponds to glutamine 197 of SEQ ID NO: 5 or an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus P_1 residue that corresponds to lysine 204 of SEQ ID NO: 16. In still other aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody is an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminal amino acid sequence of SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, or SEQ ID NO: 46.

[075] Aspects of the present disclosure comprise, in part, an immuno-based method of detecting retargeted endopeptidase activity. The immuno-based methods disclosed in the present specification can be evaluated by several parameters including, *e.g.*, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limits of quantitation (LOQ), range, specificity, selectivity, linearity, ruggedness, and system suitability. The accuracy of a method is the measure of exactness of an analytical method, or the closeness of agreement between the measured value and the value that is accepted as a conventional true value or an accepted reference value. The precision of a method is the degree of agreement among individual test results, when the procedure is applied repeatedly to multiple samplings of a homogeneous sample. As such, precision evaluates 1) within assay variability; 2) within-day variability (repeatability); and 3) between-day variability (intermediate precision); and 4) between-lab variability (reproducibility). Coefficient of variation (CV%) is a quantitative measure of precision expressed relative to the observed or theoretical mean value.

[076] An immuno-based method disclosed in the present specification must be able to detect, over background, the presence of an α-SNAP-25 antibody-antigen complex comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. The limit of detection (LOD) of a method refers to the concentration of analyte which gives rise to a signal that is significantly different from the negative control or blank and represents the lowest concentration of analyte that can be distinguished from background.

[077] Thus, in an embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification can detect the LOD of retargeted endopeptidase at an amount that is significantly different from a negative control or blank. In aspect of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, *e.g.*, 10 ng or less, 9 ng or less, 8 ng or less, 7 ng or less, 6 ng or less, 5 ng or less, 4 ng or less, 3 ng or less, 2 ng or less, 1 ng or less of a retargeted endopeptidase. In still other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, *e.g.*, 900 pg or less, 800 pg or less, 700 pg or less, 600 pg or less, 500 pg or less, 400 pg or less, 300 pg or less, 200 pg or less, 100 pg or less of a retargeted endopeptidase. In further aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, *e.g.*, 90 pg or less, 80 pg or less, 70 pg or less, 60 pg or less, 50 pg or less, 40 pg or less, 30 pg or less, 20 pg or less, 10 pg or less of a retargeted endopeptidase. In other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, *e.g.*, 9 pg or less, 8 pg or less, 7 pg or less, 6 pg or less, 5 pg or less, 4 pg or less, 3 pg or less, 2 pg or less, 1 pg or less of a retargeted endopeptidase. In yet other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, *e.g.*, 0.9 pg or less, 0.8 pg or less, 0.7 pg or less, 0.6 pg or less, 0.5 pg or less, 0.4 pg or less, 0.3 pg or less, 0.2 pg or less, 0.1 pg or less of a retargeted endopeptidase.

[078] In another aspect of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, *e.g.*, 100 nM or less or less, 90 nM or less or less, 80 nM or less or less, 70 nM or less or less, 60 nM or less or less, 50 nM or less or less, 40 nM or less or less, 30 nM or less or less, 20 nM or less or less, 10 nM or less or less, 9 nM or less, 8 nM or less, 7 nM or less, 6 nM or less, 5 nM or less, 4 nM or less, 3 nM or less, 2 nM or less, or 1 nM or less of a retargeted endopeptidase. In other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, *e.g.*, 900 pM or less, 800 pM or less, 700 pM or less, 600 pM or less, 500 pM or less, 400 pM or less, 300 pM or less, 200 pM or less, or 100 pM or less of a retargeted endopeptidase. In other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, *e.g.*, 100 pM or less, 90 pM or less, 80 pM or less, 70 pM or less, 60 pM or less, 50 pM or less, 40 pM or less, 30 pM or less, 20 pM or less, or 10 pM or less of a retargeted endopeptidase. In yet other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, *e.g.*, 10 pM or less of a retargeted endopeptidase, 9 pM or less, 8 pM or less, 7 pM or less, 6 pM or less, 5 pM or less, 4 pM or less, 3 pM or less, 2 pM or less, or 1 pM or less of a retargeted endopeptidase.

[079] The limits of quantitation (LOQ) are the lowest and the highest concentrations of analyte in a sample or specimen that can be measured with an acceptable level of accuracy and precision. The lower limit of quantitation refers to the lowest dose that a detection method can measure consistently from the background. The upper limit of quantitation is the highest dose that a detection method can measure consistently before saturation of the signal occurs. The linear range of the method is the area between the lower and the upper limits of quantitation. The linear range is calculated by subtracting lower limit of

quantitation from the upper limit of quantitation. As used herein, the term "signal to noise ratio for the lower asymptote" refers to the signal detected in the method at the lower limit of detection divided by the background signal. As used herein, the term "signal to noise ratio for the upper asymptote" refers to the signal detected in the method at the upper limit of detection divided by the background signal.

[080] Thus, in an embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification can detect the LOQ of retargeted endopeptidase at an amount that is significantly different from a negative control or blank. In aspect of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 10 ng or less, 9 ng or less, 8 ng or less, 7 ng or less, 6 ng or less, 5 ng or less, 4 ng or less, 3 ng or less, 2 ng or less, 1 ng or less of a retargeted endopeptidase. In still other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 900 pg or less, 800 pg or less, 700 pg or less, 600 pg or less, 500 pg or less, 400 pg or less, 300 pg or less, 200 pg or less, 100 pg or less of a retargeted endopeptidase. In further aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 90 pg or less, 80 pg or less, 70 pg or less, 60 pg or less, 50 pg or less, 40 pg or less, 30 pg or less, 20 pg or less, 10 pg or less of a retargeted endopeptidase. In other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 9 pg or less, 8 pg or less, 7 pg or less, 6 pg or less, 5 pg or less, 4 pg or less, 3 pg or less, 2 pg or less, 1 pg or less of a retargeted endopeptidase. In yet other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 0.9 pg or less, 0.8 pg or less, 0.7 pg or less, 0.6 pg or less, 0.5 pg or less, 0.4 pg or less, 0.3 pg or less, 0.2 pg or less, 0.1 pg or less of a retargeted endopeptidase.

[081] In another aspect of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 100 nM or less or less, 90 nM or less or less, 80 nM or less or less, 70 nM or less or less, 60 nM or less or less, 50 nM or less or less, 40 nM or less or less, 30 nM or less or less, 20 nM or less or less, 10 nM or less or less, 9 nM or less, 8 nM or less, 7 nM or less, 6 nM or less, 5 nM or less, 4 nM or less, 3 nM or less, 2 nM or less, or 1 nM or less of a retargeted endopeptidase. In other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 900 pM or less, 800 pM or less, 700 pM or less, 600 pM or less, 500 pM or less, 400 pM or less, 300 pM or less, 200 pM or less, or 100 pM or less of a retargeted endopeptidase. In other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 100 pM or less, 90 pM or less, 80 pM or less, 70 pM or less, 60 pM or less, 50 pM or less, 40 pM or less, 30 pM or less, 20 pM or less, or 10 pM or less of a retargeted endopeptidase. In yet other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 10 pM or less of a retargeted endopeptidase, 9 pM or less, 8 pM or less, 7 pM or less, 6 pM or less, 5 pM or less, 4 pM or less, 3 pM or less, 2 pM or less, or 1 pM or less of a retargeted endopeptidase.

[082] An immuno-based assay useful to practice aspect of the disclosed methods must have a precision of no more than 50%. In aspects of this embodiment, an immuno-based assay has a precision of no more than 50%, no more than 40%, no more than 30%, or no more than 20%. In other aspects of this embodiment, an immuno-based assay has a precision of nor more than 15%, no more than 10%, or no more than 5%. In other aspects of this embodiment, an immuno-based assay has a precision of nor more than 4%, no more than 3%, no more than 2%, or no more than 1%.

[083] An immuno-based assay useful to practice aspect of the disclosed methods must have an accuracy of at least 50%. In aspects of this embodiment, an immuno-based assay has an accuracy of at least 50%, at least 60%, at least 70%, or at least 80%. In other aspects of this embodiment, an immuno-based assay has an accuracy of at least 85%, at least 90%, or at least 95%. In other aspects of this embodiment, an immuno-based assay has an accuracy of at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99%.

[084] An immuno-based method disclosed in the present specification must have a signal to noise ratio for the lower asymptote that is statistically significant and a signal to noise ratio for the upper asymptote that is statistically significant. In aspects of this embodiment, an immuno-based method disclosed in the present specification has a signal to noise ratio for the lower asymptote of, *e.g.*, at least 3:1, at least 4:1,at least 5:1, at least 6:1, at least 7:1, at least 8:1, at least 9:1, at least 10:1, at least 15:1 or at least 20:1. In other aspects of this embodiment, an immuno-based method has a signal to noise ratio for the upper asymptote of, *e.g.*, at least 10:1, at least 15:1, at least 20:1, at least 25:1, at least 30:1, at least 35:1, at least 40:1, at least 45:1, at least 50:1, at least 60:1, at least 70:1, at least 80:1, at least 90:1, or at least 100:1, at least 150:1, at least 200:1, at least 250:1, at least 300:1, at least 350:1, at least 400:1, at least 450:1, at least 500:1, at least 550:1, or at least 600:1.

[085] The specificity of a method defines the ability of the method to measure the analyte of interest to the exclusion of other relevant components, such as, *e.g.*, partially-active or inactive analyte. The selectivity of a method describes the ability of an analytical method to differentiate various substances in a sample. The linearity of a method is its ability to elicit results that are directly, or by a well defined mathematical transformation, proportional to the concentration of analyte in the sample. Thus in an embodiment, an immuno-based method disclosed in the present specification can distinguish a fully-active retargeted endopeptidase from a partially-active retargeted endopeptidase having, *e.g.*, 70% or less, 60% or less, 50% or less, 40% or less, 30% or less, 20% or less, or 10% or less the activity of a fully-active retargeted endopeptidase.

[086] The ruggedness of the method is the reproducibility of the test results obtained for identical samples under normal (but variable) test conditions. Robustness of a procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small but deliberate variations in the method parameters and provides an indication of its reliability in normal usage. Thus, whereas ruggedness evaluates unavoidable

changes, robustness evaluates deliberate changes. Typical parameters evaluated by ruggedness and robustness include the effects of freeze/thaw, incubation times, incubation temperature, longevity of reagent, sample preparation, sample storage, cell passage number, lots of re-targeted endopeptidase, variability between purifications, and variability between nicking reactions. Robustness parameters for cell-based assays include the cell bank (beginning, middle and end of freeze), cell passage level, cell seeding density, cell stock density (how many days in culture), cell age in flask (waiting time to seeding), incubation time, different plates, excessive amounts of serum, and source of reagents. The system suitability of the method is the determination of assay performance, including the performance of reagents and instruments, over time by analysis of a reference standard or reference molecule. System suitability is stressed in FDA guidance referring to the fact that equipment, electronics, assay performance, and samples to be analyzed, constitute an integrated system. System suitability can be evaluated by testing for parallelism, which is when plotting the log dose versus the response, serial dilutions of the reference and serial dilutions of the samples should give rise to parallel curves.

[087] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a cell from an established cell line. As used herein, the term "cell" refers to any eukaryotic cell susceptible to retargeted endopeptidase activity by a retargeted endopeptidase or any eukaryotic cell that can uptake a retargeted endopeptidase. The term cell encompasses cells from a variety of organisms, such as, *e.g.*, murine, rat, porcine, bovine, equine, primate and human cells; from a variety of cell types such as, *e.g.*, neuronal and non-neuronal; and can be isolated from or part of a heterogeneous cell population, tissue or organism. As used herein, the term "established cell line" is synonymous with "immortal cell line," or "transformed cell line" and refers to a cell culture of cells selected for indefinite propagation from a cell population derived from an organism, tissue, or organ source. By definition, an established cell line excludes a cell culture of primary cells. As used herein, the term "primary cells" are cells harvested directly from fresh tissues or organs and do not have the potential to propagate indefinitely. An established cell line can comprise a heterogeneous population of cells or a uniform population of cells. An established cell line derived from a single cell is referred to as a clonal cell line. An established cell line can be one whose cells endogenously express all component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate and encompasses the binding of a retargeted endopeptidase to its receptor, the internalization of the endopeptidase/receptor complex, the translocation of the retargeted endopeptidase light chain from an intracellular vesicle into the cytoplasm and the proteolytic cleavage of a SNAP-25. Alternatively, an established cell line can be one whose cells have had introduced from an exogenous source at least one component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate and encompasses the binding of a retargeted endopeptidase to its receptor, the internalization of the endopeptidase/receptor complex, the translocation of the retargeted endopeptidase light chain from an intracellular vesicle into the cytoplasm and the proteolytic cleavage of a SNAP-25. Also refered to as a genetically-engineered cell line, cells from such an established cell line may, *e.g.*, express an exogenous retargeted endopeptidase, such as, *e.g.*, an exogenous ORL1, an exogenous DOR, an

exogenous KOR, an exogenous MOR, an exogenous Galanin receptor 1, an exogenous Galanin receptor 2, an exogenous Galanin receptor 3, or any combination thereof.

[088] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a cell from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity. As used herein, the terms "cell(s) susceptible to retargeted endopeptidase activity," "cell(s) susceptible to retargeted endopeptidase activity by a retargeted endopeptidase," or "cell(s) from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity by a retargeted endopeptidase" refer to cell(s) that can undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate thereby inhibiting exocytosis and encompasses the binding of a retargeted endopeptidase to its receptor, the internalization of the endopeptidase/receptor complex, the translocation of the retargeted endopeptidase activity chain from an intracellular vesicle into the cytoplasm and the proteolytic cleavage of a SNAP-25. By definition, cell(s) susceptible to retargeted endopeptidase activity must express, or be engineered to express, at least one retargeted endopeptidase receptor and at least one SNAP-25 substrate. As used herein, the terms "cell(s) that can uptake retargeted endopeptidase" or "cell(s) comprising an established cell line that can uptake retargeted endopeptidase" refer to cells that can undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate thereby inhibiting exocytosis and encompasses the binding of a retargeted endopeptidase to its receptor, the internalization of the endopeptidase/receptor complex, the translocation of the retargeted endopeptidase light chain from an intracellular vesicle into the cytoplasm and the proteolytic cleavage of a SNAP-25. By definition, cell(s) that can uptake retargeted endopeptidase must express, or be engineered to express, at least one retargeted endopeptidase receptor and at least one SNAP-25 substrate.

[089] Thus in an embodiment, cells from an established cell line are susceptible to retargeted endopeptidase activity. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line are susceptible to retargeted endopeptidase activity by, *e.g.*, about 100 nM or less or less, about 90 nM or less or less, about 80 nM or less or less, about 70 nM or less or less, about 60 nM or less or less, about 50 nM or less or less, about 40 nM or less or less, about 30 nM or less or less, about 20 nM or less or less, about 10 nM or less or less of a retargeted endopeptidase. In other aspects, cells from an established cell line are susceptible to retargeted endopeptidase activity by, *e.g.*, about 9 nM or less, about 8 nM or less, about 7 nM or less, about 6 nM or less, about 5 nM or less, about 4 nM or less, about 3 nM or less, about 2 nM or less, or about 1 nM or less of a retargeted endopeptidase. In yet other aspects, cells from an established cell line are susceptible to retargeted endopeptidase activity by, *e.g.*, about 0.9 nM or less, about 0.8 nM or less, about 0.7 nM or less, about 0.6 nM or less, about 0.5 nM or less, about 0.4 nM or less, about 0.3 nM or less, about 0.2 nM, or about 0.1 nM or less of a retargeted endopeptidase. As used herein, the term "about" when qualifying a value of a stated item, number, percentage, or term refers to a range of plus or minus ten percent of the value of the stated item, percentage, parameter, or term.

42

[090] In another embodiment, cells comprising an established cell line can uptake a retargeted endopeptidase. In aspects of this embodiment, cells comprising an established cell line can uptake, *e.g.*, about 100 nM or less or less, about 90 nM or less or less, about 80 nM or less or less, about 70 nM or less or less, about 60 nM or less or less, about 50 nM or less or less, about 40 nM or less or less, about 30 nM or less or less, about 20 nM or less or less, about 10 nM or less or less of a retargeted endopeptidase. In other aspects, cells comprising an established cell line possess the ability to uptake about 9 nM or less, about 8 nM or less, about 7 nM or less, about 6 nM or less, about 5 nM or less, about 4 nM or less, about 3 nM or less, about 2 nM or less, or about 1 nM or less of a retargeted endopeptidase. In yet other aspects, cells comprising an established cell line possess the ability to uptake about 0.9 nM or less, about 0.8 nM or less, about 0.7 nM or less, about 0.6 nM or less, about 0.5 nM or less, about 0.4 nM or less, about 0.3 nM or less, about 0.2 nM or less, or about 0.1 nM or less of a retargeted endopeptidase.

[091] Aspects of the present disclosure comprise, in part, cells from an established cell line that exhibit a selective binding for a retargeted endopeptidase disclosed in the present specification. As used herein, the term "selectively binds", or "selective binding" when made in reference to a retargeted endopeptidase, refers to the discriminatory binding of a retargeted endopeptidase to the indicated target receptor such that the retargeted endopeptidase does not substantially bind to a non-target receptor. The degree to which cells from an established cell line exhibit selectively binding for a retargeted endopeptidase can be measured by the extent these cells exhibit non-selective uptake for a molecule lacking the targeting domain of the retargeted endopeptidase. One way to assess non-selective uptake for a molecule lacking the targeting domain of the retargeted endopeptidase is to measure the non-selective uptake of a LH_N fragment. An LH_N fragment is one that comprises a Clostridial toxin translocation domain and a Clostridial toxin enzymatic domain, but lacks any targeting domain altogether. Non-limiting examples of a LH_N fragments include a LH_N/A fragment, a LH_N/B fragment, a LH_N/C fragment, a LH_N/D fragment, a LH_N/E fragment, a LH_N/F fragment, and a LH_N/G fragment. An exemplary LH_N/A fragment is SEQ ID NO: 146 which is encoded by the polynucleotide molecule SEQ ID NO: 147.

[092] Thus, in an embodiment, cells from an established cell line exhibit selective binding for a retargeted endopeptidase. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line exhibit selective binding for a retargeted endopeptidase that represents, *e.g.*, at least 75% of the total activity assayed, at least 80% of the total activity assayed, at least 85% of the total activity assayed, at least 90% of the total activity assayed, or at least 95% of the total activity assayed. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line exhibit selective binding for a retargeted endopeptidase that represents, *e.g.*, about 75% to about 100% of the total activity assayed, about 80% to about 100% of the total activity assayed, about 85% to about 100% of the total activity assayed, about 90% to about 100% of the total activity assayed.

[093] In another embodiment, cells from an established cell line exhibit minimal non-selective uptake of a LH_N fragment. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line exhibit non-selective uptake of a LH_N fragment that is, *e.g.*, at most 25% of the total uptake measured, at most 20% of the total uptake measured, at most 15% of the total uptake measured, at most 10% of the total uptake measured, or at most 5% of the total uptake measured. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line exhibit non-selective uptake of a LH_N fragment that is, *e.g.*, about 0% to about 25% of the total uptake measured, about 0% to about 20% of the total uptake measured, about 0% to about 15% of the total uptake measured, about 0% to about 10% of the total uptake measured, or about 0% to about 5% of the total uptake measured.

[094] In yet another embodiment, cells from an established cell line exhibit minimal non-selective uptake of a LH_N/A fragment. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line exhibit non-selective uptake of a LH_N/A fragment that is, *e.g.*, at most 25% of the total uptake measured, at most 20% of the total uptake measured, at most 15% of the total uptake measured, at most 10% of the total uptake measured, or at most 5% of the total uptake measured. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line exhibit non-selective uptake of a LH_N/A fragment that is, *e.g.*, about 0% to about 25% of the total uptake measured, about 0% to about 20% of the total uptake measured, about 0% to about 15% of the total uptake measured, about 0% to about 10% of the total uptake measured, or about 0% to about 5% of the total uptake measured.

[095] Aspects of the present disclosure comprise, in part, cells from an established cell line that exhibit a sufficient number of receptor binding sites on the plasma membrane to confer sensitive and selective binding for a retargeted endopeptidase. An equilibrium saturation binding assay measures the total and non-specific binding of a ligand at various concentrations. The equilibrium dissociation constant (K_d) for the ligand and the maximal number of receptor binding sites, Bmax, can be calculated from the specific binding using non-linear regression analysis. Specific binding is calculated by subtracting the non-specific binding of a ligand from the total binding observed. K_d is the concentration of ligand required to reach half-maximal binding and is measured in terms of molarity. Bmax is the maximal number of binding sites present on the plasma membrane and is measured in terms of pmol/mg, pmol/cell, fmol/cell, or sites/cell.

[096] Thus, in an embodiment, cells from an established cell line exhibit a sufficient number of receptor binding sites on the plasma membrane to confer sensitive and selective binding for a retargeted endopeptidase. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line exhibit a Bmax value of, *e.g.*, at least 0.1 fmol/cell, at least 0.2 fmol/cell, at least 0.3 fmol/cell, at least 0.4 fmol/cell, at least 0.5 fmol/cell, at least 0.6 fmol/cell, at least 0.7 fmol/cell, at least 0.8 fmol/cell, at least 0.9 fmol/cell, or at least 1.0 fmol/cell, for the targeting ligand of a retargeted endopeptidase. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line exhibit a Bmax value of, *e.g.*, at least 1 fmol/cell, at least 2 fmol/cell, at least 3 fmol/cell, at least 4 fmol/cell, at least 5 fmol/cell, at least 6 fmol/cell, at least 7 fmol/cell, at least 8

fmol/cell, at least 9 fmol/cell, or at least 10 fmol/cell, for the targeting ligand of a retargeted endopeptidase.

[097] Aspects of the present disclosure comprise, in part, cells from an established clonal cell line susceptible to re-targeted endopeptidase activity that are more stable than cells from the parental cell line from which the clonal cell line was derived. As used herein, the term "stable" refers to cells from an established clonal cell line for a particular passage number that exhibit a relative EC_{50}, sensitivity, efficacy, well-defined upper asymptote, and/or a well-defined dose-response curve for re-targeted endopeptidase activity that is similar to the values for relative EC_{50}, sensitivity, efficacy, well-defined upper asymptote, and/or a well-defined dose-response curve exhibited by cells from the parental cell line from which the clonal cell line was derived, at the same or similar passage number, where the same assay conditions and the same re-targeted endopeptidase are used in both assays.

[098] Thus in an embodiment, cells from an established clonal cell line are more stable as compared to from the parental cell line from which the clonal cell line was derived. In an aspect of this embodiment, cells from an established clonal cell line are more stable as compared to the parental SK-N-DZ cell line. In another aspect of this embodiment, cells from an established clonal cell line are more stable as compared to the parental SK-N-DZ cell line ATCC CRL-2149. In other aspects of this embodiment, cells from an established clonal cell line are more stable for, *e.g.*, at least 5 more passages, at least 10 more passages, at least 15 more passages, at least 20 more passages, at least 25 more passages, or at least 30 more passages, as compared to from the parental cell line from which the clonal cell line was derived. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established clonal cell line are more stable for, *e.g.*, at least 5 more passages, at least 10 more passages, at least 15 more passages, at least 20 more passages, at least 25 more passages, or at least 30 more passages, as compared to from the parental cell line from which the clonal cell line was derived.

[099] Aspects of the present disclosure comprise, in part, cells from an established clonal cell line susceptible to re-targeted endopeptidase activity that are stable over a plurality of cell passages. As used herein, the term "stable" refers to cells from an established clonal cell line for a particular passage number that exhibit a relative EC_{50}, sensitivity, efficacy, well-defined upper asymptote, and/or a well-defined dose-response curve for re-targeted endopeptidase activity that is similar to the values for relative EC_{50}, sensitivity, efficacy, well-defined upper asymptote, and/or a well-defined dose-response curve exhibited by cells from the same established clonal cell line, but from a prior passage or passages, where the same assay conditions and the same re-targeted endopeptidase are used in both assays.

[0100] Cells from an established cell line disclosed in the present specification can exhibit a consistent sensitivity for re-targeted endopeptidase activity over a plurality of cell passages. As used herein, the term "sensitivity for re-targeted endopeptidase activity" refers to the lowest dose that an assay can measure consistently above the signal detected by a non-treatment control or background signal.

[0101] Thus, in an embodiment, cells from the established clonal cell line exhibit a sensitivity for re-targeted endopeptidase activity for any given passages that is *e.g.*, 100 nM or less, about 80 nM or less, about 70 nM or less, about 60 nM or less, about 50 nM or less, about 40 nM or less, about 30 nM or less, about 20 nM or less, about 10 nM or less, about 1 nM or less, about 0.9 nM or less, about 0.8 nM or less, about 0.7 nM or less, about 0.6 nM or less, about 0.5 nM or less, about 0.4 nM or less, about 0.3 nM or less, about 0.2 nM or less, or about 0.1 nM or less of a re-targeted endopeptidase. In aspects of this embodiment, cells from the established clonal cell line exhibit a sensitivity for re-targeted endopeptidase activity for any given passages that is, *e.g.*, about 0.01 nM to about 100 nM, about 0.01 nM to about 75 nM, about 0.01 nM to about 50 nM, about 0.01 nM to about 25 nM, about 0.01 nM to about 20 nM, about 0.01 nM to about 15 nM, about 0.01 nM to about 10 nM, about 0.01 nM to about 5 nM, about 0.001 nM to about 100 nM, about 0.001 nM to about 75 nM, about 0.001 nM to about 50 nM, about 0.001 nM to about 25 nM, about 0.001 nM to about 20 nM, about 0.001 nM to about 15 nM, about 0.001 nM to about 10 nM, or about 0.001 nM to about 5 nM of a re-targeted endopeptidase.

[0102] In another embodiment, cells from the established clonal cell line exhibit a sensitivity for re-targeted endopeptidase activity that is about 100 nM or less, about 75 nM or less, about 50 nM or less, about 25 nM or less, less about 20 nM or less, about 15 nM or less, about 10 nM or less, or about 1 nM or less for, *e.g.*, 5 or more cell passages, 10 or more cell passages, 15 or more cell passages, 20 or more cell passages, 25 or more cell passages, 30 or more cell passages, 35 or more cell passages, 40 or more cell passages, 45 or more cell passages, or 50 or more cell passages. In other aspects of this embodiment, cells from the established clonal cell line exhibit a sensitivity for re-targeted endopeptidase activity that is about 100 nM or less, about 75 nM or less, about 50 nM or less, about 25 nM or less, less about 20 nM or less, about 15 nM or less, about 10 nM or less, or about 1 nM or less for, *e.g.*, about 15 to about 60 passages, about 20 to about 60 passages, about 25 to about 60 passages, about 30 to about 60 passages, about 35 to about 60 passages, about 40 to about 60 passages, about 45 to about 60 passages, about 50 to about 60 passages, about 15 to about 50 passages, about 20 to about 50 passages, about 25 to about 50 passages, about 30 to about 50 passages, about 35 to about 50 passages, about 40 to about 50 passages, about 15 to about 40 passages, about 20 to about 40 passages, about 25 to about 40 passages, or about 30 to about 40 passages.

[0103] Cells from an established cell line disclosed in the present specification can exhibit a consistent relative efficacy of re-targeted endopeptidase uptake or re-targeted endopeptidase activity over a plurality of cell passages. As used herein, the term "relative efficacy" refers to how well the upper asymptote for the re-targeted endopeptidase activity detected in the current assay run compares to the upper asymptote for the re-targeted endopeptidase activity detected in a reference standard, a reference molecule, or a reference passage number used on that assay. As used herein, the term "signal to noise ratio for the upper asymptote" refers to the signal detected in an assay at the upper limit of detection divided by the

signal detected by a non-treatment control or background signal. The upper limit of detection is the highest dose that an assay can measure consistently before saturation of the signal occurs.

[0104] Thus, In an embodiment, cells from an established cell line disclosed in the present specification can exhibit a well defined upper asymptote over a plurality of cell passages and maintain a signal to noise ratio that is consistent and adequate for the assay. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line disclosed in the present specification must have a well defined signal to noise ratio for the upper asymptote for re-targeted endopeptidase activity of, *e.g.*, at least 3:1, at least 4:1, at least 5:1, at least 6:1, at least 7:1, at least 8:1, at least 9:1, at least 10:1, at least 15:1, at least 20:1, at least 25:1, at least 30:1, at least 35:1, at least 40:1, at least 45:1, at least 50:1, at least 60:1, at least 70:1, at least 80:1, at least 90:1, or at least 100:1, at least 150:1, at least 200:1, at least 250:1, at least 300:1, at least 350:1, at least 400:1, at least 450:1, at least 500:1, at least 550:1, or at least 600:1, over, *e.g.*, 5 or more cell passages, 10 or more cell passages, 15 or more cell passages, 20 or more cell passages, 25 or more cell passages, 30 or more cell passages, 35 or more cell passages, 40 or more cell passages, 45 or more cell passages, or 50 or more cell passages. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line disclosed in the present specification must have a well defined signal to noise ratio for the upper asymptote for re-targeted endopeptidase activity of, *e.g.*, at least 3:1, at least 4:1, at least 5:1, at least 6:1, at least 7:1, at least 8:1, at least 9:1, at least 10:1, at least 15:1, at least 20:1, at least 25:1, at least 30:1, at least 35:1, at least 40:1, at least 45:1, at least 50:1, at least 60:1, at least 70:1, at least 80:1, at least 90:1, or at least 100:1, at least 150:1, at least 200:1, at least 250:1, at least 300:1, at least 350:1, at least 400:1, at least 450:1, at least 500:1, at least 550:1, or at least 600:1, over, *e.g.*, about 15 to about 60 passages, about 20 to about 60 passages, about 25 to about 60 passages, about 30 to about 60 passages, about 35 to about 60 passages, about 40 to about 60 passages, about 45 to about 60 passages, about 50 to about 60 passages, about 15 to about 50 passages, about 20 to about 50 passages, about 25 to about 50 passages, about 30 to about 50 passages, about 35 to about 50 passages, about 40 to about 50 passages, about 15 to about 40 passages, about 20 to about 40 passages, about 25 to about 40 passages, or about 30 to about 40 passages.

[0105] Cells from an established cell line disclosed in the present specification can exhibit a well defined dose-response curve for re-targeted endopeptidase activity over a plurality of cell passages. As used herein, the term "dose-response curve" refers to the how well the raw data fits the statistical model of choice for that assay. As a non-limiting example, a sigmoidal curve with a four parameter logistics fit is a dose-response curve for an enzymatic activity assay, such as, *e.g.* a potency assay. As another non-limiting example, a ligand binding with one site saturation fit is a dose-response curve for a ligand/antibody binding assay.

[0106] Thus, in an embodiment, cells from an established cell line disclosed in the present specification exhibit a well defined dose-response curve for re-targeted endopeptidase activity over a plurality of cell passages. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line disclosed in the present

specification exhibit a well defined dose-response curve for re-targeted endopeptidase activity over, *e.g.*, 5 or more cell passages, 10 or more cell passages, 15 or more cell passages, 20 or more cell passages, 25 or more cell passages, 30 or more cell passages, 35 or more cell passages, 40 or more cell passages, 45 or more cell passages, or 50 or more cell passages. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line disclosed in the present specification exhibit a well defined dose-response curve for re-targeted endopeptidase activity over, *e.g.*, about 15 to about 60 passages, about 20 to about 60 passages, about 25 to about 60 passages, about 30 to about 60 passages, about 35 to about 60 passages, about 40 to about 60 passages, about 45 to about 60 passages, about 50 to about 60 passages, about 15 to about 50 passages, about 20 to about 50 passages, about 25 to about 50 passages, about 30 to about 50 passages, about 35 to about 50 passages, about 40 to about 50 passages, about 15 to about 40 passages, about 20 to about 40 passages, about 25 to about 40 passages, or about 30 to about 40 passages.

[0107] Cells from an established cell line disclosed in the present specification can exhibit a consistent relative EC_{50} value for re-targeted endopeptidase activity over a plurality of cell passages. As used herein, the term "relative EC_{50}" or "relative EC_{50} value" refers to an EC_{50} value for re-targeted endopeptidase activity that is normalized against the EC_{50} calculated for a reference standard, a reference molecule, or a reference passage number used on that assay.

[0108] Thus, in an embodiment, cells from an established clonal cell line exhibit a consistent relative EC_{50} for re-targeted endopeptidase activity over a plurality of cell passages. In aspects of this embodiment, cells from an established clonal cell line exhibit a consistent relative EC_{50} for re-targeted endopeptidase activity that is, *e.g.*, about ± 10%, about ± 20%, about ± 30%, about ± 40%, about ± 50%, about ± 60%, about ± 70%, or about ± 75% the relative EC_{50} for re-targeted endopeptidase activity over, *e.g.*, 5 or more cell passages, 10 or more cell passages, 15 or more cell passages, 20 or more cell passages, 25 or more cell passages, 30 or more cell passages, 35 or more cell passages, 40 or more cell passages, 45 or more cell passages, or 50 or more cell passages. In other aspects of this embodiment, cells from an established clonal cell line exhibit a relative EC_{50} for re-targeted endopeptidase activity that is, *e.g.*, about ± 10% to about 75%, about ± 10% to about 70%, about ± 10% to about 60%, about ± 10% to about 50%, about ± 10% to about 40%, about ± 10% to about 30%, or about ± 10% to about 20% the relative EC_{50} for re-targeted endopeptidase activity over, *e.g.*, 5 or more cell passages, 10 or more cell passages, 15 or more cell passages, 20 or more cell passages, 25 or more cell passages, 30 or more cell passages, 35 or more cell passages, 40 or more cell passages, 45 or more cell passages, or 50 or more cell passages.

[0109] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a retargeted endopeptidase. As used herein, the term "retargeted endopeptidase" is synonymous with "Targeted Vesicular Exocytosis Modulator Protein" or "TVEMP." Non-limiting examples of retargeted endopeptidase are disclosed in, *e.g.*, Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S.

Patent 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. Patent 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, U.S. Patent 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, U.S. Patent 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. Patent Publication 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, U.S. Patent Publication 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, International Patent Publication WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. Patent Application No. 11/376,696; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, U.S. Patent Application No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. Patent Application No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, International Patent Publication WO 2006/059093; and Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, International Patent Publication WO 2006/059105, each of which is incorporated by reference in its entirety. Non-limiting examples of retargeted endopeptidases include SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130, and SEQ ID NO: 131.

[0110] Thus in an embodiment, the retargeted endopeptidase activity being detected is from a retargeted endopeptidase. In aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase activity being detected is from a retargeted endopeptidase disclosed in Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. Patent 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. Patent 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, U.S. Patent 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, U.S. Patent 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. Patent Publication 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, U.S. Patent Publication 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, International Patent Publication WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. Patent Application No. 11/376,696; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, U.S. Patent Application No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. Patent Application No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, International Patent Publication WO 2006/059093; and Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, International Patent Publication WO 2006/059105, each of which is incorporated by reference in its entirety. In aspects of this embodiment, a retargeted endopeptidase is SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130, or SEQ ID NO: 131.

[0111] In another embodiment, the retargeted endopeptidase activity being detected is from a retargeted endopeptidase having, e.g., at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at

least 95% amino acid identity with a retargeted endopeptidase disclosed in Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. Patent 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. Patent 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, U.S. Patent 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, U.S. Patent 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. Patent Publication 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, U.S. Patent Publication 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, International Patent Publication WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. Patent Application No. 11/376,696; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, U.S. Patent Application No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. Patent Application No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, International Patent Publication WO 2006/059093; and Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, International Patent Publication WO 2006/059105, each of which is incorporated by reference in its entirety. In another embodiment, the retargeted endopeptidase activity being detected is from a retargeted endopeptidase having, e.g., at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with a retargeted endopeptidase of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130, or SEQ ID NO: 131.

[0112] In other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase activity being detected is from a re-targeted endopeptidase having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to a retargeted endopeptidase disclosed in Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. Patent 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. Patent 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, U.S. Patent 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, U.S. Patent 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. Patent Publication 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, U.S. Patent Publication 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, International Patent Publication WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. Patent Application No. 11/376,696; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, U.S. Patent Application No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. Patent Application No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, International Patent Publication WO 2006/059093; and Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein*

Conjugates, International Patent Publication WO 2006/059105, each of which is incorporated by reference in its entirety. In other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase activity being detected is from a re-targeted endopeptidase having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to a retargeted endopeptidase of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130, or SEQ ID NO: 131.

[0113] In yet other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase activity being detected is from a non-naturally occurring retargeted endopeptidase variant having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to a retargeted endopeptidase disclosed in Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. Patent 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. Patent 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, U.S. Patent 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, U.S. Patent 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. Patent Publication 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, U.S. Patent Publication 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, International Patent Publication WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. Patent Application No. 11/376,696; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, U.S. Patent Application No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. Patent Application No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, International Patent Publication WO 2006/059093; and Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, International Patent Publication WO 2006/059105, each of which is incorporated by reference in its entirety. In yet other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase activity being detected is from a non-naturally occurring retargeted endopeptidase variant having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to a retargeted endopeptidase of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130, or SEQ ID NO: 131.

[0114] In yet another embodiment, the retargeted endopeptidase activity being detected is from an opioid retargeted endopeptidase. Non-limiting examples of opioid re-targeted endopeptidase, or opioid-TVEMPs, are described in, *e.g.*, Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, U.S. Patent 5,989,545; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, U.S. Patent 7,132,259; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and*

51

Methods For Treating Pain, U.S. Patent 7,244,437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. Patent 7,413,742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, U.S. Patent 7,415,338; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. Patent 7,514,088; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, U.S. Patent Publication 2008/0064092; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, U.S. Patent Publication 2009/0035822; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, U.S. Patent Publication 2009/0048431; Keith A. Foster, *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, U.S. Patent Publication 2009/0162341; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, International Patent Publication WO 2005/023309; and Lance E. Steward, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells*, International Patent Application WO 2008/008805; each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0115] In yet another embodiment, the retargeted endopeptidase activity being detected is from a galanin retargeted endopeptidase. Non-limiting examples of galanin re-targeted endopeptidase, or galanin-TVEMPs, are described in, *e.g.*, Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capability and Enhanced Targeting Activity, U.S. Patent Application No. 11/776,043 (Jul. 11, 2007); Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells, U.S. Patent Application No. 11/776,052 (Jul. 11, 2007); and Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, U.S. Patent Application No. 11/776,075 (Jul. 11, 2007), each of which is incorporated by reference in its entirety.

[0116] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a SNAP-25. As used herein, the term "SNAP-25" refers to a naturally-occurring SNAP-25 or a non-naturally occurring SNAP-25 which is preferentially cleaved by a retargeted endopeptidase. As used herein, the term "preferentially cleaved" refers to that the cleavage rate of SNAP-25 by a retargeted endopeptidase is at least one order of magnitude higher than the cleavage rate of any other substrate by a retargeted endopeptidase. In aspects of this embodiment, the cleavage rate of SNAP-25 by a retargeted endopeptidase is at least two orders of magnitude higher, at least three orders of magnitude higher, at least four orders of magnitude higher, or at least five orders of magnitude higher then that the cleavage rate of any other substrate by retargeted endopeptidase.

[0117] As used herein, the term "naturally occurring SNAP-25" refers to any SNAP-25 produced by a naturally-occurring process, including, without limitation, SNAP-25 isoforms produced from a post-translational modification, an alternatively-spliced transcript, or a spontaneous mutation, and SNAP-25 subtypes. A naturally occurring SNAP-25 includes, without limitation, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19,

SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24.

[0118] As used herein, the term "non-naturally occurring SNAP-25" refers to any SNAP-25 whose structure was modified with the aid of human manipulation, including, without limitation, a SNAP-25 produced by genetic engineering using random mutagenesis or rational design and a SNAP-25 produced by in vitro chemical synthesis. Non-limiting examples of non-naturally occurring SNAP-25s are described in, *e.g.*, Steward, L.E. et al., *FRET Protease Assays for Clostridial Toxins*, U.S. Patent 7,332,567; Fernandez-Salas et al., *Lipohilic Dye-based FRET Assays for Clostridial Toxin Activity*, U.S. Patent Publication 2008/0160561, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. A non-naturally occurring SNAP-25 may substitute, delete or add, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24.

[0119] Thus in an embodiment, a SNAP-25 is a naturally occurring SNAP-25. In aspects of this embodiment, the SNAP-25 is a SNAP-25 isoform or a SNAP-25 subtype. In aspects of this embodiment, the naturally occurring SNAP-25 is the naturally occurring SNAP-25 of SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24. In other aspects of this embodiment, the SNAP-25 is a naturally occurring SNAP-25 having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24.

[0120] In another embodiment, a SNAP-25 is a non-naturally occurring SNAP-25. In other aspects of this embodiment, the SNAP-25 is a non-naturally occurring SNAP-25 having, e.g., at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4. In other aspects of this embodiment, the SNAP-25 is a

non-naturally occurring SNAP-25 having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24. In yet other aspects of this embodiment, the SNAP-25 is a non-naturally occurring SNAP-25 having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24.

[0121] A SNAP-25 can be an endogenous SNAP-25 or an exogenous SNAP-25. As used herein, the term "endogenous SNAP-25" refers to a SNAP-25 naturally present in the cell because it is naturally encoded within the cell's genome, such that the cell inherently expresses the SNAP-25 without the need an external source of SNAP-25 or an external source of genetic material encoding a SNAP-25. The expression of an endogenous SNAP-25 may be with or without environmental stimulation such as, *e.g.*, cell differentiation. By definition, an endogenous SNAP-25 can only be a naturally-occurring SNAP-25 or variants thereof. For example, the following established cell lines express an endogenous SNAP-25: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa, SK-N-DZ, and SK-N-BE(2)-C.

[0122] As used herein, the term "exogenous SNAP-25" refers to a SNAP-25 expressed in a cell through the introduction of an external source of SNAP-25 or an external source of genetic material encoding a SNAP-25 by human manipulation. The expression of an exogenous SNAP-25 may be with or without environmental stimulation such as, *e.g.*, cell differentiation. As a non-limiting example, cells from an established cell line can express an exogenous SNAP-25 by transient or stably transfection of a SNAP-25. As another non-limiting example, cells from an established cell line can express an exogenous SNAP-25 by protein transfection of a SNAP-25. An exogenous SNAP-25 can be a naturally-occurring SNAP-25 or variants thereof, or a non-naturally occurring SNAP-25 or variants thereof.

[0123] Thus in an embodiment, cells from an established cell line express an endogenous SNAP-25. In aspects of this embodiment, the endogenous SNAP-25 expressed by cells from an established cell line is a naturally-occurring SNAP-25. In other aspects of this embodiment, the endogenous SNAP-25 expressed by cells from an established cell line is SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ

ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24. In yet aspects of this embodiment, the endogenous SNAP-25 expressed by cells from an established cell line is a naturally occurring SNAP-25, such as, *e.g.*, a SNAP-25 isoform or a SNAP-25 subtype. In other aspects of this embodiment, the endogenous SNAP-25 expressed by cells from an established cell line is a naturally occurring SNAP-25 having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24.

[0124] In another embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express an exogenous SNAP-25. In an aspect of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally-occurring SNAP-25. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express the naturally-occurring SNAP-25 of SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally occurring SNAP-25, such as, *e.g.*, a SNAP-25 isoform or a SNAP-25 subtype. In still other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally occurring SNAP-25 having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24.

[0125] In another aspect of the embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring SNAP-25. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring SNAP-25 having, e.g., at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring SNAP-25 having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID

NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring SNAP-25 having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24.

[0126] Assays that detect the cleavage of a SNAP-25 after exposure to a retargeted endopeptidase can be used to assess whether a cell is expressing an endogenous or exogenous SNAP-25. In these assays, generation of a SNAP-25 cleavage-product would be detected in cells expressing a SNAP-25 after retargeted endopeptidase treatment. Non-limiting examples of specific Western blot analysis, as well as well-characterized reagents, conditions and protocols are readily available from commercial vendors that include, without limitation, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, and Stratagene, Inc., La Jolla, CA. It is understood that these and similar assays for SNAP-25 cleavage can be useful in identifying cells expressing an endogenous or an exogenous SNAP-25.

[0127] As non-limiting examples, Western blot analysis using an antibody that recognize a SNAP-25 cleavage product or both the cleaved and uncleaved forms of SNAP-25 can be used to assay for uptake of retargeted endopeptidase. Examples of α-SNAP-25 antibodies useful for these assays include, without limitation, α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), mouse α-SNAP-25 monoclonal antibody Cl 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody Cl 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody SP12 (Abcam, Cambridge, MA), α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum (Abcam, Cambridge, MA), and α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum S9684 (Sigma, St Louis, MO).

[0128] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a retargeted endopeptidase receptor. As used herein, the term "retargeted endopeptidase receptor" refers to either a naturally-occurring retargeted endopeptidase receptor or a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor which preferentially interacts with a retargeted endopeptidase in a manner that elicits a retargeted endopeptidase activity response. As used herein, the term "preferentially interacts" refers to that the equilibrium dissociation constant (KD) of retargeted endopeptidase for a retargeted endopeptidase receptor is at least one order of magnitude less than that of retargeted endopeptidase for any other receptor at the cell surface. The equilibrium dissociation constant, a specific type of equilibrium constant

that measures the propensity of an retargeted endopeptidase-retargeted endopeptidase receptor complex to separate (dissociate) reversibly into its component molecules, namely the retargeted endopeptidase and the retargeted endopeptidase receptor, is defined as KD=Ka/Kd at equilibrium. The association constant (Ka) is defined as Ka=[C]/[L][R] and the disassociation constant (Kd) is defined as Kd=[L][R]/[C], where [L] equals the molar concentration of retargeted endopeptidase, [R] is the molar concentration of a retargeted endopeptidase receptor, and [C] is the molar concentration of the endopeptidase-receptor complex, and where all concentrations are of such components when the system is at equilibrium. The smaller the dissociation constant, the more tightly bound the retargeted endopeptidase is to its receptor, or the higher the binding affinity between retargeted endopeptidase and retargeted endopeptidase receptor. In aspects of this embodiment, the disassociation constant of retargeted endopeptidase for its receptor is at least two orders of magnitude less, at least three orders of magnitude less, at least four orders of magnitude less, or at least five orders of magnitude less than that of retargeted endopeptidase for any other receptor. In other aspects of this embodiment, the binding affinity of a retargeted endopeptidase that preferentially interacts with its receptor can have an equilibrium disassociation constant (KD) of, *e.g.*, of 500 nM or less, 400 nM or less, 300 nM or less, 200 nM, or less 100 nM or less. In other aspects of this embodiment, the binding affinity of a retargeted endopeptidase that preferentially interacts with its receptor can have an equilibrium disassociation constant (KD) of, *e.g.*, of 90 nM or less, 80 nM or less, 70 nM or less, 60 nM, 50 nM or less, 40 nM or less, 30 nM or less, 20 nM, or less 10 nM or less. As used herein, the term "elicits a retargeted endopeptidase activity response" refers to the ability of a retargeted endopeptidase receptor to interact with a retargeted endopeptidase to form a endopeptidase/receptor complex and the subsequent internalization of that complex into the cell cytoplasm.

[0129] As used herein, the term "naturally occurring retargeted endopeptidase receptor" refers to any retargeted endopeptidase receptor produced by a naturally-occurring process, including, without limitation, retargeted endopeptidase receptor isoforms produced from a post-translational modification, an alternatively-spliced transcript, or a spontaneous mutation, and retargeted endopeptidase receptor subtypes. A naturally occurring retargeted endopeptidase receptor includes, without limitation, naturally occurring opioid receptors like a opiate-like receptor 1 (ORL1), a δ-opioid receptor (DOR), a κ-opioid receptor (KOR), and a μ-opioid receptor (MOR), such as those described in Christopher Evans et al., *Opioid Receptor Genes*, U.S. Patent 6,265,563; Christopher Evans et al., *Methods of Screening Modulators of Opiod Receptor Activity*, U.S. Patent 6,432,652; Christopher Evans et al., *Opioid Receptors and Methods of Use*, U.S. Patent 7,282,563; and Christopher Evans et al., *Delta Opioid Receptor Proteins*, U.S. Patent Publication 2008/0219925, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. Other examples of a naturally occurring retargeted endopeptidase receptor includes, without limitation, the galanin receptor 1, the galanin receptor 2, and the galanin receptor 3. Naturally occurring opioid receptors from other vertebrate species are know in the art, such as, *e.g.*, primate, cow, dog, mouse, rat, chicken, and fish, and can be used in aspects of the present specification.

[0130] A naturally occurring ORL1 includes, without limitation, SEQ ID NO: 25 and SEQ ID NO: 26, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 25 or SEQ ID NO: 26. A naturally occurring DOR includes, without limitation, SEQ ID NO: 27 and SEQ ID NO: 28, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 27 or SEQ ID NO: 28. A naturally occurring KOR includes, without limitation, SEQ ID NO: 29 and SEQ ID NO: 30, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 29 or SEQ ID NO: 30. A naturally occurring MOR includes, without limitation, SEQ ID NO: 31, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 31.

[0131] A naturally occurring galanin receptor 1 includes, without limitation, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, and SEQ ID NO: 138, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, or SEQ ID NO: 138. A naturally occurring galanin receptor 2 includes, without limitation, SEQ ID NO: 139, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 139. A naturally occurring galanin receptor 3 includes, without limitation, SEQ ID NO: 140, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 140.

[0132] As used herein, the term "non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor variant" refers to any retargeted endopeptidase receptor produced with the aid of human manipulation or design, including, without limitation, a retargeted endopeptidase receptor produced by genetic engineering using random mutagenesis or rational design and a retargeted endopeptidase receptor produced by chemical synthesis. Non-limiting examples of non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor variants include, *e.g.*, conservative retargeted endopeptidase receptor variants, non-conservative retargeted endopeptidase receptor variants, retargeted endopeptidase receptor chimeric variants and active retargeted endopeptidase receptor fragments.

[0133] As used herein, the term "non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor" refers to any retargeted endopeptidase receptor whose structure was modified with the aid of human manipulation, including, without limitation, a retargeted endopeptidase receptor produced by genetic engineering using

random mutagenesis or rational design and a retargeted endopeptidase receptor produced by in vitro chemical synthesis. A non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor may substitute, delete or add, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140.

[0134] Thus in an embodiment, a retargeted endopeptidase receptor is a naturally occurring retargeted endopeptidase receptor such as, *e.g.*, ORL1, DOR, KOR, or MOR. In aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase receptor is a retargeted endopeptidase receptor isoform or a retargeted endopeptidase receptor subtype. In aspects of this embodiment, the naturally occurring retargeted endopeptidase receptor is the naturally occurring retargeted endopeptidase receptor of SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, or SEQ ID NO: 31. In other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase receptor is a naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, or SEQ ID NO: 31.

[0135] In another embodiment, a retargeted endopeptidase receptor is a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor, such as, *e.g.*, a genetically-engineered ORL1, a genetically-engineered DOR, a genetically-engineered KOR, or a genetically-engineered MOR. In other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase receptor is a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, *e.g.*, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, or SEQ ID NO: 31. In other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase receptor is a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, or SEQ ID NO: 31. In yet other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase receptor is a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, or SEQ ID NO: 31.

[0136] In another embodiment, a retargeted endopeptidase receptor is a naturally occurring retargeted endopeptidase receptor such as, *e.g.*, galanin receptor 1, galanin receptor 2, or galanin receptor 3. In aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase receptor is a retargeted endopeptidase

receptor isoform or a retargeted endopeptidase receptor subtype. In aspects of this embodiment, the naturally occurring retargeted endopeptidase receptor is the naturally occurring retargeted endopeptidase receptor of SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140. In other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase receptor is a naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140.

[0137] In another embodiment, a retargeted endopeptidase receptor is a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor, such as, *e.g.*, a genetically-engineered galanin receptor 1, a genetically-engineered galanin receptor 2, or a genetically-engineered galanin receptor 3. In other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase receptor is a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, *e.g.*, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140. In other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase receptor is a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140. In yet other aspects of this embodiment, the retargeted endopeptidase receptor is a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140.

[0138] A retargeted endopeptidase receptor can be an endogenous retargeted endopeptidase receptor or an exogenous retargeted endopeptidase receptor. As used herein, the term "endogenous retargeted endopeptidase receptor" refers to a retargeted endopeptidase receptor naturally present in the cell because it is naturally encoded within the cell's genome, such that the cell inherently expresses the retargeted endopeptidase receptor without the need an external source of retargeted endopeptidase receptor or an external source of genetic material encoding a retargeted endopeptidase receptor. Expression of an endogenous retargeted endopeptidase receptor may be with or without environmental stimulation such as *e.g.*, cell differentiation or promoter activation. For example, the following established cell lines express at least one endogenous retargeted endopeptidase receptor: AGN P33, Neuro-2a, SiMa, and SK-N-DZ. An endogenous retargeted endopeptidase receptor can only be a naturally-occurring retargeted endopeptidase receptor or naturally-occurring variants thereof.

[0139] As used herein, the term "exogenous retargeted endopeptidase receptor" refers to a retargeted endopeptidase receptor expressed in a cell through the introduction of an external source of retargeted

endopeptidase receptor or an external source of genetic material encoding a retargeted endopeptidase receptor by human manipulation. The expression of an exogenous retargeted endopeptidase receptor may be with or without environmental stimulation such as, *e.g.*, cell differentiation or promoter activation. As a non-limiting example, cells from an established cell line can express one or more exogenous retargeted endopeptidase receptors by transient or stably transfection of a polynucleotide molecule encoding a retargeted endopeptidase receptor, such as, *e.g.*, an ORL1, a DOR, a KOR, a MOR, a galanin receptor 1, a galanin receptor 2, or a galanin receptor 3. As another non-limiting example, cells from an established cell line can express one or more exogenous retargeted endopeptidase receptors by protein transfection of the retargeted endopeptidase receptors, such as, *e.g.*, an ORL1, a DOR, a KOR, a MOR, a galanin receptor 1, a galanin receptor 2, or a galanin receptor 3. An exogenous retargeted endopeptidase receptor can be a naturally-occurring retargeted endopeptidase receptor or naturally occurring variants thereof, or non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor or non-naturally occurring variants thereof.

[0140] Thus in an embodiment, cells from an established cell line express an endogenous retargeted endopeptidase receptor. In aspects of this embodiment, the endogenous retargeted endopeptidase receptor expressed by cells from an established cell line is a naturally-occurring retargeted endopeptidase receptor. In other aspects of this embodiment, the endogenous retargeted endopeptidase receptor expressed by cells from an established cell line is SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140. In yet aspects of this embodiment, the endogenous retargeted endopeptidase receptor expressed by cells from an established cell line is a naturally occurring retargeted endopeptidase receptor, such as, *e.g.*, a retargeted endopeptidase receptor isoform or a retargeted endopeptidase receptor subtype. In other aspects of this embodiment, the endogenous retargeted endopeptidase receptor expressed by cells from an established cell line is a naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140.

[0141] In another embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express an exogenous retargeted endopeptidase receptor. In an aspect of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally-occurring retargeted endopeptidase receptor. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express the naturally-occurring retargeted endopeptidase receptor of SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally occurring retargeted endopeptidase receptor, such as, *e.g.*, a

61

retargeted endopeptidase receptor isoform or a retargeted endopeptidase receptor subtype. In still other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140.

[0142] In another aspect of the embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, e.g., at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring retargeted endopeptidase receptor having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, or SEQ ID NO: 140.

[0143] In another embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express an exogenous ORL1, an exogenous DOR, an exogenous KOR, an exogenous MOR, or any combination thereof. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally-occurring ORL1, a naturally-occurring DOR, a naturally-occurring KOR, a naturally-occurring MOR, or any combination thereof. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally-occurring ORL1, a non-naturally-occurring DOR, a non-naturally-occurring KOR, a non-naturally-occurring MOR, or any combination thereof. In still other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express either a naturally-occurring ORL1 or a non-naturally-occurring ORL1, a naturally-occurring DOR or a non-naturally-occurring DOR, a naturally-occurring KOR or a non-

naturally-occurring KOR, a naturally-occurring MOR or a non-naturally-occurring MOR, or any combination thereof.

[0144] In yet another embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express an exogenous galanin receptor 1, an exogenous galanin receptor 2, an exogenous galanin receptor 3, or any combination thereof. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally-occurring galanin receptor 1, a naturally-occurring galanin receptor 2, a naturally-occurring galanin receptor 3, or any combination thereof. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally-occurring galanin receptor 1, a non-naturally-occurring galanin receptor 2, a non-naturally-occurring galanin receptor 3, or any combination thereof. In still other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express either a naturally-occurring galanin receptor 1 or a non-naturally-occurring galanin receptor 1, a naturally-occurring galanin receptor 2 or a non-naturally-occurring galanin receptor 2, a naturally-occurring galanin receptor 3 or a non-naturally-occurring galanin receptor 3, or any combination thereof.

[0145] Cells that express one or more endogenous or exogenous re-targeted endopeptidase receptors can be identified by routine methods including direct and indirect assays for re-targeted endopeptidaseuptake. Assays that determine retargeted endopeptidase binding or uptake properties can be used to assess whether a cell is expressing a retargeted endopeptidase receptor. Such assays include, without limitation, cross-linking assays using labeled retargeted endopeptidase, such as, e.g., [125I] retargeted endopeptidase, see, e.g., Noriko Yokosawa et al., *Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines*, 57(1) Infect. Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa et al., *Binding of botulinum type CI, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes*, 29(2) Toxicon 261-264 (1991); and Tei-ichi Nishiki et al., *Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes*, 269(14) J. Biol. Chem. 10498-10503 (1994). Other non-limiting assays include immunocytochemical assays that detect retargeted endopeptidase binding using labeled or unlabeled antibodies, see, e.g., Atsushi Nishikawa et al., *The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells*, 319(2) Biochem. Biophys. Res. Commun. 327-333 (2004) and immunoprecipitation assays, see, e.g., Yukako Fujinaga et al., *Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes*, 150(Pt 5) Microbiology 1529-1538 (2004), that detect bound re-targeted endopeptidase using labeled or unlabeled antibodies. Antibodies useful for these assays include, without limitation, antibodies selected against retargeted endopeptidase and/or antibodies selected against a retargeted endopeptidase receptor, such as, e.g., ORL1, DOR, KOR, MOR, galanin receptor 1, galanin receptor 2, or galanin receptor 3. If the antibody is labeled, the binding of the molecule can be detected by various means, including Western blot analysis, direct microscopic observation of the cellular location of the antibody, measurement of cell or substrate-bound antibody following a wash step, flow cytometry, electrophoresis or capillary electrophoresis, employing techniques

well-known to those of skill in the art. If the antibody is unlabeled, one may employ a labeled secondary antibody for indirect detection of the bound molecule, and detection can proceed as for a labeled antibody. It is understood that these and similar assays that determine retargeted endopeptidase uptake properties or characteristics can be useful in identifying cells expressing endogenous or exogenous or retargeted endopeptidase receptors.

[0146] Assays that monitor the release of a molecule after exposure to a retargeted endopeptidase can also be used to assess whether a cell is expressing one or more endogenous or exogenous retargeted endopeptidase receptors. In these assays, inhibition of the molecule's release would occur in cells expressing a retargeted endopeptidase receptor after retargeted endopeptidase treatment. Well known assays include methods that measure inhibition of radio-labeled catecholamine release from neurons, such as, e.g., [3H] noradrenaline or [3H] dopamine release, see e.g., A Fassio et al., *Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F*, 90(3) Neuroscience 893-902 (1999); and Sara Stigliani et al., *The sensitivity of catecholamine release to botulinum toxin C1 and E suggests selective targeting of vesicles set into the readily releasable pool*, 85(2) J. Neurochem. 409-421 (2003), or measures catecholamine release using a fluorometric procedure, see, e.g., Anton de Paiva et al., *A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly*, 268(28) J. Biol. Chem. 20838-20844 (1993); Gary W. Lawrence et al., *Distinct exocytotic responses of intact and permeabilised chromaffin cells after cleavage of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) or synaptobrevin by botulinum toxin A or B*, 236(3) Eur. J. Biochem. 877-886 (1996); and Patrick Foran et al., *Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release*, 35(8) Biochemistry 2630-2636 (1996). Other non-limiting examples include assays that measure inhibition of hormone release from endocrine cells, such as, e.g., anterior pituitary cells or ovarian cells. It is understood that these and similar assays for molecule release can be useful in identifying cells expressing endogenous or exogenous or retargeted endopeptidase receptors.

[0147] Assays that detect the cleavage of a SNAP-25 substrate after exposure to a retargeted endopeptidase can also be used to assess whether a cell is expressing one or more endogenous or exogenous retargeted endopeptidase receptors. In these assays, generation of a SNAP-25 cleavage-product, or disappearance of the intact SNAP-25, would be detected in cells expressing a retargeted endopeptidase receptor after a retargeted endopeptidase treatment. Non-limiting examples of specific Western blot analysis, as well as well-characterized reagents, conditions and protocols are readily available from commercial vendors that include, without limitation, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, and Stratagene, Inc., La Jolla, CA. It is understood that these and similar assays for SNAP-25 cleavage can be useful in identifying cells expressing endogenous or exogenous retargeted endopeptidase receptors.

[0148] As non-limiting examples, Western blot analysis using an antibody that recognizes SNAP-25-cleaved product or both the cleaved and uncleaved forms of SNAP-25 can be used to assay for uptake of a retargeted endopeptidase. Examples of α-SNAP-25 antibodies useful for these assays include, without limitation, SMI-81 α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody (Stemberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), CI 71.1 mouse α-SNAP-25 monoclonal antibody (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), CI 71.2 α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), SP12 α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody (Abcam, Cambridge, MA), α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum S9684 (Sigma, St. Louis, MO), and α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum (Abcam, Cambridge, MA).

[0149] Aspects of the present disclosure provide cells that through genetic manipulation or recombinant engineering are made to expresses an exogenous SNAP-25 and/or one or more exogenous retargeted endopeptidase receptors. Cells useful to express an exogenous SNAP-25 and/or one or more exogenous retargeted endopeptidase receptors through genetic manipulation or recombinant engineering include neuronal cells and non-neuronal cells that may or may not express an endogenous SNAP-25 and/or one or more endogenous retargeted endopeptidase receptors. It is further understood that such genetically manipulated or recombinantly engineered cells may express an exogenous SNAP-25 and one or more exogenous retargeted endopeptidase receptors under control of a constitutive, tissue-specific, cell-specific or inducible promoter element, enhancer element or both. It is understood that any cell is useful as long as the cell can be genetically manipulated or recombinantly engineered to expresses an exogenous SNAP-25 and/or one or more exogenous retargeted endopeptidase receptors and is capable of undergoing retargeted endopeptidase activity.

[0150] Methods useful for introducing into a cell an exogenous polynucleotide molecule encoding a component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate, such as, *e.g.*, a SNAP-25, an ORL1, a DOR, a KOR, or a MOR, include, without limitation, chemical-mediated delivery methods, such as, *e.g.*, calcium phosphate-mediated, diethyl-aminoethyl (DEAE) dextran-mediated, lipid-mediated, polyethyleneimine (PEI)-mediated, polylysine-mediated and polybrene-mediated; physical-mediated delivery methods, such as, *e.g.*, biolistic particle delivery, microinjection, protoplast fusion and electroporation; and viral-mediated delivery methods, such as, *e.g.*, retroviral-mediated transfection, *see e.g.*, *Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells*, pp. 16.1-16.62 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001); Alessia Colosimo et al., *Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells*, 29(2) Biotechniques 314-318, 320-322, 324 (2000); Philip Washbourne & A. Kimberley McAllister, *Techniques for Gene Transfer into Neurons*, 12(5) Curr. Opin. Neurobiol. 566-573 (2002); and Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, pp 9.16.4-9.16.11 (2000), each of which is incorporated by reference in its entirety. One skilled in the art understands that selection of a specific method to introduce a polynucleotide molecule into a cell will depend, in part, on whether the cell will

transiently or stably contain a component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate. Non-limiting examples of polynucleotide molecule encoding a component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate as follows: ORL1 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 61 or SEQ ID NO: 62; DOR polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 63 or SEQ ID NO: 64; KOR polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 65 or SEQ ID NO: 66; MOR polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 67; galanin receptor 1 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, or SEQ ID NO: 143, galanin receptor 2 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 144, or galanin receptor 3 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 145, and SNAP-25 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 68, or SEQ ID NO: 69.

[0151] Chemical-mediated delivery methods are well-known to a person of ordinary skill in the art and are described in, *e.g.*, Martin Jordan & Florian Worm, *Transfection of Adherent and Suspended Cells by Calcium Phosphate*, 33(2) Methods 136-143 (2004); Chun Zhang et al., *Polyethylenimine Strategies for Plasmid Delivery to Brain-Derived Cells*, 33(2) Methods 144-150 (2004), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. Such chemical-mediated delivery methods can be prepared by standard procedures and are commercially available, see, *e.g.*, CellPhect Transfection Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); Mammalian Transfection Kit, Calcium phosphate and DEAE Dextran, (Stratagene, Inc., La Jolla, CA); Lipofectamine™ Transfection Reagent (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); ExGen 500 Transfection kit (Fermentas, Inc., Hanover, MD), and SuperFect and Effectene Transfection Kits (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

[0152] Physical-mediated delivery methods are well-known to a person of ordinary skill in the art and are described in, *e.g.*, Jeike E. Biewenga et al., *Plasmid-Mediated Gene Transfer in Neurons using the Biolistics Technique*, 71(1) J. Neurosci. Methods. 67-75 (1997); John O'Brien & Sarah C. R. Lummis, *Biolistic and Diolistic Transfection: Using the Gene Gun to Deliver DNA and Lipophilic Dyes into Mammalian Cells*, 33(2) Methods 121-125 (2004); M. Golzio et al., *In Vitro and In Vivo Electric Field-Mediated Permeabilization, Gene Transfer, and Expression*, 33(2) Methods 126-135 (2004); and Oliver Greschet al., *New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells*, 33(2) Methods 151-163 (2004), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0153] Viral-mediated delivery methods are well-known to a person of ordinary skill in the art and are described in, *e.g.*, Chooi M. Lai et al., *Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors*, 21(12) DNA Cell Biol. 895-913 (2002); Ilya Frolov et al., *Alphavirus-Based Expression Vectors: Strategies and Applications*, 93(21) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 11371-11377 (1996); Roland Wolkowicz et al., *Lentiviral Vectors for the Delivery of DNA into Mammalian Cells*, 246 Methods Mol. Biol. 391-411 (2004); A. Huser & C. Hofmann, *Baculovirus Vectors: Novel Mammalian Cell Gene-Delivery Vehicles and Their Applications*, 3(1) Am. J. Pharmacogenomics 53-63 (2003); Tiziana Tonini et al., *Transient Production of Retroviral- and Lentiviral-Based Vectors for the Transduction of Mammalian Cells*, 285 Methods Mol. Biol.

141-148 (2004); Manfred Gossen & Hermann Bujard, *Tight Control of Gene Expression in Eukaryotic Cells by Tetracycline-Responsive Promoters*, U.S. Patent No. 5,464,758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, *Methods for Regulating Gene Expression*, U.S. Patent No. 5,814,618; David S. Hogness, *Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same*, U.S. Patent No. 5,514,578; David S. Hogness, *Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor*, U.S. Patent 6,245,531; Elisabetta Vegeto et al., *Progesterone Receptor Having C. Terminal Hormone Binding Domain Truncations*, U.S. Patent No. 5,364,791; Elisabetta Vegeto et al., *Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy*, U.S. Patent No. 5,874,534, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. Such viral-mediated delivery methods can be prepared by standard procedures and are commercially available, see, e.g., ViraPower™ Adenoviral Expression System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) and ViraPower™ Adenoviral Expression System Instruction Manual 25-0543 version A, Invitrogen, Inc., (Jul. 15, 2002); and AdEasy™ Adenoviral Vector System (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) and AdEasy™ Adenoviral Vector System Instruction Manual 064004f, Stratagene, Inc. Furthermore, such viral delivery systems can be prepared by standard methods and are commercially available, see, e.g., BD™ Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems (BD Biosciences-Clonetech, Palo Alto, CA) and BD™ Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems User Manual, PT3001-1, BD Biosciences Clonetech, (Mar. 14, 2003), GeneSwitch™ System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) and GeneSwitch™ System A Mifepristone-Regulated Expression System for Mammalian Cells version D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (Nov. 4, 2002); ViraPower™ Lentiviral Expression System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) and ViraPower™ Lentiviral Expression System Instruction Manual 25-0501 version E, Invitrogen, Inc., (Dec. 8, 2003); and Complete Control® Retroviral Inducible Mammalian Expression System (Stratagene, La Jolla, CA) and Complete Control® Retroviral Inducible Mammalian Expression System Instruction Manual, 064005e.

[0154] Thus, in an embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity transiently contain a polynucleotide molecule encoding a component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate. In another embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity transiently contain a polynucleotide molecule encoding a plurality of components necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity transiently contain a polynucleotide molecule encoding ORL1, DOR, KOR, MOR, or SNAP-25. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity transiently contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 61, or SEQ ID NO: 62 encoding ORL1. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity transiently contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 63, or SEQ ID NO: 64 encoding DOR. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity transiently contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 65, or SEQ ID NO: 66 encoding KOR. In

still other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity transiently contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 67 encoding MOR.

[0155] In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity transiently contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, or SEQ ID NO: 143 encoding Galanin receptor 1. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity transiently contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 144 encoding Galanin receptor 2. In still other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity transiently contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 145 encoding Galanin receptor 3. In further aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity transiently contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 68 or SEQ ID NO: 69 encoding SNAP-25.

[0156] In another embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity stably contain a polynucleotide molecule encoding a component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate. In another embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity stably contain a polynucleotide molecule encoding a plurality of components necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity stably contain a polynucleotide molecule encoding ORL1, DOR, KOR, MOR, or SNAP-25. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity stably contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 61, or SEQ ID NO: 62 encoding ORL1. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity stably contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 63, or SEQ ID NO: 64 encoding DOR. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity stably contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 65, or SEQ ID NO: 66 encoding KOR. In still other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity stably contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 67 encoding MOR.

[0157] In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity stably contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, or SEQ ID NO: 143 encoding Galanin receptor 1. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity stably contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 144 encoding Galanin receptor 2. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity stably contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 145 encoding Galanin receptor 3. In further aspects of this

embodiment, cells from an established cell line susceptible to retargeted endopeptidase activity stably contain the polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 68 or SEQ ID NO: 69 encoding SNAP-25.

[0158] As mentioned above, an exogenous component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate, such as, *e.g.*, a SNAP-25, an ORL1, a DOR, a KOR, a MOR, a Galanin receptor 1, a Galanin receptor 2, or a Galanin receptor 3, disclosed in the present specification can be introduced into a cell. Any and all methods useful for introducing such an exogenous component with a delivery agent into a cell population can be useful with the proviso that this method transiently introduces the exogenous component disclosed in the present specification in at least 50% of the cells within a given cell population. Thus, aspects of this embodiment can include a cell population in which, e.g., at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, or at least 90% of the given cell population transiently contains an exogenous component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a retargeted endopeptidase proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate, such as, *e.g.*, a SNAP-25, an ORL1, a DOR, a KOR, a MOR, a Galanin receptor 1, a Galanin receptor 2, or a Galanin receptor 3, disclosed in the present specification. As used herein, the term "delivery agent" refers to any molecule that enables or enhances internalization of a covalently-linked, non-covalently-linked or in any other manner associated with a polypeptide into a cell. Thus, the term "delivery agent" encompasses, without limitation, proteins, peptides, peptidomimetics, small molecules, polynucleotide molecules, liposomes, lipids, viruses, retroviruses and cells that, without limitation, transport a covalently or non-covalently linked molecule to the cell membrane, cell cytoplasm or nucleus. It further is understood that the term "delivery agent" encompasses molecules that are internalized by any mechanism, including delivery agents which function via receptor mediated endocytosis and those which are independent of receptor mediated endocytosis.

[0159] A delivery agent can also be an agent that enables or enhances cellular uptake of a covalently linked component, like SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, Galanin receptor 1, Galanin receptor 2, or Galanin receptor 3, such as, *e.g.*, by chemical conjugation or by genetically produced fusion proteins. Methods that covalently link delivery agents and methods of using such agents are described in, e.g., Steven F. Dowdy, *Protein Transduction System and Methods of Use Thereof*, International Publication No WO 00/34308; Gérard Chassaing & Alain Prochiantz, *Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules*, U.S. Patent No. 6,080,724; Alan Frankel et al., *Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiert*, U.S. Patent No. 5,674,980; Alan Frankel et al., *TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates*, U.S. Patent No. 5,747,641; Alan Frankel et al., *TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins*, U.S. Patent No. 5,804,604; Peter F. J. O'Hare et al., *Use of Transport Proteins*, U.S. Patent No. 6,734,167; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, U.S. Patent No. 5,807,746; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, U.S. Patent No. 6,043,339; Yao-Zhong Lin et al., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, U.S. Patent No. 6,248,558; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic *Engineering*

of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity, U.S. Patent No. 6,432,680; Jack J. Hawiger et al., *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, U.S. Patent No. 6,495,518; Yao-Zhong Lin et al., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, U.S. Patent No. 6,780,843; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, U.S. Patent No. 6,306,993; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, U.S. Patent No. 6,495,663; and Pamela B. Davis et al., *Fusion Proteins for Protein Delivery*, U.S. Patent No. 6,287,817, each of which is incorporated by reference in its entirety.

[0160] A delivery agent can also be an agent that enables or enhances cellular uptake of a non-covalently associated component, like SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, Galanin receptor 1, Galanin receptor 2, or Galanin receptor 3. Methods that function in the absence of covalent linkage and methods of using such agents are described in, e.g., Gilles Divita et al, *Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use*, U.S. Patent No. 6,841,535; Philip L Felgner and Olivier Zelphati, *Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use*, U.S. Patent Publication No. 2003/0008813; and Michael Karas, *Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids*, U.S. Patent Publication 2004/0209797, each of which is incorporated by reference in its entirety. Such peptide delivery agents can be prepared and used by standard methods and are commercially available, see, e.g. the CHARIOT™ Reagent (Active Motif, Carlsbad, CA); BIO-PORTER® Reagent (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA), BIO TREK™ Protein Delivery Reagent (Stratagene, La Jolla, CA), and PRO-JECT™ Protein Transfection Reagent (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

[0161] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a sample comprising a retargeted endopeptidase. As used herein, the term "sample comprising a retargeted endopeptidase" refers to any biological matter that contains or potentially contains an active retargeted endopeptidase. A variety of samples can be assayed according to a method disclosed in the present specification including, without limitation, purified, partially purified, or unpurified retargeted endopeptidase; recombinant single chain or di-chain retargeted endopeptidase with a naturally or non-naturally occurring sequence; recombinant retargeted endopeptidase with a modified protease specificity; recombinant retargeted endopeptidase with an altered cell specificity; bulk retargeted endopeptidase; a formulated retargeted endopeptidase product; and cells or crude, fractionated or partially purified cell lysates from, *e.g.*, bacteria, yeast, insect, or mammalian sources; blood, plasma or serum; raw, partially cooked, cooked, or processed foods; beverages; animal feed; soil samples; water samples; pond sediments; lotions; cosmetics; and clinical formulations. It is understood that the term sample encompasses tissue samples, including, without limitation, mammalian tissue samples, livestock tissue samples such as sheep, cow and pig tissue samples; primate tissue samples; and human tissue samples. Such samples encompass, without limitation, intestinal samples such as infant intestinal samples, and tissue samples obtained from a wound. As non-limiting examples, a method of detecting picomolar amounts of retargeted endopeptidase activity can be useful for determining the presence or activity of a retargeted endopeptidase in a food or

beverage sample; to assay a sample from a human or animal, for example, exposed to a retargeted endopeptidase or having one or more symptoms of botulism; to follow activity during production and purification of bulk retargeted endopeptidase; to assay a formulated retargeted endopeptidase product used in pharmaceutical or cosmetics applications; or to assay a subject's blood serum for the presence or absence of neutralizing α-retargeted endopeptidase antibodies.

[0162] Thus, in an embodiment, a sample comprising a retargeted endopeptidase is a sample comprising any amount of a retargeted endopeptidase. In aspects of this embodiment, a sample comprising a retargeted endopeptidase comprises about 100 ng or less, about 10 ng or less, about 1 ng or less, about 100 pg or less, about 10 pg or less, or about 1 pg or less of a retargeted endopeptidase. In other aspects of this embodiment, a sample comprising a retargeted endopeptidase comprises about 1 μM or less, about 100 nM or less, about 10 nM or less, about 1 nM or less, about 100 nM or less, about 10 nM or less, about 1 nM or less of a retargeted endopeptidase.

[0163] Aspects of the present disclosure comprise, in part, isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. As used herein, the term "SNAP-25 component comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond" refers to a cellular component containing the SNAP-25 cleavage product. It is envisioned that any method suitable for enriching or isolating a SNAP-25 component can be useful, including, without limitation, cell lysing protocols, spin-column purification protocols, immunoprecipitation, affinity purification, and protein chromatography.

[0164] Aspects of the present disclosure comprise, in part, an α-SNAP-25 antibody linked to a solid phase support. As used herein, the term "solid-phase support" is synonymous with "solid phase" and refers to any matrix that can be used for immobilizing an α-SNAP-25 antibody disclosed in the present specification. Non-limiting examples of solid phase supports include, e.g., a tube; a plate; a column; pins or "dipsticks"; a magnetic particle, a bead or other spherical or fibrous chromatographic media, such as, e.g., agarose, sepharose, silica and plastic; and sheets or membranes, such as, e.g., nitrocellulose and polyvinylidene fluoride (PVDF). The solid phase support can be constructed using a wide variety of materials such as, *e.g.*, glass, carbon, polystyrene, polyvinylchloride, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, diazocellulose, or starch. The solid phase support selected can have a physical property that renders it readily separable from soluble or unbound material and generally allows unbound materials, such as, *e.g.*, excess reagents, reaction by-products, or solvents, to be separated or otherwise removed (by, *e.g.*, washing, filtration, centrifugation, etc.) from solid phase support-bound assay component. Non-limiting examples of how to make and use a solid phase supports are described in, e.g., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, *supra*, (2001); and Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, (2004), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

91

[0165] Aspects of the present disclosure comprise, in part, detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. It is envisioned that any detection system can be used to practice aspects of this disclosed immuno-based method, with the provision that the signal to noise ratio can distinguish to a statistically significant degree the signal from the antibody-antigen complex from the background signal. Non-limiting examples of immuno-based detection systems include immunoblot analysis, like Western blotting and dot-blotting, immunoprecipitation analysis, enzyme-linked immunosorbent analysis (ELISA), and sandwich ELISA. The detection of the signal can be achieved using autoradiography with imaging or phosphorimaging (AU), chemiluminescense (CL), electrochemiluminescence (ECL), bioluminescence (BL), fluorescence, resonance energy transfer, plane polarization, colormetric, or flow cytometry (FC). Descriptions of immuno-based detection systems are disclosed in, *e.g.*, Michael M.Rauhut, Chemiluminescence, In Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3rd ed, John Wiley and Sons, 1985); A. W. Knight, *A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenerated Chemiluminescence*, Trends Anal. Chem. 18(1): 47-62 (1999); K. A. Fahnrich, et al., *Recent Applications of Electrogenerated Chemiluminescence in Chemical Analysis*, Talanta 54(4): 531-559 (2001); *Commonly Used Techniques in Molecular Cloning*, pp. A8.1-A8-55 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001); *Detection Systems*, pp. A9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001); Electrogenerated Chemiluminescence, (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0166] A sandwich ELISA (or sandwich immunoassay) is a method based on two antibodies, which bind to different epitopes on the antigen. A capture antibody having a high binding specificity for the antigen of interest, is bound to a solid surface. The antigen is then added followed by addition of a second antibody referred to as the detection antibody. The detection antibody binds the antigen to a different epitope than the capture antibody. The antigen is therefore 'sandwiched' between the two antibodies. The antibody binding affinity for the antigen is usually the main determinant of immunoassay sensitivity. As the antigen concentration increases the amount of detection antibody increases leading to a higher measured response. To quantify the extent of binding different reporter systems can be used, such as, *e.g.*, an enzyme attached to the secondary antibody and a reporter substrate where the enzymatic reaction forms a readout as the detection signal. The signal generated is proportional to the amount of target antigen present in the sample. The reporter substrate used to measure the binding event determines the detection mode. A spectrophotometric plate reader is used for colorimetric detection. Chemiluminescent and electrochemiluminescence substrates have been developed which further amplify the signal and can be read on a luminescent reader. The reporter can also be a fluorescent readout where the enzyme step of the assay is replaced with a fluorophore and the readout is then measured using a fluorescent reader. Reagents and protocols necessary to perform an ECL sandwich ELISA are commercially available,

172

including, without exception, MSD sandwich ELISA-ECL detection platform (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

[0167] Thus, in an embodiment, detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be performed using an immuno-blot analysis, an immunoprecipitation analysis, an ELISA, or a sandwich ELISA. In aspects of this embodiment, the detection is performed using a AU, CL, ECL, or BL immuno-blot analysis, a AU, CL, ECL, BL, or FC immunoprecipitation analysis, a AU, CL, ECL, BL, or FC ELISA, or a AU, CL, ECL, BL, or FC sandwich ELISA.

[0168] Aspects of the present disclosure can be practiced in a singleplex or multiplex fashion. An immuno-based method of detecting retargeted endopeptidase activity practiced in a single-plex fashion is one that only detects the presence of an antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. An immuno-based method of detecting retargeted endopeptidase activity practiced in a multiplex fashion is one that concurrently detects the presence of two or more antibody-antigen complexes; one of which is the antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; and the other(s) of which is antibody-antigen complex to a second, third, fourth,etc. different protein. A second protein can be used, *e.g.*, as an internal control to minimize sample to sample variability by normalizing the amount of α-SNAP-25/SNAP-25 antibody-antigen complex detected to the amount of antibody-antigen complex detected for the second protein. As such, the second protein is usually one that is consistently expressed by the cell, such as a house-keeping protein. Non-limiting examples of a useful second protein, include, *e.g.*, a Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), Syntaxin, cytokines. Methods of performing an immuno-based assay in a multiplex fashion are described in, *e.g.*, U. B. Nielsen and B. H. Geierstanger, *Multiplexed Sandwich Assays in Microarray Format*, J. Immunol. Methods. 290(1-2): 107-120 2004); R. Barry and M. Soloviev, *Quantitative Protein Profiling using Antibody Arrays*, Proteomics, 4(12): 3717-3726 (2004); M. M. Ling et al., *Multiplexing Molecular Diagnostics and Immunoassays using Emerging Microarray Technologies*, Expert Rev Mol Diagn. 7(1): 87-98 (2007); S. X. Leng et al., *ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research*, J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63(8): 879-884 (2008), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0169] Thus, in one embodiment, an immuno-based method of detecting retargeted endopeptidase activity practiced in a single-plex fashion by only detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. In another embodiment, immuno-based method of

detecting retargeted endopeptidase activity practiced in a multiplex fashion by concurrently detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond and at least one other antibody-antigen complex to a protein other than SNAP-25, such as, *e.g.*, GAPDH or Syntaxin.

[0170] Aspects of the present disclosure provide, in part, a method of determining re-targeted endopeptidase immunoresistance. As used herein, the term "re-targeted endopeptidase immunoresistance" means a mammal that does not fully respond to a re-targeted endopeptidase therapy, or shows a reduced beneficial effect of a re-targeted endopeptidase therapy because the immune response of that mammal, either directly or indirectly, reduces the efficacy of the therapy. A non-limiting example of reduced efficacy would be the presence in a mammal of at least one neutralizing α-re-targeted endopeptidase antibody that binds to a re-targeted endopeptidase in a manner that reduces or prevents the specificity or activity of the re-targeted endopeptidase. As used herein, the term "re-targeted endopeptidase therapy" means a treatment, remedy, cure, healing, rehabilitation or any other means of counteracting something undesirable in a mammal requiring neuromodulation using a re-targeted endopeptidase or administering to a mammal one or more controlled doses of a medication, preparation or mixture of a re-targeted endopeptidase that has medicinal, therapeutic, curative, cosmetic, remedial or any other beneficial effect. Re-targeted endopeptidase therapy encompasses, without limitation, the use of any naturally occurring or modified fragment thereof, in any formulation, combined with any carrier or active ingredient and administered by any route of administration.

[0171] Aspects of the present disclosure provide, in part, a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α-re-targeted endopeptidase neutralizing antibodies. As used herein, the term "test sample" refers to any biological matter that contains or potentially contains at least one α-re-targeted endopeptidase antibody. An α-re-targeted endopeptidase antibody can be a neutralizing α-re-targeted endopeptidase antibody or a non-neutralizing α-re-targeted endopeptidase antibody. As used herein, the term "neutralizing α-re-targeted endopeptidase antibodies" means any α-re-targeted endopeptidase antibody that will, under physiological conditions, bind to a region of a re-targeted endopeptidase in such a manner as to reduce or prevent the re-targeted endopeptidase from exerting its effect in a re-targeted endopeptidase therapy. As used herein, the term "non-neutralizing α-re-targeted endopeptidase antibodies" means any α-re-targeted endopeptidase antibody that will, under physiological conditions, bind to a region of a re-targeted endopeptidase, but not prevent the re-targeted endopeptidase from exerting its effect in a re-targeted endopeptidase therapy. It is envisioned that any and all samples that can contain α-re-targeted endopeptidase antibodies can be used in this method, including, without limitation, blood, plasma, serum and lymph fluid. In addition, any and all organisms capable of raising α-re-targeted endopeptidase antibodies against a re-targeted endopeptidase can serve as a source for a sample including, but not limited to, birds and mammals, including mice, rats, goats, sheep, horses, donkeys, cows, primates and humans. Non-limiting examples of specific protocols for

blood collection and serum preparation are described in, e.g., Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, BLOOD COLLECTION IN HEALTHCARE (F.A. Davis Company, 2001); and Diana Garza & Kathleen Becan-McBride, PHLEBOTOMY HANDBOOK: BLOOD COLLECTION ESSENTIALS (Prentice Hall, 6th ed., 2002). These protocols are routine procedures well within the scope of one skilled in the art and from the teaching herein. A test sample can be obtained from an organism prior to exposure to a re-targeted endopeptidase, after a single re-targeted endopeptidase treatment, after multiple re-targeted endopeptidase treatments, before onset of resistance to a re-targeted endopeptidase therapy, or after onset of resistance to a re-targeted endopeptidase therapy.

[0172] Aspects of the present disclosure provide, in part, a control sample. As used herein, the term "control sample" means any sample in which the presence or absence of the test sample is known and includes both negative and positive control samples. With respect to neutralizing α-re-targeted endopeptidase antibodies, a negative control sample can be obtained from an individual who had never been exposed to re-targeted endopeptidase and may include, without limitation, a sample from the same individual supplying the test sample, but taken before undergoing a re-targeted endopeptidase therapy; a sample taken from a different individual never been exposed to re-targeted endopeptidase; a pooled sample taken from a plurality of different individuals never been exposed to BoNT/A. With respect to neutralizing α-re-targeted endopeptidase antibodies, a positive control sample can be obtained from an individual manifesting re-targeted endopeptidase immunoresistance and includes, without limitation, individual testing positive in a patient-based testing assays; individual testing positive in an *in vivo* bioassay; and individual showing hyperimmunity, *e.g.*, a re-targeted endopeptidase vaccinated individual.

[0173] It is further foreseen that α-re-targeted endopeptidase antibodies can be purified from a sample. α-Re-targeted endopeptidase antibodies can be purified from a sample, using a variety of procedures including, without limitation, Protein A/G chromatography and affinity chromatography. Non-limiting examples of specific protocols for purifying antibodies from a sample are described in, *e.g.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998); USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL NO. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998); and MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, *supra*, (2001), which are hereby incorporated by reference. In addition, non-limiting examples of antibody purification methods as well as well-characterized reagents, conditions and protocols are readily available from commercial vendors that include, without limitation, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; and Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA. These protocols are routine procedures well within the scope of one skilled in the art.

[0174] Thus, in an embodiment, a sample comprises blood. In aspect of this embodiment, the sample comprises mouse blood, rat blood, goat blood, sheep blood, horse blood, donkey blood, cow blood, primate blood or human blood. In another embodiment, a sample comprises plasma. In an aspect of this embodiment, a test sample comprises mouse plasma, rat plasma, goat plasma, sheep plasma, horse

plasma, donkey plasma, cow plasma, primate plasma or human plasma. In another embodiment, a sample comprises serum. In an aspect of this embodiment, the sample comprises mouse serum, rat serum, goat serum, sheep serum, horse serum, donkey serum, cow serum, primate serum and human serum. In another embodiment, a sample comprises lymph fluid. In aspect of this embodiment, a sample comprises mouse lymph fluid, rat lymph fluid, goat lymph fluid, sheep lymph fluid, horse lymph fluid, donkey lymph fluid, cow lymph fluid, primate lymph fluid or human lymph fluid. In yet another embodiment, a sample is a test sample. In yet another embodiment, a sample is a control sample. In aspects of this embodiment, a control sample is a negative control sample or a positive control sample.

[0175] Aspects of the present disclosure provide, in part, comparing the amount of SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond detected in step (d) to the amount of SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond detected in step (e). In an embodiment, the amount of SNAP-25 cleavage product in the test sample is higher as compared to the amount of SNAP-25 cleavage product in the control sample. In an aspect of this embodiment, a higher amount of SNAP-25 cleavage product in the test sample as compared to a positive control sample indicates a reduction in or lack of re-targeted endopeptidase immunoresistance in the mammal. In another aspect of this embodiment, an equivalent amount of SNAP-25 cleavage product in the test sample as compared to a negative control sample indicates a reduction in or lack of re-targeted endopeptidase immunoresistance in the mammal. In another embodiment, the amount of SNAP-25 cleavage product in the test sample is lower as compared to the amount of SNAP-25 cleavage product in the control sample. In an aspect of this embodiment, a lower or equivalent amount of SNAP-25 cleavage product in the test sample as compared to a positive control sample indicates an increase in or presence of re-targeted endopeptidase immunoresistance in the mammal. In another aspect of this embodiment, a lower amount of SNAP-25 cleavage product in the test sample as compared to a negative control sample indicates an increase in or presence of re-targeted endopeptidase immunoresistance in the mammal.

[0176] It is envisioned that any and all assay conditions suitable for detecting the present of a neutralizing α-re-targeted endopeptidase antibody in a sample are useful in the methods disclosed in the present specification, such as, *e.g.*, linear assay conditions and non-linear assay conditions. In an embodiment, the assay conditions are linear. In an aspect of this embodiment, the assay amount of a re-targeted endopeptidase is in excess. In another aspect of this embodiment, the assay amount of a re-targeted endopeptidase is rate-limiting. In another aspect of this embodiment, the assay amount of a test sample is rate-limiting.

[0177] Aspects of the present disclosure can also be described as follows:

1. A method of detecting retargeted endopeptidase activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a retargeted endopeptidase,

wherein the cell from an established cell line is susceptible to retargeted endopeptidase activity by a retargeted endopeptidase; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; c) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; and d) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; wherein detection by the antibody-antigen complex is indicative of retargeted endopeptidase activity.

2. A method of detecting retargeted endopeptidase activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a retargeted endopeptidase, wherein the cell from an established cell line is susceptible to retargeted endopeptidaseactivity by a retargeted endopeptidase; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; c) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody linked to a solid phase support, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; and d) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; wherein detection by the antibody-antigen complex is indicative of retargeted endopeptidase activity.

3. A method of detecting retargeted endopeptidase activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a retargeted endopeptidase, wherein the cell from an established cell line is susceptible to retargeted endopeptidase activity by a retargeted endopeptidase; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; c) fixing the SNAP-25 component to a solid phase support; d) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; and e) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; wherein detection by the antibody-antigen complex is indicative of retargeted endopeptidase activity.

4. A method of detecting retargeted endopeptidase activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a retargeted endopeptidase, wherein the cell from an established cell line can uptake retargeted endopeptidase; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; c) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope

comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; and d) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; wherein detection by the antibody-antigen complex is indicative of retargeted endopeptidase activity.

5. A method of detecting retargeted endopeptidase activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a retargeted endopeptidase, wherein the cell from an established cell line can uptake retargeted endopeptidase; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; c) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody linked to a solid phase support, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; and d) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; wherein detection by the antibody-antigen complex is indicative of retargeted endopeptidase activity.

6. A method of detecting retargeted endopeptidase activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a retargeted endopeptidase, wherein the cell from an established cell line can uptake retargeted endopeptidase; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; c) fixing the SNAP-25 component to a solid phase support; d) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; and e) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; wherein detection by the antibody-antigen complex is indicative of retargeted endopeptidase activity.

7. A method of determining retargeted endopeptidase immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a retargeted endopeptidase to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies; b) treating a cell from an established cell line with the test sample, wherein the cell from an established cell line is susceptible to retargeted endopeptidase activity; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; d) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; e) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; f) repeating steps b-e with a negative control sample instead of a test sample, the

negative control sample comprising a retargeted endopeptidase and a serum known not to contain α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies; and g) comparing the amount of antibody-antigen complex detected in step e to the amount of antibody-antigen complex detected in step f, wherein detection of a lower amount of antibody-antigen complex detected in step e relative to the amount of antibody-antigen complex detected in step f is indicative of the presence of α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies.

8. A method of determining retargeted endopeptidase immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a retargeted endopeptidase to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies; b) treating a cell from an established cell line with the test sample, wherein the cell from an established cell line is susceptible to retargeted endopeptidase activity; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; d) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody linked to a solid phase support, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; e) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-retargeted endopeptidase antibody and the SNAP-25 cleavage product; f) repeating steps b-e with a negative control sample instead of a test sample, the negative control sample comprising a re-targeted endopeptidase and a serum known not to contain α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies; and g) comparing the amount of antibody-antigen complex detected in step e to the amount of antibody-antigen complex detected in step f, wherein detection of a lower amount of antibody-antigen complex detected in step e relative to the amount of antibody-antigen complex detected in step f is indicative of the presence of α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies.

9. A method of determining retargeted endopeptidase immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a retargeted endopeptidase to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies; b) treating a cell from an established cell line with the test sample, wherein the cell from an established cell line is susceptible to retargeted endopeptidase activity; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; d) fixing the SNAP-25 component to a solid phase support; e) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; f) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; g) repeating steps b-f with a negative control sample instead of a test sample, the negative control sample comprising a re-targeted endopeptidase and a serum known not to contain α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies; and h) comparing the amount of antibody-antigen complex detected in step f

to the amount of antibody-antigen complex detected in step g, wherein detection of a lower amount of antibody-antigen complex detected in step f relative to the amount of antibody-antigen complex detected in step g is indicative of the presence of α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies.

10. A method of determining retargeted endopeptidase immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a retargeted endopeptidase to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies; b) treating a cell from an established cell line with the test sample, wherein the cell from an established cell line can uptake retargeted endopeptidase; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; d) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; e) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; f) repeating steps b-e with a negative control sample instead of a test sample, the negative control sample comprising a retargeted endopeptidase and a serum known not to contain α-re-targeted endopeptidase neutralizing antibodies; and g) comparing the amount of antibody-antigen complex detected in step e to the amount of antibody-antigen complex detected in step f, wherein detection of a lower amount of antibody-antigen complex detected in step e relative to the amount of antibody-antigen complex detected in step f is indicative of the presence of α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies.

11. A method of determining retargeted endopeptidase immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a re-targeted endopeptidase to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α-re-targeted endopeptidase neutralizing antibodies; b) treating a cell from an established cell line with the test sample, wherein the cell from an established cell line can uptake retargeted endopeptidase; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; d) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody linked to a solid phase support, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; e) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; f) repeating steps b-e with a negative control sample instead of a test sample, the negative control sample comprising a retargeted endopeptidase and a serum known not to contain α-re-targeted endopeptidase neutralizing antibodies; and g) comparing the amount of antibody-antigen complex detected in step e to the amount of antibody-antigen complex detected in step f, wherein detection of a lower amount of antibody-antigen complex detected in step e relative to the amount of antibody-antigen complex detected in step f is indicative of the presence of α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies.

12. A method of determining retargeted endopeptidase immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a retargeted endopeptidase to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies; b) treating a cell from an established cell line with the test sample, wherein the cell from an established cell line can uptake retargeted endopeptidase; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; d) fixing the SNAP-25 component to a solid phase support; e) contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; f) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; g) repeating steps b-f with a negative control sample instead of a test sample, the negative control sample comprising a retargeted endopeptidase and a serum known not to contain α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies; and h) comparing the amount of antibody-antigen complex detected in step f to the amount of antibody-antigen complex detected in step g, wherein detection of a lower amount of antibody-antigen complex detected in step f relative to the amount of antibody-antigen complex detected in step g is indicative of the presence of α-retargeted endopeptidase neutralizing antibodies.

13. The method of 1-3 and 7-9, wherein the cell is susceptible to retargeted endopeptidase activity by about 500 nM or less, by about 400 nM or less, by about 300 nM or less, by about 200 nM or less, by about 100 nM or less of a retargeted endopeptidase.

14. The method of 4-6 and 10-12, wherein the cell can uptake about 500 nM or less, by about 400 nM or less, by about 300 nM or less, by about 200 nM or less, by about 100 nM or less of retargeted endopeptidase.

15. The method of 1-6, wherein the sample comprises about 100 ng or less, about 10 ng or less, about 1 ng or less, 100 fg or less, 10fg or less, or 1 fg or less of a retargeted endopeptidase.

16. The method of 1-6, wherein the sample comprises about 100 nM or less, about 10 nM or less, about 1 nM or less, about 100 nM or less, about 10 nM or less, about 1 nM or less, about 0.5 nM or less, or about 0.1 nM or less, of a retargeted endopeptidase.

17. The method of 1-12, wherein the presence of an antibody-antigen complex is detected by an immuno-blot analysis, an immunoprecipitation analysis, an ELISA, or a sandwich ELISA

18. The method of 1-12, wherein the method has a signal-to-noise ratio for the lower asymptote of at least 3:1, at least 5:1, at least 10:1, at least 20:1, at least 50:1, or at least 100:1.

19. The method of 1-12, wherein the method has a signal-to-noise ratio for the higher asymptote of at least 10:1, at least 20:1, at least 50:1, at least 100:1, at least 200:1, at least 300:1, at least 400:1, at least 500:1, or at least 600:1.

20. The method of 1-12, wherein the method can detect the EC_{50} activity of, *e.g.*, at least 100 ng, at least 50 ng, at least 10 ng, at least 5 ng, at least 100 pg, at least 50 pg, at least 10 pg, at least 5 pg, at least 100 fg, at least 50 fg, at least 10 fg, or at least 5 fg of a retargeted endopeptidase.

21. The method of 1-12, wherein the method can detect the EC_{50} activity of, *e.g.*, at least 10 nM, at least 5 nM, at least 100 nM, at least 50 nM, at least 10 nM, at least 5 nM, at least 1 nM, at least 0.5 nM, or at least 0.1 nM of a retargeted endopeptidase.

22. The method of 1-12, wherein the method has an LOD of, *e.g.*, 10 pg or less, 9 pg or less, 8 pg or less, 7 pg or less, 6 pg or less, 5 pg or less, 4 pg or less, 3 pg or less, 2 pg or less, 1 pg or less of a retargeted endopeptidase.

23. The method of 1-12, wherein the method has an LOD of, *e.g.*, 100 nM or less, 90 nM or less, 80 nM or less, 70 nM or less, 60 nM or less, 50 nM or less, 40 nM or less, 30 nM or less, 20 nM or less, or 10 nM or less of a retargeted endopeptidase.

24. The method of 1-12, wherein the method has an LOQ of, *e.g.*, 10 pg or less, 9 pg or less, 8 pg or less, 7 pg or less, 6 pg or less, 5 pg or less, 4 pg or less, 3 pg or less, 2 pg or less, 1 pg or less of a retargeted endopeptidase.

25. The method of 1-12, wherein the method has an LOQ of, *e.g.*, 100 nM or less, 90 nM or less, 80 nM or less, 70 nM or less, 60 nM or less, 50 nM or less, 40 nM or less, 30 nM or less, 20 nM or less, or 10 nM or less of a retargeted endopeptidase.

26. The method of 1-12, wherein the method can distinguish a fully-active retargeted endopeptidase from a partially-active retargeted endopeptidase having 70% or less, 60% or less, 50% or less, 40% or less, 30% or less, 20% or less, or 10% or less the activity of a fully-active retargeted endopeptidase A.

27. The method of 1-12, wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product.

28. The method of 27, wherein the α-SNAP-25 antibody has an association rate constant for an epitope not comprising a carboxyl-terminus glutamine of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a

SNAP-25 cleavage product of less than 1 x 10^1 M^{-1} s^{-1}; and wherein the α-SNAP-25 antibody has an equilibrium disassociation constant for the epitope of less than 0.450 nM.

29. The method of 27, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody has a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, and SEQ ID NO: 82; and a light chain variable region comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, and SEQ ID NO: 92.

30. The method of 27, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 93, the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 94, the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 95, the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 118, the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 119, or the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 120.

32. The method of 27, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 96, the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 97, the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 98, the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 99, the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 121, the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 122, or the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 123.

33. The method of 27, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_H CDR3 of SEQ ID NO: 100, the V_H CDR3 of SEQ ID NO: 101, the V_H CDR3 of SEQ ID NO: 102, or the V_H CDR3 of SEQ ID NO: 124.

34. The method of 27, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 103, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 104, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 105, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 106, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 107, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 125, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 126, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 127, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 128, or the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 129.

35. The method of 27, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_L CDR2 of SEQ ID NO: 108, the V_L CDR2 of SEQ ID NO: 109, the V_L CDR2 of SEQ ID NO: 110, the V_L CDR2 of SEQ ID NO: 111, or the V_L CDR2 of SEQ ID NO: 112.

36. The method of 27, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_L CDR3 of SEQ ID NO: 113, the V_L CDR3 of SEQ ID NO: 114, the V_L CDR3 of SEQ ID NO: 115, the V_L CDR3 of SEQ ID NO: 116, or the V_L CDR3 of SEQ ID NO: 117.

37. The method of 27, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 121 and SEQ ID NO: 100; and a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110 and SEQ ID NO: 115.

38. The method of 27, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody selectively binds the SNAP-25 epitope of SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147 or SEQ ID NO: 148.

39. The method of 27, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody selectively binds the SNAP-25 epitope of SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, or SEQ ID NO: 44.

EXAMPLES

Example I

Screening of Candidate Cell Lines for Endogenous Re-targeted Endopeptidase Receptor Expression

[0178] The following example illustrates how to identify established cell lines possessing the re-targeted endopeptidase uptake capacity required to develop a cell-based potency assay.

1. Growth of Stock Culture of candidate cell lines.

[0179] To grow the cell lines, a suitable density of cells from the cell line being tested were plated in a 162 cm^2 tissue culture flask containing 30 mL of a suitable growth medium (see Table 1), and grown in a 37 °C incubator under 5% or 10% carbon dioxide until cells reached the desired density.

Table 1. Media Used in Cell Line Screening.

Cell Line	Serum Growth Media Composition
SiMa and SiMa clones	RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-Glutamine
PC12	RPMI 1640, 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10% equine serum, 2 mM GlutaMAX™, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 1% Penicillin-Streptomycin
N18 ND8/34 NG108-15	90 % DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM Glutamine, 2 mM glucose
SK-N-DZ SK-N-F1 SK-N-SH	90% DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 4 mM Glutamine, 4 mM glucose, 0.1 mM non-essential amino acids, 1.5 g/L $NaHCO_3$
BE(2)-C SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM(11090-081, Gibco), Ham's F12 (11765-054, Gibco), 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM Glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids,
ND3, ND7, ND15	DMEM media with 2 mM Glutamine (Invitrogen, Cat #. 11885), 10 % Fetal Bovine Serum (Invitrogen, Cat #. 16140), and 1x antibiotic / antimycotic
Neuro-2a	EMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM Glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 1.5 g/L $NaHCO_3$, 1 mM Sodium pyruvate

2. Screening of cells expressing target receptor on cell surface.

[0180] The cell lines were screened for the presence of the desired target receptor using flow cytometry and/or ligand binding assays. Although the examples below used reagents to identify opioid or opioid-like receptor in the plasma membrane, the approaches disclosed below can be used to identify the cognate receptor for any of re-targeted endopeptidase.

a. Identification of cell lines using flow cytometry.

[0181] To identify cells comprising established cell lines that express target receptors for a retargeted endopeptidase on the cell surface, flow cytometry analysis was conducted. Cells for each candidate cell line were grown as described in Section 1, trypson-treated, washed in staining buffer comprising 1 x PBS, 0.5% BSA, and centrifuged at 1200 rpm for 3 minutes. Pelleted cells were resuspended in stainning buffer and about 2.0 x 10^6 cells were transferred to new tubes, two for each receptor tested. To screen for the presence of an opioid or opiod-like receptors, about 2.0-5.0 µL of α-ORL-1 RA14133 (Neuromics, Edina, MN), α-DOR rabbit polyclonal antibody RA10101 (Neuromics, Edina, MN), α-KOR rabbit polyclonal antibody RA10103 (Neuromics, Edina, MN), or α-MOR rabbit polyclonal antibody RA10104 (Neuromics, Edina, MN), was added to one tube and the mixture was incubated at 4 °C for 1 hour. The second tube was incubated at 4 °C for 1 hour without any antibodies and served as a negative control. After the antibody incubation, 1.0 mL of staining buffer was added to each tube and centrifuge at 1200 rpm for 3 minutes. The cell pellet was washed once more with 1.0 mL of staining buffer. The cell pellet was resuspend in 200 µL of staining buffer, and 2.0 µL of goat anti-rabbit IgG FITC antibody was added to each tube and incubated at 4 °C for 1 hour in the dark. After incubation with the secondary antibody, 1.0 mL of staining buffer was added to each tube and centrifuge at 1200 rpm for 3 minutes. The cell pellet was washed once more with 1.0 mL of staining buffer and the pellet resuspend in 500 µL of staining buffer. The sample was analyzed using a flow cytometer and the data was displayed as an overlay the anti-receptor antibody staining over the rabbit IgG FITC staining.

[0182] The results indicate that. Of the cell lines tested, ORL-1 was expressed on the cell surface of about 50% of the cells comprising SiMa, SiMa P>33, clone H10, ND7, and SK-N-DZ established cell lines; was expressed on the cell surface of between about 25% to about 50% of the cells comprising SH-SY5Y and ND15 established cell lines; and was expressed on the cell surface of less than about 25% of the cells comprising ND3, ND8, N18, and Neuro-2a established cell lines (Table 2). The results also indicate that KOR was expressed on the cell surface of about 50% of the cells comprising SH-SY5Y and ND7 established cell lines; was expressed on the cell surface of between about 25% to about 50% of the cells comprising SiMa clone H10, SiMa P>33, ND15, and Neuro-2a established cell lines; and was expressed on the cell surface of less than about 25% of the cells comprising ND3, ND8, and N18 established cell lines (Table 2). The results also revelaed that MOR was expressed on the cell surface of about 50% of the cells comprising ND7, ND15, and SiMa P>33 established cell lines; was expressed on the cell surface of between about 25% to about 50% of the cells comprising SH-SY5Y, SiMa clone H10,

ND8, and Neuro-2a established cell lines; and was expressed on the cell surface of less than about 25% of the cells comprising ND3 and N18 established cell lines (Table 2). The α-DOR rabbit polyclonal antibody RA10101 failed to work properly and no useable data was generated.

b. Identification of cell lines using ligand binding.

[0183] To identify cells comprising established cell lines that express target receptors for a retargeted endopeptidase on the cell surface, ligand binding analysis was conducted. Cells from the candidate cell lines to be tested were seeded on a black-clear bottom 96-well plate for about 4 hours to promote attachment. To screen for the presence of an opioid or opiod-like receptors, media was then aspirated from each well and replaced with 50 µL of ligand solution containing either 0 (untreated control), 0.001 nM, 0.01 nM, 0.1 nM, or 1 nM of FAM-nociceptin (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA); or either 0 (untreated control), 0.001 nM, 0.01 nM, 0.1 nM, or 1 nM of FAM-dynorphin A (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA). Cells were incubated with the ligand solution for 1 hour in the 37 °C incubator under 5% carbon dioxide. The cells were washed to remove unbound ligand by washing the cells three times with 100 µL of 1 x PBS. The plate was scanned on the Typhoon (Ex 488 and Em 520 nm), and then read on the M5 Plate Reader (Ex 495 and Em 520 nm) for RFU signals. The results indicate that cells comprising the SiMa clone H10, SH-SY5Y, and SK-N-DZ established cell lines bound nociceptin, whereas cells comprising the SiMa clone H10 also bound Dynorphin (Table 2).

Table 2. Cell lines Expressing Target Receptors on Cell Surface

Target Receptor	Cell Lines Identified				
	Flow Cytometry			Ligand Binding	
	More than 50% Expression	25% to 50% Expression	Less than 50% Expression	Nociceptin	Dynorphin A
ORL-1	AGN P33, SiMa, SiMa clone H10, ND7, SK-N-DZ	SH-SY5Y, ND15	ND3, ND8, N18, Neuro-2a	SiMa clone H10, SH-SY5Y, SK-N-DZ	—
DOR	ND	ND	ND	ND	ND
KOR	SH-SY5Y, ND7	SiMa clone H10, AGN P33, ND15, Neuro-2a	ND3, ND8, N18	—	SiMa clone H10
MOR	ND7, ND15, AGN P33	SH-SY5Y, SiMa clone H10, ND8, Neuro-2a	ND3, N18	ND	ND

[0184] Using a similar approach, cell lines comprising cells having cognate receptors for other re-targeted endopeptidases can be identified by FAM-labilling the targeting domain for these endopeptidases and screening cell lines as described above.

3. Single dose screening of candidate cell lines using re-targeted endopeptidase molecule.

[0185] To determine whether a cell line was able to uptake the appropriate re-targeted endopeptidase molecule, a suitable density of cells from a stock culture of the cell line being tested was plated into the wells of 24-well tissue culture plates containing 1 mL of an appropriate serum growth medium (Table 1). The cells were grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until cells reached the desired density (approximately 18 to 24 hours). To assess the uptake of an opioid re-targeted endopeptidase, the growth media was aspirated from each well and replaced with either 1) fresh growth media containing no opioid re-targeted endopeptidase (untreated cell line) or 2) fresh growth media containing 30 nM for the nociceptin re-targeted endopeptidase (Noc/A) or 100 nM for the dynorphin re-targeted endopeptidase (Dyn/A) (treated cell line). After an overnight incubation, the cells were washed by aspirating the growth media and rinsing each well with 200 µL of 1 x PBS. To harvest the cells, the 1 x PBS was aspirated, the cells were lysed by adding 50 µL of 2 x SDS Loading Buffer, the lysate was transferred to a clean test tube and the sample was heated to 95 °C for 5 minutes.

[0186] To detect for the presence of both uncleaved SNAP-25 substrate and cleaved SNAP-25 products, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot. In this analysis, a 12 µL aliquot of the harvested sample was separated by MOPS polyacrylamide gel electrophoresis using NuPAGE® Novex 12% Bis-Tris precast polyacrylamide gels (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) under denaturing, reducing conditions. Separated peptides were transferred from the gel onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) by Western blotting using a TRANS-BLOT® SD semi-dry electrophoretic transfer cell apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). PVDF membranes were blocked by incubating at room temperature for 2 hours in a solution containing Tris-Buffered Saline (TBS) (25 mM 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol hydrochloric acid (Tris-HCl)(pH 7.4), 137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride), 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate), 2% Bovine Serum Albumin (BSA), 5% nonfat dry milk. Blocked membranes were incubated at 4 °C for overnight in TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate), 2% BSA, and 5% nonfat dry milk containing either 1) a 1:5,000 dilution of an α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody as the primary antibody (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD); or 2) a 1:5,000 dilution of S9684 α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum as the primary antibody (Sigma, St. Louis, MO). Both α-SNAP-25 mouse monoclonal and rabbit polyclonal antibodies can detect both the uncleaved SNAP-25 substrate and the SNAP-25 cleavage product, allowing for the assessment of overall SNAP-25 expression in each cell line and the percent of SNAP-25 cleaved after re-targeted endopeptidase treatment as a parameter to assess the amount of re-targeted endopeptidase uptake. Primary antibody probed blots were washed three times for 15 minutes each time in TBS, TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Washed membranes were incubated at room temperature for 2 hours in TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate), 2% BSA, and 5% nonfat dry milk containing either 1) a 1:10,000 dilution of goat polyclonal anti-mouse immunoglobulin G, heavy and light chains (IgG, H+L) antibody conjugated to horseradish peroxidase (Zymed, South San Francisco, CA) as a secondary antibody; or 2) a 1:10,000 dilution of goat polyclonal anti-rabbit immunoglobulin G, heavy and light chains (IgG, H+L) antibody conjugated to horseradish peroxidase (Zymed, South San Francisco,

87

CA) as a secondary antibody. Secondary antibody-probed blots were washed three times for 15 minutes each time in TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Signal detection of the labeled SNAP-25 products were visualized using the ECL Plus™ Western Blot Detection System (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and the membrane was imaged and the percent of cleaved quantified with a Typhoon 9410 Variable Mode Imager and Imager Analysis software (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The choice of pixel size (100 to 200 pixels) and PMT voltage settings (350 to 600, normally 400) depended on the individual blot.

[0187] Based on the detection of SNAP-25 cleavage product, the following cell lines exhibited uptake of 30 nM Noc/A: BE(2)-C, N18TG2, Neuro-2a, SiMa, SK-N-BE(2)-C, and SK-N-DZ (Table 3); whereas the following cell lines exhibited uptake of 100 nM Dyn/A: N18TG2, Neuro-2a, PC12, and SiMa. Some of these sensitive cell lines were tested with lower doses of compounds and/or with full dose responses.

Table 3. Single-Dose Screening of Candidate Cell Lines Using Retargeted Noc/A and Dyn/A

Cell Line	Description	Source	30 nM Noc/A Uptake	100 nM Dyn/A Uptake
BE(2)-C	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2268	Yes	NT
N18TG2	Mouse neuroblastoma	DSMZ ACC 103	Yes	Yes
ND3	Mouse neuroblastoma/primary neonatal rat DRG hybrid	ECACC 92090901	NDA	NDA
ND7/23	Mouse neuroblastoma/primary rat DRG hybrid	ECACC 92090903	No	No
ND8	Mouse neuroblastoma/primary neonatal rat DRG hybrid	ECACC 92090904	NDA	NDA
ND15	Mouse neuroblastoma/primary neonatal rat DRG hybrid	ECACC 92090907	No	No
Neuro-2a	Mouse neuroblastoma	ATCC CCL-131	Yes	Yes
NG108-15	Mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid	ECACC 88112302	No	NT
PC12	Rat pheochromocytoma	ATCC CRL-1721	NT	Yes
SH-SY5Y	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2266	No	NT
SiMa	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 164	Yes	Yes
SK-N-BE(2)-C	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2271	Yes	NT
SK-N-DZ	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2149	Yes	NT
SK-N-F1	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2142	No	NT
SK-N-SH	Human neuroblastoma	ECACC 86012802	No	NT

NT: Not tested.
NDA: No detectable amount of SNAP-25 was deteced in this cell line.

[0188] Using a similar approach, cell lines comprising cells having cognate receptors for other re-targeted endopeptidases can be assessed for retargeted endopeptidase uptake.

Example II

Screening of Candidate Clonal Cell Lines Endogenous Re-targeted Endopeptidase Receptor Expression

1. Single dose re-targeted endopeptidase screening of candidate clonal cell lines from a parental SiMa cell line.

[0189] Companion patent application Zhu Hong et al., *Cell Lines Useful in Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, U.S. Patent Application Serial No: 61/160,199 discloses clonal cell lines derived from a parental SiMa cell line that were useful in a BoNT/A potency assay, as described in Ester Fernandez-Salas, et al., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, U.S. Patent Application Serial No: 12/403,531, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. To determine whether these clonal cell lines were able to uptake the appropriate re-targeted endopeptidase, each was screened using an ECL sandwich ELISA assay.

[0190] To prepare a lysate trated with a retargerget endopeptidase, a suitable density of cells from a stock culture of the cell line being tested was plated into the wells of 96-well tissue culture plates containing 100 µL of an appropriate serum growth medium (Table 1) overnight. The media from the seeded cells was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 30 nM of a Noc/A retargeted endopeptidase or 60 nM of a Dyn/A retargeted endopeptidase. After a 24 hour incubation, the cells were washed by aspirating the growth media and rinsing each well with 200 µL of 1 x PBS. To harvest the cells, 1 x PBS was aspirated, the cells lysed by adding 30 µL of Lysis Buffer comprising 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100 to each well, and the plate incubated on a shaker rotating at 500 rpm for 30 minutes at 4 °C. The plate was centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes at 4 °C to pellet cellular debris and the supernatant was transferred to a capture antibody coated 96-well plate to perform the detection step.

[0191] To prepare an α-SNAP-25_{197} capture antibody solution, the α-SNAP-25_{197} mouse monoclonal antibody contained in the ascites from hybridoma cell line 2E2A6 (Example XI) was purified using a standard Protein A purification protocol.

[0192] To prepare an α-SNAP-25 detection antibody solution, α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibody S9684 (Sigma, St. Louis, MO) was conjugated to Ruthenium(II)-tris-bipyridine-(4-methysulfonate) NHS ester labeling reagent (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). The conjugation reaction was performed by adding to 30 µL of distilled water reconstituted MSD SULFO-TAG™ stock solution to 200 µL of 2 mg/mL α-SNAP-25 polyclonal antibodies and incubating the reaction at room temperature for 2 hours in the dark. The labeled antibodies were purified using a standard spin column protocol and the protein concentration determined using a standard colorimetric protein assay. The absorbance of the α-SNAP-25 antibody/MSD SULFO-TAG™ conjugate was measured at 455 nm using a spectrophotometer to

determine the concentration in moles per liter. The detection antibody solution was stored at 4 °C until needed. Long term storage of unused aliquots was at -20 °C.

[0193] To prepare an α-SNAP-25 solid phase support comprising an α-SNAP-25_{197} capture antibody, approximately 5 µL of the appropriate α-SNAP-25_{197} monoclonal antibody solution (20 µg/mL in 1 x PBS) is added to each well of a 96-well MSD High Bind plate and the solution is allowed to air dry in a biological safety cabinet for 2-3 hours in order to liquid evaporate the solution. Blocked plates were sealed and stored at 4 °C until needed.

[0194] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by ECL sandwich ELISA, the capture antibody-bound wells were then blocked by adding 150 µL of Blocking Buffer comprising 2% Amersham Blocking Reagent (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) and 10% goat serum (VWR, West Chester, PA) at room temperature for 2 hours. The Blocking Buffer was aspirated, 25 µL of a lysate from cells treated with re-targeted endopeptidase was added to each well and the plates were incubated at 4 °C for overnight. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 µL of 5 µg/mL α-SNAP-25 detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate) was added to each well, sealed, and incubated at room temperature for 1 hour with shaking. After α-SNAP-25 detection antibody incubation, the wells were washed three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 150 µL of 1 x Read Buffer (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) was added to each well and the plates were read using a SECTOR™ Imager 6000 Image Reader (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). The raw data was collected using the ECL imager.

[0195] The results indicate that the parental SiMa cell line as well as clonal cell line H10 showed good uptake of the Noc/A retargeted endopeptidase (Table 4). In adition, these results reveal that many cell lines exhibited uptake of the Dyn/A retargeted endopeptidase (Table 4). Three clonal cell lines (1E11, AF4, and DC4) showed good uptake of the Dyn/A retargeted endopeptidase; eleven clonal cell lines (1E3, 2D2, 2D6, 3D8, 5C10, 5F3, BB10, BF8, CG8, CG10, and DE7) exhibited moderate uptake of the Dyn/A retargeted endopeptidase; and (3B8, 2B9, CE6, YB8, 4C8, 2F5, AC9, CD6, DD10, YF5) showed minimal uptake of the Dyn/A retargeted endopeptidase. Some of these candidate cell lines were tested in a full dose-response assay with the corresponding retargeted endopeptidase.

Table 4. Single-Dose Screening of Candidate Clonal Cell Lines Using Re-targeted Noc/A and Dyn/A

Cell Line	30 nM Noc/A Uptake	80 nM Dyn/A Uptake
AGN P33	+++	NT
A10	–	NT
D11	–	NT

Table 4. Single-Dose Screening of Candidate Clonal Cell Lines Using Re-targeted Noc/A and Dyn/A		
Cell Line	30 nM Noc/A Uptake	80 nM Dyn/A Uptake
H1	–	–
H10	+++	–
1D4	NT	–
2E4	NT	–
3D5	NT	–
3G10	NT	–
4D3	NT	–
BB3	NT	–
CC11	NT	–
DF5	NT	–
YB7	NT	–
BE3	NT	–
4B5	NT	–
2B9	NT	+
2F5	NT	+
3B8	NT	+
4C8	NT	+
AC9	NT	+
CD6	NT	+
CE6	NT	+
DD10	NT	+
YB8	NT	+
YF5	NT	+
1E3	NT	++
2D2	NT	++
2D6	NT	++
3D8	NT	++
5C10	NT	++
5F3	NT	++
BF8	NT	++
BB10	NT	++
CG8	NT	++
CG10	NT	++
DE7	NT	++
1E11	NT	+++
AF4	NT	+++
DC4	NT	+++

Table 4. Single-Dose Screening of Candidate Clonal Cell Lines Using Re-targeted Noc/A and Dyn/A		
Cell Line	**30 nM Noc/A Uptake**	**80 nM Dyn/A Uptake**
NT: Not Tested –: no uptake; +: minimal uptake; ++: moderate uptake; +++: good uptake		

2. Full dose response screening of candidate cell lines.

[0196] Established cell lines identified above, were subsequently evaluated using a full dose response of the appropriate re-targeted endopeptidase. Cells from the different cell lines were plated in 96-well plates and exposed to various concentrations of Noc/A (0, 0.14 nM, 0.4 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM, and 100 nM) or of Dyn/A (0.017 nM, 0.05 nM, 0.15 nM, 0.45 nM, 1.4 nM, 4.1 nM, 12 nM, 37 nM, 111 nM, 333 nM, and 1000 nM) for 24 hours. Retargeted endopeptidase-containing medium was then removed and replaced with fresh complete medium. Plates were incubated another 24 hours under 5% CO_2 at 37 °C to allow for the cleavage of SNAP-25. Cells were lysed in the lysis buffer (Table 5) and plates centrifuged to eliminate debris. The lysates were used either in a Western blot assay or in a sandwich ELISA.

[0197] For the Western blot analysis, samples were assayed for the presence of both the intact SNAP-25 and the SNAP-25 cleavage product as described in Example I.

[0198] For the sandwich ELISA, ELISA plates coated with 2E2A6 monoclonal antibody were blocked with 150 µL Blocking Buffer at room temperature for 2 hours. After blocking buffer was removed, 25 µL of cell lysate was added to each well and the plates were incubated at 4 °C for 2 hours. Plates were washed three times with PBS-T and 25 µL of SULFO-TAG NHS-Ester labeled detection anti-SNAP25 pAb antibody at 5 µg/mL in 2% blocking reagent in PBS-T was added to the bottom corner of wells. The plates were sealed and shaken at room temperature for 1 hour, followed by three washes with PBS-T. After washes were completed, 150 µL of 1x Read Buffer per well was added and the plate was read in the SI6000 Image reader. To determine the sensitivity of each one of the cell lines tested, and EC_{50} value was calculated for each cell line. The values for the Noc/A retargeted endopeptidase are summarized in Table 5. Full dose response of retargeted endopeptidase Dyn/A were only performed in PC12 and clone AF4. In both cases the assay did not reach an upper asymptote and an EC_{50} could not be calculated. The lower dose that produced a signal for the AF4 clone was 12 nM for both cell lines.

Table 5. Full-Dose Screening of Candidate Cell Lines Using Retargeted Noc/A and Dyn/A				
Cell Line	**Description**	**Source**	**EC_{50} Noc/A Uptake**	**EC_{50} Dyn/A Uptake**
AGN P33	Human neuroblastoma	—	5-10 nM	NT
BE(2)-C	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2268	NT	NT
N18TG2	Mouse neuroblastoma	DSMZ ACC 103	NT	NT

N18	Mouse Neuroblastoma	ECACC 88112301	>100 nM	NT
ND3	Mouse neuroblastoma/primary neonatal rat DRG hybrid	ECACC 92090901	NDA	NT
ND7/23	Mouse neuroblastoma/primary rat DRG hybrid	ECACC 92090903	>100 nM	NT
ND8	Mouse neuroblastoma/primary neonatal rat DRG hybrid	ECACC 92090904	NDA	NT
ND15	Mouse neuroblastoma/primary neonatal rat DRG hybrid	ECACC 92090907	>100 nM	NT
Neuro-2a	Mouse neuroblastoma	ATCC CCL-131	30 nM	NT
NG108-15	Mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid	ECACC 88112302	NT	NT
PC12	Rat pheochromocytoma	ATCC CRL-1721	NT	>1000 nM
SH-SY5Y	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2266	NT	NT
SiMa	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 164	30 nM	NT
SiMa clone AF4	Human neuroblastoma	—	NT	>300 nM
SiMa clone H1	Human neuroblastoma	—	>100 nM	NT
SiMa clone H10	Human neuroblastoma	—	20 nM	NT
SK-N-BE(2)-C	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2271	NT	NT
SK-N-DZ	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2149	0.5-2 nM	NT
SK-N-F1	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2142	>100 nM	NT
SK-N-SH	Human neuroblastoma	ECACC 86012802	>100 nM	NT
NT: Not tested. NDA: No detectable amount of SNAP-25 was deteced in this cell line.				

[0199] Using a similar approach, clonal cell lines comprising cells having cognate receptors for other re-targeted endopeptidases can be screened and assessed for retargeted endopeptidase uptake.

Example III

Evaluation of Growth Conditions on Retargeted Endopeptidase Uptake in Candidate Cell Lines

[0200] The following example illustrates how to determine culture conditions, growth and differentiation, for established cell lines that maximize re-targeted endopeptidase uptake.

1. Effects of cell differentiation and trophic factors on re-targeted endopeptidase uptake of candidate cell lines.

[0201] To determine whether cell differentiation or the present of trophic factors in the growth media improved re-targeted endopeptidase uptake, cell lines exhibiting good uptake of Noc/A were tested with different media compositions. A suitable density of cells from a stock culture of the SiMa P>30 cell line being tested was plated into the wells of 96-well tissue culture plates containing 100 µL of a serum-free medium containing RPMI1640, 1% Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-Glutamine, supplemented with B27, and N2, or 100 µL of a serum-free medium containing RPMI1640, 1% Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-

Glutamine ,supplemented with B27, N2, and NGF (Nerve Growth Factor, 100 ng/mL). These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 1 to 2 days). As a control, a suitable density of cells from a stock culture of the cell line being tested was plated into the wells of 96-well tissue culture plates containing 100 µL of an appropriate growth medium (Table 1) without or with NGF (100 ng/mL). These undifferentiated control cells were grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until cells reach the desired density (approximately 18 to 24 hours). The media from both differentiated and undifferentiated control cultures was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample) or to various concentrations of Noc/A (0.14, 0.4, 1.23, 3.7, 11.1, 33.3, and 100 nM). After a 24 hours treatment, the cells were washed and incubated for 24 hours in retargeted endopeptidase-free media in order to increase the amount of $SNAP25_{197}$ produced. Cells were then washed and harvested for the ECL sandwich ELISA assay as described in Example II.

[0202] Effects of trophic factors were also tested on the SK-N-DZ cell line. SK-N-DZ cells were plated on a poly-D-lysine coated 96-well plate at 25,000 cells per well in eight different SM media (Table 6) for 72 hours. Cells were treated in the same eight media with Noc/A at doses of 0, 0.3 nM, 3 nM, and 30 nM. After a 24 hour treatment, the cells were washed and incubated for 24 hours n retargeted endopeptidase-free media in order to increase the amount of $SNAP\text{-}25_{197}$ cleavage product produced. Cells were then washed and harvested for the Western blot assay as described in Example I.

[0203] Differentaition did not have an effect on Noc/A uptake in the SiMa >P30 cell line while it seemed to improve uptake in the SK-N-DZ cell line. The basal media had a significant effect on Noc/A uptake in the SK-N-DZ cell line with RPMI1640 comprising trophic factors N2 and B27 being the best combination. The presence of NGF in the media did not seem to improve uptake in the two cell lines tested.

Table 6. Effects of Trophic Factors and Cell Differentiation on Noc/A Uptake of Candidate Cell Lines.

Undifferentiated	Differentiated	EC_{50} Noc/A Uptake	
		AGN P33	SK-N-DZ
DMEM, 10% FBS	—	NT	> 30 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27	—	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, NGF	—	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, RA	—	NT	>30 nM
RPMI1640, 10% FBS	—	NT	10 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27	—	7.2 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, NGF	—	9.1 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, RA	—	NT	10 nM
—	RPMI1640, N2, B27	10.2 nM	1 nM
—	RPMI1640, N2, B27, NGF	9.8 nM	0.6 nM

Table 6. Effects of Trophic Factors and Cell Differentiation on Noc/A Uptake of Candidate Cell Lines.			
Undifferentiated	Differentiated	EC_{50} Noc/A Uptake	
		AGN P33	SK-N-DZ
NGF: Nerve Growth Factor; RA: Retinoic Acid NT: Not tested			

[0204] Using a similar approach, the growth and differentiation conditions for clonal cell lines comprising cells having cognate receptors for other re-targeted endopeptidases can be assessed.

Example IV

Development of Established Cell Lines Expressing Exogenous Re-Targeted Endopeptidase Receptors

[0205] The following example illustrates how to make an established cell line expressing an exogenous receptor for a re-targeted endopeptidase.

1. Transfection of target receptor into cells comprising a candidate cell line.

[0206] The re-targeted endopeptidase Noc/A comprises the nociceptin targeting domain which is the natural ligand of Opioid Receptor Like-1 (ORL-1). To obtain an expression construst comprising an open reading frame for an ORL-1, the expression contruct pReceiver-M02/ORL-1 was obtained from GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD).

[0207] Alternatively, a polynucleotide molecule based on an ORL-1 amino acid sequence (*e.g.*, the amino acid sequences SEQ ID NO: 25 or SEQ ID NO: 26) can be synthesized using standard procedures (BlueHeron® Biotechnology, Bothell, WA). Oligonucleotides of 20 to 50 bases in length are synthesized using standard phosphoramidite synthesis. These oligonucleotides will be hybridized into double stranded duplexes that are ligated together to assemble the full-length polynucleotide molecule. This polynucleotide molecule will be cloned using standard molecular biology methods into a pUCBHB1 vector at the *Sma*I site to generate pUCBHB1/ORL-1. The synthesized polynucleotide molecule is verified by sequencing using Big Dye Terminator™ Chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and an ABI 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). If desired, an expression optimized polynucleotide molecule based on an ORL-1 amino acid sequence (*e.g.*, the amino acid sequences SEQ ID NO: 25 or SEQ ID NO: 26) can be synthesized in order to improve expression in an *Escherichia coli* strain. The polynucleotide molecule encoding the ORL-1 can be modified to 1) contain synonymous codons typically present in native polynucleotide molecules of an *Escherichia coli* strain; 2) contain a G+C content that more closely matches the average G+C content of native polynucleotide molecules found in an *Escherichia coli* strain; 3) reduce polymononucleotide regions found within the polynucleotide molecule; and/or 4) eliminate internal regulatory or structural sites found within the polynucleotide

molecule, see, *e.g.*, Lance E. Steward *et al.*, *Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type A*, U.S. Patent Publication 2008/0057575 (Mar. 6, 2008); and Lance E. Steward *et al.*, *Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type E*, U.S. Patent Publication 2008/0138893 (Jun. 12, 2008). Once sequence optimization is complete, oligonucleotides of 20 to 50 bases in length are synthesized using standard phosphoramidite synthesis. These oligonucleotides are hybridized into double stranded duplexes that are ligated together to assemble the full-length polynucleotide molecule. This polynucleotide molecule is cloned using standard molecular biology methods into a pUCBHB1 vector at the *Sma*I site to generate pUCBHB1/ORL-1. The synthesized polynucleotide molecule is verified by DNA sequencing. If so desired, expression optimization to a different organism, such as, *e.g.*, a yeast strain, an insect cell-line or a mammalian cell line, can be done, see, *e.g.*, Steward, U.S. Patent Publication 2008/0057575, *supra*, (2008); and Steward, U.S. Patent Publication 2008/0138893, *supra*, (2008). Exemplary polynucleotide molecules encoding an ORL-1 include SEQ ID NO: 61 and SEQ ID NO: 62.

[01]To construct an expression contruct encoding an ORL-1, a pUCBHB1/ORL-1 construct will be digested with restriction endonucleases that 1) excised the polynucleotide molecule encoding the open reading frame of ORL-1; and 2) enabled this polynucleotide molecule to be operably-linked to a pcDNA3 vector (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). This insert will be subcloned using a T4 DNA ligase procedure into a pcDNA3 vector that will be digested with appropriate restriction endonucleases to yield pcDNA3/ORL-1. The ligation mixture will be transformed into electro-competent *E. coli* BL21(DE3) cells (Edge Biosystems, Gaitherburg, MD) using an electroporation method, and the cells will be plated on 1.5% Luria-Bertani agar plates (pH 7.0) containing 50 µg/mL of ampicillin, and will be placed in a 37 °C incubator for overnight growth. Bacteria containing expression constructs will be identified as ampicillin resistant colonies. Candidate constructs will be isolated using an alkaline lysis plasmid mini-preparation procedure and will be analyzed by restriction endonuclease digest mapping to determine the presence and orientation of the insert. This cloning strategy will yielded a pcDNA3 expression construct comprising the polynucleotide molecule encoding an ORL-1.

[0208] The re-targeted endopeptidase Dyn/A comprises the dynorphin targeting domain which is the natural ligand of κ-opioid receptor (KOR). To obtain an expression construst comprising an open reading frame for an ORL-1, the expression contruct pReceiver-M02/KOR-1 was obtained from GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD). Alternatively, expression contructs encoding the KOR can be synthesized and subcloned using an approach similar to the one described above to produce the expression contruct pcDNA3.1/KOR. Exemplary KOR amino acid sequenes include SEQ ID NO: 29 and SEQ ID NO: 30; exemplary polynucleotide molecules encoding a KOR include SEQ ID NO: 65 and SEQ ID NO: 66.

[0209] Similar cloning strategies can be used to make expression constructs emcoding other re-target endopeptidase receptors, such as, *e.g.*, pcDNA3.1/DOR or pcDNA3.1/MOR, pcDNA3.1/Galanin receptor 1, pcDNA3.1/Galanin receptor 2, or pcDNA3.1/Galanin receptor 3. Exemplary DOR amino acid sequenes

include SEQ ID NO: 27 and SEQ ID NO: 28; exemplary MOR amino acid sequenes include SEQ ID NO: 31 exemplary Galanin receptor 1 amino acid sequenes include SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, and SEQ ID NO: 138; exemplary Galanin receptor 2 amino acid sequenes include SEQ ID NO: 139; and exemplary Galanin receptor 3 amino acid sequenes include SEQ ID NO: 140. Exemplary polynucleotide molecules encoding a DOR include SEQ ID NO: 63 and SEQ ID NO: 64; exemplary polynucleotide molecules encoding a MOR include SEQ ID NO: 67; exemplary polynucleotide molecules encoding a Galanin receptor 1 include SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, and SEQ ID NO: 143; exemplary polynucleotide molecules encoding a Galanin receptor 2 include SEQ ID NO: 144; and exemplary polynucleotide molecules encoding a Galanin receptor 3 include SEQ ID NO: 145.

[0210] To introduce an expression construct encoding a re-targeted endopeptidase receptor, cell lines were transfected with an expression construct encoding a re-targeted endopeptidase receptor. To transfect a cell line with an opioid or opiod-like receptor, cells from a candidate cell line were seeded at a density of 1 x 10^7 cells in a T_{175} Collagen IV coated flask and grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until cells reach the desired density. A 4.2 mL transfection solution is prepared by adding 4 mL of OPTI-MEM Reduced Serum Medium containing 200 µL of LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) incubated at room temperature for 5 minutes to 4 mL of OPTI-MEM Reduced Serum Medium containing 20 µg of a pReceiver-M02/ORL-1 or 20 µg of pReceiver-M02/KOR-1. This transfection was incubated at room temperature for approximately 20 minutes. The media was replaced with 8 mL of fresh serum-free and antibiotic-free media and the transfection solution was added to the cells. The cells were then incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for approximately 16-18 hours. Transfection media was replaced with fresh growth media and incubate cells in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide. After 24 hours, the growth media were replaced with fresh growth media containing the antibiotic G418 at 1 mg/mL in the culture medium (selection medium) and cells were incubated for 7 days. The selection medium was changed every week for a total of 4 weeks (about 90% cells died and were removed during the weekly media changes).

[0211] Candidate cell lines transfected with the ORL-1 receptor included SiMa >P30, ND15, ND7, NG108-T15 and SK-N-DZ cell lines. Candidate cell lines transfected with the KOR-1 receptor included SiMa, SiMa >P30, ND15, ND7, NG108-T15 and SK-N-DZ cell lines. Transfected NG108-T15 cells did not survive selection in G418.

2. Single dose and dose response screening of stable transfected cell lines using re-targeted endopeptidase molecules.

[0212] Cells from the transfected and selected candidate cell lines from the previous section were plated on 96-well poly-D-lysine or Collagen IV coated plates at 1x10^5 cells/well in medium RPMI1640 containing N2 and B27 supplements, and NGF (50-100 ng/ml) for 20 ±4 hours before compound treatment. Then the cells stably transfected with the ORL-1 receptor were treated with re-targeted endopeptidase Noc/A at

30 nM in the same medium for 24 ±2 hours, except for the SK-N-DZ cell line that was treated at 10 nM. Cells were lysed in 120 µL lysis buffer, and 20 µL of the lysate was mixed with the 2x SDS buffer for the Western Blot assay that was performed as detailed in Example I. All of the cells lines displayed increase uptake of the re-targeted Noc/A compound when transfected with the ORL-1 receptor (Table 7).

Table 7. Cell lines stably transfected with ORL-1 tested with re-targeted endopeptidase Noc/A

Cell line	Description	%Cleaved SNAP25 at 30 nM	
		Non-transfected	Transfected
AGN P33	Human Neuroblastoma	20%	40%
SK-N-DZ	Human Neuroblastoma	25% @ 10 nM	40% @ 10 nM
ND7	Mouse Neuroblastoma and rat DRG cells hybrid	10%	42%
ND15	Mouse Neuroblastoma and rat DRG cells hybrid	8%	20%
NG108-T15	Mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid	No cells survive	No cells survive

[0213] Cells from the transfected and selected candidate cell lines from the previous section were plated on 96-well poly-D-lysine or Collagen IV coated plates at $1x10^5$ cells/well in medium RPMI1640 containing 10% FBS and N2 and B27 supplements for 20 ±4 hours before compound treatment. The cells stably transfected with the KOR-1 receptor were treated with re-targeted endopeptidase Dyn/A at 100 nM in the same medium for 24±2 hours. Cells were lysed in 120 µL lysis buffer, and 20 µL of the lysate was mixed with the 2x SDS buffer for the Western Blot assay that was performed as detailed in Example I. All of the cells lines displayed increase uptake of the re-targeted Dyn/A compound when transfected with the human KOR-1 receptor.

3. *Selection of stably transfected clonal cell lines exhibiting high sensitiveity by serial dilution*

[0214] The following example illustrates how to identify clonal cells from a stably transfected established cell line that are susceptible to re-targeted endopeptidase action or have re-targeted endopeptidase uptake capacity.

[0215] For single cell cloning of the selected cells described above, the limited-dilution cell line cloning method was employed. Cells were trypsinized, counted, diluted to achieve 0.5-1 cell per 100 µL, and plated on selection media in five poly-D-lysine coated 96-well plates at 100 µL per well. Cells were incubated for more than 2 weeks until colonies formed on the bottom of the well. The positive colonies originating from single cells were marked. Pictures of single-cell derived clones were taken using a microscope camera. Cells from wells with single clones were grown for an additional week and transferred into 24 well plates about 4 weeks after cloning started.

[0216] For clone selection, the main parameter used to screen for positive clones was the highest amount of SNAP-25 cleavage obtained after Noc/A or Dyn/A treatment measured using the Western Blot analysis with the antibody that recognizes both intact and cleaved SNAP-25. Clones overexpressing ORL-1 were tested with 10 nM and 30 nM re-targeted endopeptidase Noc/A overnight as soon as enough cells became available (Table 8). Clones overexpressing KOR-1 were tested with 100 nM re-targeted endopeptidase Dyn/A overnight (Table 9). In addition, clones overexpressing KOR-1 were tested on the Dynorphin binding assay as described in Example I.

Table 8. Single-Dose Screening of Candidate Clonal Cell Lines Stably transfected with ORL-1 Using re-targeted endopeptidase Noc/A

Cell Line	Clone number	10 nM Noc/A Uptake	30 nM Noc/A Uptake	Second screening @ 1 nM (%cleaved)
AGN P33	1	+	+	28%
AGN P33	2	++	+++	50%
AGN P33	3	–	+	NT
AGN P33	4	ND	ND	NT
AGN P33	5	-	+	31%
AGN P33	6	++	+++	60%
AGN P33	7	+	+	14%
AGN P33	8	+	+	NT
AGN P33	9	+	+	38%
AGN P33	10	+	++	29%
AGN P33	11	+	+	NT
AGN P33	12	+	+	27%
ND7	1C11	NT	++	NT
ND7	2F3	NT	–	NT
ND7	1D10	NT	–	NT
ND7	1F9	NT	–	NT
ND7	1G10	NT	–	NT
ND7	2D8	NT	–	NT
ND7	2E2	NT	–	NT
ND7	4B7	NT	+++	NT
ND7	3C11	NT	–	NT
ND7	3C3	NT	+	NT
ND7	3E8	NT	–	NT
ND7	3E11	NT	–	NT
ND7	2G3	NT	–	NT
ND7	4D5	NT	+	NT
ND7	4D8	NT	+	NT
ND7	4C8	NT	–	NT
ND7	4C9	NT	+++	NT

Table 8. Single-Dose Screening of Candidate Clonal Cell Lines Stably transfected with ORL-1 Using re-targeted endopeptidase Noc/A

Cell Line	Clone number	10 nM Noc/A Uptake	30 nM Noc/A Uptake	Second screening @ 1 nM (%cleaved)
ND7	4E8	NT	+	NT
ND7	2E6	NT	++	NT
ND7	4F4	NT	+++	NT
ND7	5D6	NT	–	NT
ND7	5G3	NT	–	NT
ND7	4D5	NT	++	NT
ND15	1C10	NT	+	NT
ND15	1F10	NT	++	NT
ND15	2D8	NT	++	NT
ND15	2E11	NT	–	NT
ND15	2F4	NT	++	NT
ND15	2F10	NT	++	NT
ND15	2F11	NT	–	NT
ND15	3C4	NT	+	NT
ND15	3C7	NT	++	NT
ND15	3E8	NT	+++	NT
ND15	4C8	NT	+	NT
ND15	4D8	NT	+	NT
SK-N-DZ	#2	–	–	NT
SK-N-DZ	#4	–	–	NT
SK-N-DZ	#5	+++	++	NT
SK-N-DZ	#6	NT	++	NT
SK-N-DZ	#7	+	NT	NT
SK-N-DZ	#8	–	NT	NT
SK-N-DZ	#9	+	NT	NT
SK-N-DZ	#10	–	NT	NT
SK-N-DZ	#11	+	+++	NT
SK-N-DZ	#12	–	NT	NT
SK-N-DZ	#14	++	NT	NT
SK-N-DZ	#16	–	NT	NT
SK-N-DZ	#17	+	+++	NT
SK-N-DZ	#19	+	+++	NT
SK-N-DZ	#20	–	NT	NT
SK-N-DZ	#23	NT	++	NT

Table 8. Single-Dose Screening of Candidate Clonal Cell Lines Stably transfected with ORL-1 Using re-targeted endopeptidase Noc/A

Cell Line	Clone number	10 nM Noc/A Uptake	30 nM Noc/A Uptake	Second screening @ 1 nM (%cleaved)
SK-N-DZ	#25	–	NT	NT
SK-N-DZ	#26	–	++	NT
SK-N-DZ	#27	+	NT	NT
SK-N-DZ	#28	++	+	NT
SK-N-DZ	#30	++	NT	NT
SK-N-DZ	#31	–	NT	NT
SK-N-DZ	#32	++	++	NT
SK-N-DZ	#33	+	NT	NT
SK-N-DZ	#34	+++	ND	NT
SK-N-DZ	#35	+	++	NT
SK-N-DZ	#36	–	NT	NT
SK-N-DZ	#37	+++	++	NT
SK-N-DZ	#42	–	NT	NT
SK-N-DZ	#43	+	++	NT

ND: Not Determined; NT: Not Tested.
–: no uptake; +: minimal uptake; ++: moderate uptake; +++: good uptake

Table 9. Single-Dose Screening of Candidate Clonal Cell Lines Stably transfected with KOR-1 Using re-targeted endopeptidase Dyn/A

Cell Line	Clone number	100 nM Dyn/A Uptake	100 nM Dyn binding	Selected future testing
SiMa	2	–	–	No
SiMa	6	+	+	No
SiMa	8	+	+	No
SiMa	12	+++	++	Yes
SiMa	14	++	++	No
SiMa	20	+	++	No
SiMa	25	++	++	No
AGN P33	1	+++	+	Yes
AGN P33	3	++	+	No
AGN P33	5	++	+	Yes
AGN P33	6	++	+	No
AGN P33	7	+++	+	Yes
AGN P33	8	++	+	Yes
AGN P33	9	+++	+	Yes
AGN P33	10	+++	+	Yes

101

Table 9. Single-Dose Screening of Candidate Clonal Cell Lines Stably transfected with KOR-1 Using re-targeted endopeptidase Dyn/A

Cell Line	Clone number	100 nM Dyn/A Uptake	100 nM Dyn binding	Selected future testing
AGN P33	11	++	+	No
AGN P33	12	+++	+	Yes
AGN P33	14	+	+	No
AGN P33	16	++	+	No
AGN P33	17	+++	+	Yes
AGN P33	21	+	++	No
ND7	A1	+	+	No
ND7	A2	–	–	No
ND7	A3	–	–	No
ND7	A4	–	–	No
ND7	A5	–	–	No
ND7	A6	–	–	No
ND7	A7	–	–	No
ND7	A8	–	–	No
ND7	A9	–	–	No
ND7	A10	–	–	No
ND7	A11	–	–	No
ND7	A12	+++	+++	Yes
ND7	B1	–	–	No
ND7	B2	–	–	No
ND7	B3	–	–	No
ND7	B4	–	–	No
ND7	B5	+	+	Yes
ND7	B6	–	–	No
ND7	B7	–	–	No
ND7	B8	–	–	No
ND7	B9	–	–	No
ND7	B10	–	–	No
ND7	B11	–	–	No
ND7	B12	–	–	No
ND7	C1	–	–	No
ND7	C2	–	–	No
ND7	C3	–	–	No
ND7	C4	–	–	No
ND7	C5	–	–	No
ND7	C6	+	+	No

Table 9. Single-Dose Screening of Candidate Clonal Cell Lines Stably transfected with KOR-1 Using re-targeted endopeptidase Dyn/A

Cell Line	Clone number	100 nM Dyn/A Uptake	100 nM Dyn binding	Selected future testing
ND7	C7	–	–	No
ND7	C8	–	–	No
ND7	C9	–	–	No
ND7	C10	–	–	No
ND7	C11	–	–	No
ND7	C12	–	–	No
ND7	D1	–	–	No
ND7	D2	–	–	No
ND7	D3	–	–	No
ND7	D4	–	–	No
ND7	D5	–	–	No
ND7	D6	++	++	Yes
ND7	D7	++	++	Yes
ND7	D8	–	–	No
ND7	D9	–	–	No
ND7	D10	–	–	No
ND7	D11	–	–	No
ND7	D12	–	–	No
ND7	E1	–	–	No
ND7	E2	–	–	No
ND7	E3	–	–	No
ND7	E4	–	–	No
ND7	E5	–	–	No
ND7	E6	–	–	No
ND7	E7	–	–	No
ND7	E8	–	–	No
ND7	E9	–	–	No
ND7	E10	–	–	No
ND7	E11	–	–	No
ND7	E12	++	++	Yes
ND7	F1	–	–	No
ND7	F2	–	–	No

Table 9. Single-Dose Screening of Candidate Clonal Cell Lines Stably transfected with KOR-1 Using re-targeted endopeptidase Dyn/A

Cell Line	Clone number	100 nM Dyn/A Uptake	100 nM Dyn binding	Selected future testing
ND7	F3	–	–	No
ND7	F4	–	–	No
ND15	A1	–	–	No
ND15	A2	–	–	No
ND15	A3	+	–	No
ND15	A4	+	–	No
ND15	A5	–	–	No
ND15	A6	++	–	No
ND15	A7	++	–	No
ND15	A8	++	–	No
ND15	A9	+	–	No
ND15	A10	+	–	No
ND15	A11	–	–	No
ND15	A12	–	–	No
ND15	B1	–	–	No
ND15	B2	++	–	No
ND15	B3	–	–	No
ND15	B4	–	–	No
ND15	B5	+++	–	Yes
ND15	B6	+	–	No
ND15	B7	–	–	No
ND15	B8	–	–	No
ND15	B9	–	–	No
ND15	B10	–	–	No
ND15	B11	–	–	No
ND15	B12	–	–	No
ND15	C1	–	–	No
ND15	C2	+++	+	Yes
ND15	C3	–	–	No
ND15	C4	–	–	No
ND15	C5	+	NT	No
ND15	C6	+++	NT	Yes
SK-N-DZ	#11	NT	NT	ND

ND: Not Determined; NT: Not Tested.
–: no uptake; +: minimal uptake; ++: moderate uptake; +++: good uptake

4. Dose response screening of stably transfected clonal cell lines using re-targeted endopeptidase.

[0217] Candidate stably transfected clonal cell lines from section 3 showing good uptake of the re-targeted endopeptidase Noc/A were tested in full dose response experiments to determine sensitivity and efficacy towards the re-targeted endopeptidase Noc/A. Cells were plated on 96-well poly-D-lysine or Collagen IV coated plates at $1x10^5$ cells/well in medium RPMI1640 containing N2 and B27 supplements, and NGF (50-100 ng/mL) for 20 ±4 hours before compound treatment. Cells from the parental AGN P33 cell line and the ND7 clonal cell lines were treated with 0, 0.14 nM, 0.4 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM, and 100 nM of Noc/A in the same medium for 24 hours plus 24 hours incubation in re-targeted endopeptidase free media to allow for cleavage of SNAP-25. Cells from the parental AGN P33 cell line were also treated with 0, 0.03 nM, 0.08 nM, 0.24 nM, 0.74 nM, 2.22 nM, 6.67 nM, and 20 nM of Noc/A in the same medium for 24 hours plus 24 hours incubation in re-targeted endopeptidase free media to allow for cleavage of SNAP-25. Media was removed and cells washed and lysed for the ECL sandwich ELISA assay as detailed in Example II. The data from the AGN P33 parental and the clonal cell lines stably transfected with the ORL-1 receptor is summarized in Table 10. Clones #2 and #6 demonstrated better sensitivity and efficacy towards the re-targeted endopeptidase Noc/A than the parental cell line. Moreover, the increased sensitivity of the new clonal cell lines allowed the use of lower concentrations for the dose-response confirming the new clonal cell lines are more sensitive.

Table 10. Summary table of signal-to-noise ratios (S/N) and EC_{50} values of the three most sensitive clones overexpressing ORL-1 in the AGN P33 background cell line.

	Parental	Clone 2	Clone 6	Clone 8
S/N Ratio 0.03 nM/BK		41	26	1.8
S/N Ratio 20 nM/BK		259	522	33.1
S/N Ratio 0.14 nM/BK				
S/N Ratio 100 nM/BK				
EC_{50} (nM)	6.8 ± 1.1	0.6 ± 0.1	0.7± 0.07	0.3 ± 0.2

[0218] The data from the ND7 parental and the clonal cell lines stably transfected with the ORL-1 receptor is summarized in Table 11. All the clones tested demonstrated improved sensitivity and efficacy towards the re-targeted endopeptidase Noc/A than the parental cell line ND7. Clones 4B7, 1E6, and 1C11 were the most sensitive with EC_{50} values lower than 10 pM.

Table 11. Summary table of signal-to-noise ratios (S/N) and EC_{50} values of the six most sensitive clones overexpressing ORL-1 in the ND7 background cell line.

	Parental	1C11	4B7	4C9	4F4	1E6	3E9
S/N Ratio 0.14 nM/BK	1.7	9.3	11.1	5.3	3.6	5.8	5.1
S/N Ratio 100 nM/BK	53	217	243	126	169	123	121
EC_{50} (nM)	>50	8.6 ± 2	5.7 ± 0.5	33 ± 11	24 ± 5	6.7 ± 1	>30 nM

[0219] Table 12 summarizes the results obtained with the generation and testing of clonal cell lines overexpressing the ORL-1 receptor in different cell backgrounds.

Table 12 : Summary of clonal cell lines overexpressing the Human ORL-1 receptor tested with Noc/A

Background Cell Line	Species	Stable cell lines tested with full dose of Noc/A	EC_{50} (nM)
AGN P33	Human neuroblastoma	Three	0.6-2.5
ND7	Rat neuroblastoma and DRG hybrid	Six	3.7-8
SK-N-DZ	Human neuroblastoma	None (seven stable clones selected for further studies)	N/A

Example V

Development of Clonal Cell Lines from a Parental SK-N-DZ Cell Line.

[0220] The following example illustrates how to identify clonal cells from a parental established cell line that are susceptible to re-targeted endopeptidase inhibition of exocytosis or have re-targed endopeptidase uptake capacity.

1. Isolation of clonal cell lines.

[0221] During characterization of the SK-N-DZ cell line, it was discovered that the cells comprising this established cell line comprised at least five different cellular phenotypes. To determine whether any one of these phenotypically-distinct cell types was responsible for the susceptibility of this cell line to re-targeted endopeptidase inhibition of exocytosis, two different limited-dilution screens were conducted to obtain single colony isolates for each phenotypically-distinct cell type.

[0222] A suitable density of cells from a SK-N-DZ stock were grown in DMEM, 10% Fetal Bovine Serum (heat-inactivated), 0.1 mM Non-Essential Amino-Acids, 10 mM HEPES, 1 mM Sodium Pyruvate, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, contained in a T175 Collagen IV coated flask. After the second passage, the cells were trypsin-treated to produce a cell suspension and the cell concentration was determined. About 4.0 x 10^6 cells from this cell suspension was transferred into a 50 mL tube and the cells were dissociated into single cells by repeated vigorous expulsion through an 18.5 gauge needle using a 10 mL syringe. Cells from this disassociated single-cell suspension were then diluted to a concentration of 0.2 x 10^6 cells/mL by adding 15 mL of fresh growth medium, and 2.5 µL of this dilution was added to 50 mL of fresh growth medium to obtain a concentration of 10 cells/mL. From this final dilution stock, 100 µL of growth medium was added to each well of a 96-well Collagen IV coated plates and the cells were grown undisturbed in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for four weeks. Four 96-well plates were setup for analysis. After four weeks, each well was microscopically examined to identify growing single colonies, and for each colony identified 100 µL of fresh growth medium was added

to each well and the cells were grown undisturbed in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for two weeks. After two additional weeks of growth, the growing single colonies were trypsin-treated and transferred to a new 96-well plate for continued growth. Once colonies grew to about 1,000 cells, based on visual inspection, the cells were trypsin-treated and each cell-suspension was transferred into a new well from a 24-well Collagen IV-coated plate. The cells were grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide with fresh growth medium being replenished every 2-3 days, if needed. The cells were grown until the culture reached approximately 60% confluence or greater, at which point the cells were trypsin-treated and each cell-suspension was transferred into a 25 cm^2 Collagen IV-coated flask, based on the confluence of the cells in the 24-well plate. The cells were grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide with fresh growth medium being replenished every 2-3 days, if needed. Once the cells in the flask reached 70-80% confluence, they were frozen and stored in liquid nitrogen until the clonal cell lines were tested to determine their susceptibility to Noc/A inhibition of exocytosis. Of the 384 colony isolates initially setup from both screens, 24 clonal cell lines were selected based on viability and growth criteria and expanded for subsequent screening procedures. Of those, 12 fast growing cell lines were identified.

2. Primary screen for re-targed endopeptidase activity susceptibility of cells from a clonal cell line using a re-targed endopeptidase.

[0223] To determine whether cells from a clonal cell line were susceptible to re-targed endopeptidase Noc/A activity, a primary screen was conducted using an immuno-based method for determining endopeptidase activity.

[0224] Thirteen SK-N-DZ clones (#3, #4, #5, #8, #9, #10, #13, #15, #16, #17, #18, #22, and #23) plus SK-N-DZ parental cells were plated on a 96-well plate (unknown cell number per well) in EMEM, 10% FBS, 1x B27, and 1xN2 and incubated over night. Cells were treated with 1 nM Noc/A for 24 hours. Cells were lysed with 100 µL of lysis buffer for 20 minutes and centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes. Fifty microliters of 2x SDS Sample buffer were added to 50 µL of cell lysate and heated at 95 °C for 5 minutes. Ten microliters of protein sample were loaded per lane on 12% NuPage gels and a Western Blot assay was performed as described in Example I. Evaluation of the total SNAP-25 and the cleaved SNAP-25 demonstrated that clones #3, #8, #15, and #22 were at least as good as parental cells for Noc/A uptake. Full dose response treatment and analysis with the ECL sandwich ELISA assay was conducted after the cells were scale up.

3. Secondary response screening of clonal cell lines using re-targeted endopeptidase molecule.

[0225] To determine whether cells from a clonal cell line were susceptible to re-targed endopeptidase Noc/A activity, a secondary screen was conducted using an immuno-based method for determining endopeptidase activity.

[0226] To further compare these SK-N-DZ cloned cell lines, the ECL sandwich ELISA assay was carried out. Five clones (#3, #9, #15, #16, #22) plus SK-N-DZ parental cells were plated on one 96-well Poly-D-lysine coated plate per cell line at 25,000 cells per well in RPMI 1640, 10% FBS, 1x B27, and 1x N2 media (no NGF) over the weekend. Cells were treated with Noc/A at doses from 0 to 20 nM (0, 0.03, 0.08, 0.24, 0.74, 2.22, 6.67, 20 nM) for 24 hours. The cleaved SNAP-25_{197} was quantified with the ECL ELISA assay as detailed in Example I.

[0227] Table 13 shows the EC_{50} values and signal to noise for the five clones and their parental cell line. Three clones named #3, #9, and #15 generated lower EC_{50} values (< 1 nM) and clone #16 and #22 generated similar EC_{50} values when compared to the parental cell line (~ 2 nM). However, the total signals from cleaved SNAP25 were higher in clones #3, #22, and the parental cells. Clones #9, #16, and #15 had lower total signals when compared to the rest of the cell lines.

Table 13. Summary table of signal-to-noise ratios (S/N) and EC_{50} values of the five clones obtained from SK-N-DZ cells by limited-dilution cloning.

	Parental	3	9	19	16	22
S/N Ratio 0.03 nM/BK	2	3	2	2	2	3
S/N Ratio 20 nM/BK	19	27	12	8	14	20
EC_{50} (nM)	2.6 ± 1.5	0.8 ± 0.07	0.7 ±0.04	0.6 ± 0.1	2.2 ± 0.8	1.9 ± 0.6

[0228] Conditions for Noc/A treatment on SK-N-DZ clones were optimized and an assay was run comparing clones #3, #15, and #22, and the parental heterogeneous SK-N-DZ cell line. Table 14 shows the result of the comparison and demonstrated that assay optimization has greatly improved the signal to noise for the assay. Clones #3 and #22 were selected for further assay development as they possess excellent sensitivity and efficacy.

Table 14. Summary table of signal-to-noise ratios (S/N) and EC_{50} values of three clones obtained from SK-N-DZ cells using optimized conditions.

	Parental	3	15	22
S/N Ratio 0.03 nM/BK	15	8	5	10
S/N Ratio 20 nM/BK	107	89	33	60
EC_{50} (nM)	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.09

Example V

Characterization and Comparison of clonal cell lines for re-targeted endopeptidase uptake

[0229] The following example illustrates how to characterize and compare clonal cell lines originated either from an established cell line comprising a heterogeneous population or by transfection of the target receptor and subsequent cloning of the cell line.

[0230] To evaluate the specificity or selectivity of re-targeted endopeptidase uptake, non-specific uptake assays were performed using of a re-targeted endopeptidase lacking the targeting domain. For opioid re-targeted endopeptidase, cells from the AGN P33 clone #6 cell line (comprising cells stably transformed with an expression construct encoding an ORL-1 receptor) and the SK-N-DZ clonal cell lines #3 and #22 (comprising cells that express endogenous ORL-1 receptor) were seeded at 150,000 cells per well on a 96-well Poly-D-lysine coated plate in RPMI 1640 serum free media containing N2 and B27 supplements, and NGF (50 ng/mL) and incubated for 20 ±4 hours at 37°C in a 5% CO_2 incubator before compound treatment. Cells were treated with 8-doses of Noc/A ranging from 0-20 nM or 0-40 nM and or eight doses of LH_N/A ranging from 0 to 400 nM or 0 to 40 nM in the same medium for 22 hours. Media was removed and cells washed, lysed, and centrifuged to eliminate debris in preparation for a sandwich ELISA assay. An ELISA plate coated with 2E2A6 monoclonal antibody was blocked with 150 µL Blocking Buffer at room temperature for 1 hour. After blocking buffer was removed, 30 µL of cell lysate was added to each well and the plate was incubated at 4 °C for 2 hours. Plates were washed three times with PBS-T and 30 µL of SULFO-TAG NHS-Ester labeled detection α-SNAP25 polyclonal antibodies at 5 µg/mL in 2% blocking reagent in PBS-T was added to the bottom corner of wells. The plate was sealed and shaken at room temperature for 1 hour, followed by three washes with PBS-T. After washes were completed, 150 µL of 1x Read Buffer per well was added and the plate was read in the SI6000 Image reader. The results comparing Noc/A uptake relative to the negative control LH_N/A are shown in Table 15 and Table 16. These results indicate that there was good separation between Noc/A and LH_N/A uptake in both cell lines demonstrating specific uptake of Noc/A.

Table 15. Non-specific uptake for SK-N-DZ clone #3. Summary of four independent experiments

nM	% non-specific uptake	SEM (standard error of the mean)
0	2	0.5
1	6	0.5
2	8	0.5
5	10	1
15	19	0.9
44	33	1.5
133	65	2.4
400	93	2.3

Table 16. Non-specific uptake for hORL-1 #6 cells. Summary of three independent experiments

nM	% non-specific uptake	SEM (standard error of the mean)
0	1	0.2
1	2	0.2
2	3	0.6

Table 16. Non-specific uptake for hORL-1 #6 cells. Summary of three independent experiments		
nM	% non-specific uptake	SEM (standard error of the mean)
5	3	0.3
15	8	1.3
44	12	1.9
133	22	3.0
400	32	3.0

[0231] Table 17 summarizes the results for the characterization and comparison of the three cell lines. SK-N-DZ clonal cell lines #3 and #22 possess a sensitivity identical to the primary eDRG and an excellent signal-to-noise to develop a robust assay for re-targeted endopeptidase Noc/A. The AGN P33 clonal cell line #6 is also an excellent candidate with low non-specific uptake and adequate sensitivity.

Table 17.				
Parameter	SK-N-DZ clone 3	SK-N-DZ clone 22	AGN P33 clone 6	eDRG
Cell line species	Human Clonal	Human Clonal	Human Clonal	Rat primary
Cell Receptor Expression	Human ORL1 endogenous	Human ORL1 endogenous	Human ORL1 transfected	Rat ORL1 endogenous
Dynamic Range	0.03 to 20 nM dose response	0.03 to 20 nM dose response	0.04 to 40 nM dose response	0.17 to 20 nM dose response
Sensitivity (EC_{50})	EC_{50} = 0.75±0.1 (N=10)	EC_{50} = 0.8±0.2 (N=9)	EC_{50} = 2.4 ± 0.2 (N=21)	EC_{50} = 0.8 ± 0.15 (N=6)
ULOQ	20 nM	20 nM	20 nM	10-20 nM
S/N ULOQ/ background	98 ± 15 (N=10)	86 ± 17 (N=9)	385 ± 32 (N=19)	~300
S/N LLOQ/ background	12 ± 2 (N=11)	10 ± 2 (N=9)	29 ± 7 (N=18)	N/A
Specificity vs LH_N/A	≥ 2 logs (N=4)	≥ 2 logs (N=4)	≥ 2 logs (N=3)	N/A
SNAP-25 Expression	Endogenous	Endogenous	Endogenous	Endogenous
Competition with Nociceptin Var.	Full competition (n=4)	Full competition (n=4)	Partial competition (n=4)	N/A
Inhibition by Ab Anti-nociceptin	Full competition (n=4)	Full competition (n=4)	Full competition (n=4)	N/A
Inhibition by Anti-868 Ab	Partial competition (N=3)	Partial competition (N=3)	Partial competition (N=3)	N/A

[0232] To evaluate the sensitivity of re-targeted endopeptidase uptake, ligand saturation binding assays were performed. The interaction of most ligands with their binding sites can be characterized in terms of binding affinity (NIH Assay Guidance). In general, high affinity binding involves a longer residence time for the ligand at its receptor binding site than in the case of low affinity binding. The dissociation constant is commonly used to describe the affinity between a ligand (L) (such as a drug) and a protein (P) i.e. how tightly a ligand binds to a particular protein. An equilibrium saturation binding experiment measures total and nonspecific binding (NSB) at various radioligand concentrations. The equilibrium dissociation

constant or affinity for the radioligand, K_d, and the maximal number of receptor binding sites, B*max*, can be calculated from specific binding (total - NSB) using non-linear regression analysis. The K_d for the specific binding can be calculated using a one-site binding hyperbola nonlinear regression analysis (i.e. GraphPad Prism) as shown in the equation below, where B*max* is the maximal number of binding sites (pmol/mg, or pmol/cells, or sites/cells), and K_d (nM, pM, etc.) is the concentration of radioligand required to reach half-maximal binding:

$$\text{Bound} = \frac{B_{max} \times [L]}{[L] + K_d}$$

[0233] For opioid re-targeted endopeptidase, cells from the AGN P33 clone #6 cell line (comprising cells stably transformed with an expression construct encoding an ORL-1 receptor), the SK-N-DZ parental cell line, and the SK-N-DZ clonal cell lines #3, #15, and #22 (comprising cells that express endogenous ORL-1 receptor) were plated at 200,000 cells per well on a 48-well Poly-D-lysine coated plate in RPMI 1640 serum free media containing 1x N2 and 1x B27 supplements and incubated overnight at 37 °C in a 5% CO_2 incubator. Media was removed and cells and 150 µL of Tris binding buffer was added to wells used to assess total binding and 100 µL of Tris binding buffer was added to well used to assess non-specific binding. About 50 µL of 4x final concentration cold nociceptin (2.5 µM to SK-N-DZ cell lines and 1 µM to AGN P33 clonal cell line #6) was added to the non-specific binding wells, and 50 µL of 4x final concentrations of ^{3}H-nociceptin (0 nM, 0.05 nM, 0.1 nM, 0.2 nM, 0.4 nM, 0.8 nM, 1.6 nM, 3.1 nM, 6.3 nM, 12.5 nM, 25 nM, and 50 nM to the SK-N-DZ cell lines and 0, 0.01 nM, 0.02 nM, 0.039 nM, 0.078 nM, 0.156 nM, 0.313 nM, 0.625 nM, 1.25 nM, 2.5 nM, 5.0 nM, and 10 nM to the AGN P33 clonal cell line #6) was added to both the total binding wells and the non-specific binding wells to a final volume of 200 µL. After incubation at 37 °C for 30 minutes, the wells were washed twice in 0.5 mL of cold Washing Buffer. Cells were then denatured in 200 µL 2 N NaOH and transferred to 20 mL scintillation vials containing 5 mL of scintillation fluid. Raw data were used to plot the dose-response graphs and calculate the K_d for each sample. The raw data obtained were transferred to SigmaPlot v10.0 and One Site Saturation fit was used to define the dose-response curves under the equation category of Ligand Binding. Graphical reports were generated and contained the following parameters: R^2 (correlation coefficient), B*max*, and K_d ± SE (Coefficient ± standard error). Graphs of total binding, specific binding, and non-specific binding were obtained on the assay performed on the SK-N-DZ clonal cell lines #3, #15, and #22, and AGN P33 clonal cell line #6 cells. SK-N-DZ clonal cell lines #3 and #22 produced a concentration-dependent and saturable binding of ^{3}H-nociceptin. Under the same experimental conditions, SK-N-DZ clonal cell line #15 produced a dose-dependent response of ^{3}H-nociceptin, but not saturated at the highest dose of 50 nM. Compared to the SK-N-DZ cell lines expressing endogenous ORL-1, cells from the AGN P33 clonal cell line #6 had significantly higher affinity binding to ^{3}H-nociceptin (highest dose was 10 nM versus 50 nM in SK-N-DZ) with low non-specificity binding.

[0234] The saturation binding curves of SK-N-DZ clonal cell lines #3, #22, #15 and AGN P33 clonal cell line #6 were used to estimate K_d and B*max* values from three independent binding experiments per cell line performed in three different days. The rank order of these four cell lines is: AGN P33 clonal cell line #6 (K_d=1.86 nM and B*max*=2.9 fmol/cell) > SK-N-DZ clonal cell line #3 (K_d=14 nM and B*max*=0.6 fmol/cell) ≥ SK-N-DZ clonal cell line #22 (K_d=17 nM and B*max*=0.6 fmol/cell) >> SK-N-DZ clonal cell line #15 (K_d>50 nM). To get a saturated dose-response for SK-N-DZ clonal cell line #15, a higher dose range of ^{3}H-nociceptin needs to be used. Table 16 summarizes the data regarding the characterization of the specific plasma membrane nociceptin-binding sites in three SK-N-DZ clonal cell lines, #3, #15, and #22, and AGN P33 clonal cell line #6 stable cell lines. The data showed the following: 1) a high affinity site with very low non-specific binding (K_d, 1.8 nM, and B*max* 2.9 fmol per cell) in the AGN P33 clonal cell line #6; 2) nociceptin-binding can be performed on SK-N-DZ native cells expressing endogenous receptor; 3) AGN P33 clonal cell line #6 had about 10-fold higher affinity to nociceptin than the SK-N-DZ cell lines; 4) as seen in the cell-based potency assay, SK-N-DZ clonal cell lines #3 and #22 (K_d 14-17 nM, B*max* 0.6 fmol per cell) had more receptor sites per cell than SK-N-DZ clonal cell line #15 (not saturable under the same dose range).

Table 18. Summary of ^{3}H-nociceptin saturation binding assay for four leading cell lines (n=3 independent experiments)

Cell Lines	K_d (nM±SD)	B*max* (fmol/cell)
SK-N-DZ #3	14 ± 1.6	0.59
SK-N-DZ #15	>50	ND
SK-N-DZ #22	16.7 ± 1.1	0.58
AGN P33 clonal cell line #6	1.86 ± 0.1	2.89

[0235] To evaluate the sensitivity of re-targeted endopeptidase uptake, the amount of re-targeted endopeptidase receptor expressed at the mRNA level was assessed using RT-PCR. The amount of receptor expressed in the cells is an important aspect of the characterization of the cell line being used for testing and it is related to the sensitivity to re-targeted endopeptidases. The amount of expressed re-targeted endopeptidase receptor can also be a tool for screening other potential cell lines and to eliminate cell lines that do not express the target receptor. One method of measuring receptor expression is to quantify the amount of re-targeted endopeptidase receptor mRNA using real time PCR (RT-PCR).

[0236] For opioid re-targeted endopeptidase, RNA was isolated from cells of a non-transfected parental SiMa cell line, cells from the AGN P33 clonal cell line #6, cells from the parental SK-N-DZ cell line, and cells from the SK-N-DZ clonal cell lines #3 and #22 grown in either serum free media or media with serum. The mRNA was converted to cDNA and the ORL-1 was amplified and measured real time to determine the relative amount present in each cell line using the following oligonucleotide primers for ORL-1: forward 5'-CACTCGGCTGGTGCTGGTGG-3' (SEQ ID NO: 148) and reverse 5'-

AATGGCCACGGCAGTCTCGC-3' (SEQ ID NO: 149). The DNA is quantified by using SYBR® green which fluoresces relative to the amount of double stranded DNA (PCR product) present in the reaction. Plotting the amount of fluorescence vs. number of cycles gives a logistic curve for each reaction. The faster a reaction reaches the linear phase of the curve the more ORL-1 receptor cDNA there is in the reaction. A control RT reaction where no enzyme is added was be used to determine if there is contamination. Since there is no RT enzyme present in this reaction, no cDNA will be produced. A PCR product cannot be produced using a RNA template, so if a PCR curve appears in the –RT reaction, the only possibility is genomic DNA contamination. In the –RT reactions, no PCR plots appears, confirming there was minimal genomic DNA contamination (data not shown).Table 18 lists the cell lines with their CT value. The CT is the number of PCR cycles it took for that corresponding PCR reaction to produce a signal above a set threshold. The amount of ORL-1 receptor mRNA in a cell line can be compared to another by looking at their corresponding CT values. According to the CT values, cells from the AGN P33 clonal cell line #6 had much more ORL-1 mRNA than cells from the parental SiMa cell line in serum free media (Ave CT: 28.6 vs. 17.3) and in media with serum (Ave CT: 26.1 vs. 16.5). Also, there appears to be minimal difference in mRNA obtained from cells at passage 6 vs. passage 16 in the AGN P33 clonal cell line #6. Also, there are minimal differences in CT values and plots in the parental SK-N-DZ cell line vs. clonnal cell line #3 and #22. This conclusion is true in cells grown in media with serum and serum free media and reflects the similarity of these cell lines observed in the cell-based potency assay for Noc/A.

Table 19. Average CT Values for ORL-1 Expression in Cell Lines

Media	Cell line	CT average
Serum Free Media	SiMa Parental p26	28.6
	SiMa hORL-1 clone #6 p6	17.3
	SiMa hORL-1 clone #6 p16	17.3
Complete Media	SiMa Parental p26	26.1
	SiMa hORL-1 clone #6 p6	16.4
	SiMa hORL-1 clone #6 p16	16.6
Serum Free Media	SK-N-DZ	26.3
	SK-N-DZ clone #3	25.9
	SK-N-DZ clone #22	26.6
Complete Media	SK-N-DZ	26.2
	SK-N-DZ clone #3	25.8
	SK-N-DZ clone #22	26.4

Example VII

Development of α-SNAP-25 Monoclonal Antibodies that Selectively Bind a SNAP-25 Epitope Having a Free Carboxyl-terminus at the P_1 Residue of the BoNT/A Cleavage Site Scissile Bond

[0237] The following example illustrates how to make α-SNAP-25 monoclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

1. Generation of α-SNAP-25 monoclonal antibodies.

[0238] To develop monoclonal α-SNAP-25 antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, the 13-residue peptide $CDSNKTRIDEANQ_{COOH}$ (SEQ ID NO: 38) was designed as a SNAP-25 cleavage product antigen. This peptide comprises a flexible linker region and a N-terminal Cysteine residue for conjugation to KLH and amino acids 186-197 of human SNAP-25 (SEQ ID NO: 5) with a carboxylated C-terminal glutamine (SEQ ID NO: 38). The generation of monoclonal antibodies to well-chosen, unique peptide sequences provides control over epitope specificity, allowing the identification of a particular subpopulation of protein among a pool of closely related isoforms. Blast searches revealed that this peptide has high homology only to SNAP-25 and almost no possible cross-reactivity with other proteins in neuronal cells. The sequence was also carefully scrutinized by utilizing computer algorithms to determine hydropathy index, protein surface probability, regions of flexibility, and favorable secondary structure, followed by proper orientation and presentation of the chosen peptide sequence. The peptide was synthesized and conjugated to Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) to increase immunogenicity. Six Balb/c mice were immunized with this peptide, and after three immunizations in about eight weeks, the mice were bled for testing. The blood was allowed to clot by incubating at 4 °C for 60 minutes. The clotted blood was centrifuged at 10,000x g at 4 °C for 10 minutes to pellet the cellular debris. The resulting serum sample was dispensed into 50 µl aliquots and stored at -20 °C until needed.

[0239] A similar strategy based on other SNAP-25 antigens disclosed in the present specification is used to develop α-SNAP-25 monoclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. For example, the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 45 can be conjugated to KLH instead of the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 38. As another example, the amino acids 186-197 of human SNAP-25 from the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 38 can be replaced with SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, or SEQ ID NO: 44.

2. Screening for the presence of α-SNAP-25 monoclonal antibodies.

[0240] To determine the presence of an α-SNAP-25 monoclonal antibody that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, comparative ELISA and cell-based cleavage assay were performed using the extracted mouse serum,

For comparative ELISA, two fusion proteins were constructed: BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ of SEQ ID NO: 48 and the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ of SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ comprised a naturally-biotinylated 16 amino acid BirA peptide of SEQ ID NO: 50 amino-terminally linked to a SNAP-25 peptide comprising amino acids 134-197 of SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ comprised a naturally-biotinylated 16 amino acid BirA peptide of SEQ ID NO: 50 amino-terminally linked to a SNAP-25 peptide comprising amino acids 134-206 of SEQ ID NO: 5. These two substrates were suspended in 1 x PBS at a concentration of 10 µg/mL BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ and the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$. The BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ and the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ were coated onto separate plates by adding approximately 100 µl of the appropriate Substrate Solution and incubating the plates at room temperature for one hour. Washed plates were incubated at 37 °C for one hour in 0.5% BSA in 1 x TBS containing a 1:10 to 1:100 dilution of an antibody-containing serum derived from one of the six immunized mice (Mouse 1, Mouse 2, Mouse 3, Mouse 4, Mouse 5, and Mouse 6). Primary antibody probed plates were washed four times for 5 minutes each time in 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Washed plates were incubated at 37 °C for 1 hour in 1 x TBS containing a 1:10,000 dilution of goat polyclonal anti-mouse IgG antibody conjugated to Horseradish peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) as a secondary antibody. Secondary antibody-probed plates were washed four times in 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Chromogenic detection of the labeled SNAP-25 products were visualized by chromogenic detection using ImmunoPure TMB substrate kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). The development of a yellow color in the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ coated plates, but not the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ coated plates, indicated that the α-SNAP-25 antibody preferentially recognized the SNAP-25_{197} cleavage product. The resulted indicated that of the six mice used for immunization, three mice (Mouse 2, Mouse 3, and Mouse 4) had higher titers and more specificity towards a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

[0241] These results were confirmed using an ELISA light chain activity assay. A 96-well Reacti-Bind Streptavidin coated plates (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) were prepared by adding approximately 100 µl of the following Substrate Solution: Rows A-C were coated with 100 µL of BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ at twelve different concentrations; Rows D-H were coated with 100 µL of BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ at 10 µg/mL. The plates were washed by aspirating the Substrate Solution and rinsing each well three times with 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Dilutions of BoNT/A were pre-reduced at 37 °C for 20 minutes in BoNT/A Incubation Buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 1% fetal bovine serum, 10 µM $ZnCl_2$, 10 mM dithiothrietol) and 100 µl of the pre-reduced BoNT/A was added to the substrate-coated plates and incubated at 37 °C for 90 minutes. BoNT/A treated plates were washed by aspirating the BoNT/A Incubation Buffer and rinsing each plate three times with 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Washed plates were incubated at 37 °C for one hour in 0.5% BSA in 1 x TBS containing a 1:10 to 1:100 dilution of the antibody-containing serum being tested. Primary antibody probed plates were washed four times for 5 minutes each time in 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Washed plates were

incubated at 37 °C for 1 hour in 1 x TBS containing a 1:10,000 dilution of goat polyclonal anti-mouse IgG antibody conjugated to Horseradish peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) as a secondary antibody. Secondary antibody-probed plates were washed four times in 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Chromogenic detection of the labeled SNAP-25 products were visualized by chromogenic detection using ImmunoPure TMB substrate kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). The development of a yellow color, which correlated with the presence of the SNAP-25_{197} cleavage product was detected in BoNT/A treated samples, but not untreated controls, using antibody-containing serum derived from all six immunized mice (Mouse 1, Mouse 2, Mouse 3, Mouse 4, Mouse 5, and Mouse 6). Thus, the comparative ELISA analysis indicated that of the mice used for immunization, three mice (Mouse 2, Mouse 3, and Mouse 4) had higher titers and more specificity towards a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

[0242] For cell-based cleavage assay, a suitable density of PC12 cells were plated into 60 mm^2 tissue culture plates containing 3 mL of an appropriate serum medium (Table 1). The cells were grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until cells reached the appropriate density. A 500 µL transfection solution was prepared by adding 250 µL of OPTI-MEM Reduced Serum Medium containing 15 µL of LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) incubated at room temperature for 5 minutes to 250 µL of OPTI-MEM Reduced Serum Medium containing 10 µg of a pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (SEQ ID NO: 51). The pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct comprises a pQBI-25 expression vector (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA) whose promoter elements are functionally linked to a polynucleotide encoding the GFP-BoNT/A light chain of SEQ ID NO: 52. This transfection mixture was incubated at room temperature for approximately 20 minutes. The media was replaced with fresh unsupplemented media and the 500 µL transfection solution was added to the cells. The cells were then incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for approximately 6 to 18 hours. The cells were washed and harvested as described in Example II. To detect for the presence of the cleaved SNAP-25_{197} product, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example II, except that the primary antibody used was a 1:1,000 dilution of the antibody-containing serum and the secondary antibody used was a 1:20,000 of mouse α-IgG Horseradish Peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). A single band corresponding to the SNAP-25_{197} cleavage product was detected in BoNT/A treated samples, but not untreated controls, using antibody-containing serum derived from three mice (Mouse 2, Mouse 3, and Mouse 4). Thus, the cell-based cleavage assay indicated that of the mice used for immunization, three mice (Mouse 2, Mouse 3, and Mouse 4) had higher titers and more specificity towards a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

3. *Production of hybridomas.*

[0243] To make hybridomas producing α-SNAP-25 monoclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond,

the spleen from Mouse 2 was harvested three days subsequent to a final "booster" immunization and the spleen cells were fused with myeloma cells P3-X63 Ag8.653 using standard hybridoma protocols. These cells were plated into five 96-well plates and hybrids were selected using HAT medium. Within 8-14 days after fusion, the first screening of the approximately 480 parent clones was carried out using comparative ELISA with the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ and the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ peptides coated in two separate plates. The comparative ELISA provided a quick screen method to identify hybridomas producing antibodies specific for the cleaved SNAP-25_{197}. The top 18 clones were subjected to further screening using the cell-based cleavage assay described above and immunostaining of LC/A transfected cells. (Table 20).

Table 20. Analysis of Supernatants Containing α-SNAP-25 Monoclonal Antibody

Clone	Comparative ELISA				Cell-Based Assay	
	OD SNAP-25_{197}	OD SNAP-25_{206}	$Ratio_{197/206}$	$Ratio_{206/197}$	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}
1D3	1.805	0.225	8.02	0.13	+++	–
1F12	0.365	0.093	3.92	0.25	–	–
1G10	0.590	0.137	4.31	0.23	++	–
1H1	0.335	0.121	2.77	0.36	–	–
1H8	0.310	0.302	1.03	0.97	+	–
2C9	0.139	0.274	0.51	1.97	–	–
2E2	0.892	0.036	24.78	0.04	++	–
2E4	0.228	0.069	3.30	0.30	+	–
2F11	1.095	1.781	0.61	1.63	–	–
3C1	1.268	0.053	23.92	0.04	++	–
3C3	0.809	0.052	15.56	0.06	++	–
3E1	0.086	0.155	0.55	1.80	0	–
3E8	2.048	0.053	38.64	0.03	+++	–
3G2	0.053	0.158	0.34	2.98	–	–
4D1	0.106	0.218	0.49	2.06	–	–
4G6	0.061	0.159	0.38	2.61	–	–
5A5	0.251	0.106	2.37	0.42	+	–
5F11	0.243	0.061	3.98	0.25	–	–

[0244] Clones 1D3, 1G10, 2E2, 3C1, 3C3, and 3E8 were further cloned by limiting dilution because the conditioned media produced by these clones comprised α-SNAP-25 antibodies with a preferential binding specificity having a $ratio_{197/206}$ of at least 4:1 for the SNAP-25_{197} cleavage product relative to the SNAP-25_{206} uncleaved substrate and detected the SNAP-25_{197}-cleavage product using the cell-based cleavage assay and the immunostaining of PC12 cells transfected with GFP-LC/A. Similarly clones 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 and 4G6 were further cloned by limiting dilution because the conditioned media produced by these clones comprised α-SNAP-25 antibodies with a preferential binding specificity having a $ratio_{206/197}$ of at least 1.5:1 for the SNAP-25_{206} uncleaved substrate relative to the SNAP-25_{197} cleavage product and detected the SNAP-25_{206}-uncleaved substrate using the cell-based cleavage assay. These single-cell derived clones were screened again using comparative ELISA, cell-based cleavage, and immunostaining to confirm their affinity and specificity, and the antibodies were isotyped using standard procedures.

Ascites were produced from clones 1D3B8 (IgM.k), 1G10A12 (IgG3.k), 2C9B10 (IgG3.k), 2E2A6 (IgG3.k), 2F11B6 (IgM.k), 3C1A5 (IgG2a.k), and 3C3E2 (IgG2a.k). Clone 3E8 stopped producing antibodies during the cloning process and could not be further evaluated.

4. Evaluation of binding specificity of α-SNAP-25 monoclonal antibodies.

[0245] To evaluate binding specificity of an α-SNAP-25 monoclonal antibody that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, ascites from clones 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5, and 3C3E2 were used to detect SNAP-25 cleavage product using the cell-based activity assay, immunocytochemistry and immunoprecipitation.

[0246] For the cell-based activity assay, binding specificity was determined by analyzing the ability of α-SNAP-25 antibody-containing ascites to detect the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product by Western blot analysis. A suitable density of PC12 cells were plated into 60 mm^2 tissue culture plates containing 3 mL of an appropriate serum medium, grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until an appropriate cell density was reached, and transfected with the either a transfection solution lacking the pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (untransfected cells) or a transfection solution containing the pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (transfected cells) as described above. The cells were washed and harvested as described in Example I. To detect for the presence of both the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that the primary antibody used was a 1:100 dilution of the α-SNAP-25 monoclonal antibody-containing ascites and the secondary antibody used was a 1:20,000 of α-mouse IgG conjugated to Horseradish Peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). In addition, three commercially available mouse α-SNAP-25 monoclonal antibodies were tested. SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), an α-SNAP-25 antibody the manufacturer indicates detects both the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product, was used at a 15,000 dilution according to the manufacturer's recommendations. MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), an α-SNAP-25 antibody the manufacturer indicates detects both the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product, was used at a 1:100 dilution according to the manufacturer's recommendations. MC-6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), an α-SNAP-25 antibody the manufacturer indicates detects only the cleaved SNAP-25_{197} product, was used at a 1:100 dilution according to the manufacturer's recommendations.

[0247] Table 21 indicates the α-SNAP-25 antibody-containing ascites that detected only the SNAP-25_{197} cleavage product. The cell-based cleavage assay indicated that ascites produced from clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, and 3C3E2 synthesize an α-SNAP-25 monoclonal antibody having high binding specificity for the SNAP-25_{197} cleavage product that allows for the selective recognition of this cleavage

product relative to the SNAP-25_{206} uncleaved substrate. Commercial antibody SMI-81 detected the SNAP-25_{206} uncleaved substrate, but only poorly recognized the SNAP-25_{197} cleavage product (Table 21). Surprisingly, commercial antibody MC-6050 only detected the SNAP-25_{206} uncleaved substrate, and failed to recognize the SNAP-25_{197} cleavage product (Table 21). Even more surprisingly, commercial antibody MC-6050 only detected the SNAP-25_{206} uncleaved substrate, and failed to recognize the SNAP-25_{197} cleavage product, even though the manufacturer advertises that this antibody selectively detects the SNAP-25_{197} cleavage product (Table 21). Thus, this analysis indicates that while 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, and 3C3E2 exhibit suitable selectivity for the SNAP-25_{197} cleavage product, 1G10A12 and 2F11B6 do not. In addition, commercial antibodies SMI-81, MC-6050 and MC-6053 all are unsuitable for the immuno-based methods disclosed in the present application because all failed to selectivity detect the SNAP-25_{197} cleavage product.

[0248] For immunocytochemistry analysis, binding specificity was determined by analyzing the ability of α-SNAP-25 antibody-containing ascites to detect the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product by immunostaining. *See e.g.*, Ester Fernandez-Salas et al., *Plasma Membrane Localization Signals in the Light Chain of Botulinum Neurotoxin*, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 101(9): 3208-3213 (2004). A suitable density of PC12 cells were plated, grown, and transfected with either a transfection solution lacking the pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (untransfected cells) or a transfection solution containing the pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (transfected cells) as described above. The cells were washed in 1 x PBS and fixed in 5 mL of PAF at room temperature for 30 minutes. Fixed cells were washed in phosphate buffered saline, incubated in 5 mL of 0.5% Triton® X-100 (polyethylene glycol octylphenol ether) in 1 x PBS, washed in 1 x PBS, and permeabilized in 5 mL of methanol at -20 °C for six minutes. Permeabilized cells were blocked in 5 mL of 100 mM glycine at room temperature for 30 minutes, washed in 1 x PBS, and blocked in 5 mL of 0.5% BSA in 1 x PBS at room temperature for 30 minutes. Blocked cells were washed in 1 x PBS and incubated at room temperature for two hours in 0.5% BSA in 1 x PBS containing a 1:10 dilution of an ascites from a clonal hybridoma cell line being tested. Primary antibody probed cells were washed three times for 5 minutes each time in 1 x PBS. Washed cells were incubated at room temperature for 2 hours in 1 x PBS containing a 1:200 dilution of goat polyclonal anti-mouse immunoglobulin G, heavy and light chains (IgG, H+L) antibody conjugated to ALEXA® FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) as a secondary antibody. Secondary antibody-probed cells were washed three times for 5 minutes each time in 1 x PBS. Washed cells were prepared for microscopic examination by mounting in VECTASHIELD® Mounting Media (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and coverslipped. Images of signal detection were obtained with a Leica confocal microscope using appropriate laser settings. Table 21 indicates that the α-SNAP-25 antibody-containing ascites that specifically detected the SNAP-25_{197}-cleavage product. The immunocytochemistry analysis indicated that ascites produced from clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, and 3C3E2 synthesize an α-SNAP-25 monoclonal antibody having high binding specificity for the SNAP-25_{197} cleavage product that allows for the preferential recognition of this cleavage product relative to the SNAP-25_{206} uncleaved substrate.

[0249] For immunoprecipitation analysis, binding specificity was determined by analyzing the ability of Protein A (HiTrap™ Protein A HP Columns, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ), purified α-SNAP-25 monoclonal antibodies to precipitate the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product. *See e.g.*, Chapter 8 *Storing and Purifying Antibodies*, pp. 309-311, Harlow & Lane, *supra*, 1998a. A suitable density of PC12 cells were plated, grown, and transfected with either a transfection solution containing a pQBI-25/GFP expression construct (control cells; SEQ ID NO: 53) or a transfection solution containing the pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (experimental cells) as described above. The pQBI-25/GFP expression construct comprises an expression vector whose promoter elements are functionally linked to a polynucleotide encoding GFP of SEQ ID NO: 54. After an overnight incubation, the cells were washed by aspirating the growth media and rinsing each well with 200 µL 1 x PBS. To harvest the cells, the PBS was aspirated, the cells were lysed by adding an Immunoprecipitation Lysis Buffer comprising 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGDT, 10% glycerol, 1% Triton® X-100 (polyethylene glycol octylphenol ether) and a 1 x COMPLETE™ Protease inhibitor cocktail (Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN) and incubating at 4 °C for one hour. The lysed cells were centrifuged at 3,000 x *g* at 4 °C for 10 minutes to remove cellular debris and the supernatant transferred to a clean tube and diluted to a protein concentration of approximately 1 mg/mL. Approximately 5 µg of purified monoclonal antibody was added to 0.5 mL of diluted supernatant and incubated at 4 °C for two hours. After primary antibody incubation, approximately 50 µL of immobilized Protein G (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) was added to the diluted supernatant and incubated at 4 °C for one hour. The incubated supernatant was washed three times for 30 minutes each time by adding 0.5 mL of Immunoprecipitation Lysis Buffer, centrifuging at 300 x *g* at 4 °C for one minute to pellet the immobilized Protein G, and decanting the supernatant. After washing, the pellet was resuspended in 30 µl of 1 x SDS Loading Buffer and the sample was heated to 95 °C for 5 minutes. To detect for the presence of both the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that the primary antibody used was a 1:1,000 dilution of the α-SNAP-25 polyclonal antibody serum (see Example V) and the secondary antibody used was a 1:20,000 of rabbit α-IgG Horseradish Peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Table 21 indicates the α-SNAP-25 antibody-containing ascites that specifically pulled down the SNAP-25_{197}-cleavage product by immunoprecipitation analysis. The immunoprecipitation analysis indicated that ascites produced from clones 2E2A6 and 3C1A5 synthesize an α-SNAP-25 monoclonal antibody having high binding specificity for the SNAP-25_{197} cleavage product that allows for the preferential recognition of this cleavage product relative to the SNAP-25_{206} uncleaved substrate.

Table 21. Analysis of Clone Ascites Containing α-SNAP-25 Monoclonal Antibody

Clone	Cell-Based Assay		Immunocytochemistry		Immunoprecipitation	
	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}
1D3B8	++	-	++	-	Not Tested	Not Tested
1G10A12	++	++	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested

2C9B10	++	–	++	-	Not Tested	Not Tested
2E2A6	++	–	++	-	++	–
2F11B6	+	+	+	+	Not Tested	Not Tested
3C1A5	++	–	++	–	++	–
3C3E2	+	–	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested
MC-6050	–	+	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested
MC-6053	–	+	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested
SMI-81	-/+	++	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested

5. Evaluation of binding affinity of α-SNAP-25 monoclonal antibodies.

[0251] To determine the binding affinity of an α-SNAP-25 monoclonal antibody showing high binding specificity for either the SNAP-25_{197} cleavage product or the SNAP-25_{206} uncleaved substrate, binding affinity assays were performed on a BIAcore 3000 instrument using carboxymethyl dextran (CM5) sensor chips (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Runs were conducted at 25 °C with HBS-EP buffer comprising 10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM sodium chloride, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) surfactant P20 at a flow rate of 10 µL/min. SNAP-25 peptides comprising amino acids 134-197 of SEQ ID NO: 5 (SNAP-$25_{134-197}$) or amino acids 134-206 of SEQ ID NO: 5 (SNAP-$25_{134-206}$) were covalently attached to the surface of the CM5 sensor chips using standard amine coupling. Briefly, the CM5 chips were activated by a 7 minute injection of a mixture of 0.2 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and 0.05 M N-hydroxysuccimide; the SNAP-25 peptides were then injected in 10 mM sodium acetate (pH 4.0) for 20 min at a flow rate of 10 µL/min; and unreacted succimide esters were blocked by a 7-min injection of 1 M ethanolamine hydrochloride, pH 8.5. The immobilized amount of SNAP-$25_{134-197}$ or SNAP-$25_{134-206}$ on the chip was reflected by a 100-150 increase in response units (about 0.10-0.15 ng/mm^2). Antibody samples comprising either ascites or purified monoclonal antibodies produced from clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, and 3C3E2, as well as, commercially available α-SNAP-25 antibodies were passed over the surface of the CM5 chips allowing an association time of 10 min and a dissociation time of 20 min. The surfaces were regenerated between runs by a 1 minute injection of 10 mM glycine-HCl (pH 2.5) at a flow rate of 15 µL/min. Sensorgram curves were fitted to a 1:1 kinetic binding model with the BIAevaluation 3.0 software.

[0252] The results indicate that both 2E2A6 and 3C1A5 were highly specific for cleaved SNAP-25_{197} product over SNAP-25 uncleaved substrate (Table 22). When compared to the binding affinities of MC-6050 and MC-6053, 1D3B6 had an approximately 10-fold higher equilibrium disassociation constant for the SNAP-25 cleavage product relative to these commercial antibodies (Table 22). Interestingly, 2E2A6 had only a slightly lower equilibrium disassociation constant for the SNAP-25 cleavage product relative to these commercial antibodies (0.405 nM versus 0.497 and 0.508)(Table 22). As neither of these commercial α-SNAP-25 antibodies selectively recognized the SNAP-25 cleavage product (Table 21), an equilibrium disassociation constant lower than about 0.5 nM appears, in part, critical to achieve such selectivity. Similarly, when compared to the binding affinities of MC-6050 and MC-6053, 2E2A6 had an

121

about at least one-fold slower off rate/dissociation constant (6.74×10^{-5} versus 8.82×10^{-4} s^{-1} and 1.18×10^{-3} s^{-1}) (Table 22). This further suggests that an off rate/dissociation constant lower than about 8.82×10^{-4} appears, in part, critical to achieve selective binding for the SNAP-25 cleavage product. This result is consistent with 1D3B8, which had an off rate/dissociation constant of 5.78×10^{-5} s^{-1} (Table 22).

Table 22. Analysis of Binding Affinity α-SNAP-25 Monoclonal Antibodies

SPR Parameter	1D3B8		2E2A6	
	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$ [a]	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$ [b]
Ka (M^{-1} s^{-1})	1.06×10^{6}	—	1.70×10^{6} (1.66×10^{5})	— (—)
Kd (s^{-1})	5.78×10^{-5}	—	1.53×10^{-4} (6.74×10^{-5})	— (—)
KD (nM)	0.050	—	0.090 (0.405)	— (—)
SPR Parameter	**3C1A5**		**2C9B10**	
	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$ [c]	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$ [d]
Ka (M^{-1} s^{-1})	2.17×10^{5}	—	1.15×10^{4}	—
Kd (s^{-1})	2.88×10^{-4}	—	3.11×10^{-4}	—
KD (nM)	1.33	—	27.1	—
SPR Parameter	**MC-6050**		**MC-6053**	
	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$
Ka (M^{-1} s^{-1})	1.78×10^{6}	3.06×10^{2}	2.32×10^{6}	1.06×10^{2}
Kd (s^{-1})	8.82×10^{-4}	6.07×10^{-3}	1.18×10^{-3}	2.56×10^{-5}
KD (nM)	0.497	19,800	0.508	240

[a] No binding was observed when up to 125 nM of α-SNAP-25 monoclonal antibody 1D3B8 was passed over the surface of the CM5 sensor chip after a 10 minute association time.

[b] No binding was observed when up to 10 μM of α-SNAP-25 monoclonal antibody 2E2A6 was passed over the surface of the CM5 sensor chip after a 10 minute association time.

[c] No binding was observed when up to 100 nM of α-SNAP-25 monoclonal antibody 3C1A5 was passed over the surface of the CM5 sensor chip after a 10 minute association time.

[d] No binding was observed when up to 100 nM of α-SNAP-25 monoclonal antibody 2C9B10 was passed over the surface of the CM5 sensor chip after a 10 minute association time.

[0253] To compare the six different antibodies, the on-rate (ka) and off-rate (kd) for each was normalized using a program from the BIA evaluation 4.1 software. For comparison of the on-rates, the data were first individually trimmed by deleting the re-generation portion and the injection spikes, and then normalized to a 0 to 100 scale. For comparison of the off-rate, the data were normalized to the injection stop/top point. This analysis showed that 2C9B10 had a much slower on-rate than the other antibodies (FIG. 7A), and that MC-6053 has a much faster off-rate (dissociation) that the other antibodies (FIG. 7B). The fast off-rate of MC-6053 indicates that this antibody will not perform well in the methods disclosed in the present specification because this antibody will have difficulty staying bound to the substrate antigen during the washing steps.

6. Sequencing of the epitope from isolated α-SNAP-25 monoclonal antibodies.

[0254] To determine the epitope of an isolated α-SNAP-25 monoclonal antibody that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, the polynucleotide molecule encoding the variable heavy (V_H) and variable light (V_L) chains of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by hybridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 and 3C3E2 were sequenced. mRNA was extracted and purified from each hybridoma using standard protocols and reversed transcribed into cDNA using either an oligo dT anti-sense primer or a gene-specific (murine IgG1 CH and kappa CL) anti-sense primer. Specific murine and human constant domain primers were used to amplify the cDNA by PCR after cDNA production to determine the isotype of the antibody. Degenerate V_H and V_L primers were used to amplify the variable domains from the cDNA. For 5'RACE, a homopolymeric dCTP tail was added to the 3' end of the cDNA. The heavy and light chains were then amplified with an oligo dG sense primer and a gene specific (CH/KC) anti-sense primer. PCR products included the sequence of the signal peptide, variable domains and constant domains up to the anti-sense primer. The PCR products were gel purified to remove small fragments, and cloned into a blunt or TA vector for sequencing. Five independent clones for each chain were sequenced and alignments of V_H and VL chains and consensus sequences were determined. Methods used to determine the V_H and V_L amino acid sequences are described in, *e.g.*, Roger A. Sabbadini, et al., *Novel Bioactive Lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same*, U.S. Patent Publication 2007/0281320; and Peter Amersdorfer, et al., *Molecular Characterization of Murine Humoral Immune Response to Botulinum Neurotoxin Type A Binding Domain as Assessed by Using Phage Antibody Libraries*, 65(9) Infect. Immun. 3743-3752, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. In addition, commercial services are available to sequence the variable heavy (V_H) and variable light (V_L) chains of an antibody and identify the CDR regions, see, *e.g.*, Fusion Antibodies Ltd., Northern Ireland. In one case, for the 3C1A5 V_L region, the amino acid sequence was also determined by separating the affinity purified antibody by high resolution 2DE electrophoresis and then subjecting the protein to peptide fragmentation fingerprinting analysis using high resolution nanoLC-MSMS after proteolytic digestion.

[0255] The polynucleotide sequence comprising the V_H and V_L chains of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by the hybridomas disclosed in the present specification is as follows: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 71), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO: 73), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 75), 3C1A5 V_H (SEQ ID NO: 77), 3C3E2 V_H variant 1 (SEQ ID NO: 79), 3C3E2 V_H variant 2 (SEQ ID NO: 81), 3C3E2 V_H variant 3 (SEQ ID NO: 132), 1D3B8 V_L (SEQ ID NO: 83), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 85), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 87), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 89), and 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 91). The amino acid sequence comprising the V_H and V_L chains of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by the hybridomas disclosed in the present specification is as follows: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 72), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO: 74), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 76), 3C1A5 V_H (SEQ ID NO: 78), 3C3E2 V_H variant 1 (SEQ ID NO: 80), 3C3E2 V_H variant 2 (SEQ ID NO: 82); 3C3E2 V_H variant 2 (SEQ ID NO: 133), 1D3B8 V_L (SEQ ID NO: 84), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 86), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 88), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 90), and 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 92). The

amino acid sequences comprising the V_H and V_L CDR domains of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by the hybridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, and 3C3E2 are given in Table 23.

Table 23. CDR Sequences of V_H and V_L domains from α-SNAP-25 Monoclonal Antibodies

CDR	Sequence	Identified In	SEQ ID NO:
V_H CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5	93
V_H CDR 1	TFTNYVIH	3C3E2	94
V_H CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V_H CDR 2	YLFPGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5	97
V_H CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C3E2	98
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V_H CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5	100
V_H CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
V_H CDR 3	ARMDY	3C3E2var1	102
V_H CDR 3	ARMGY	3C3E2var2	134
V_H CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C3E2var3	135
V_L CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
V_L CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
V_L CDR 1	KSSQSLLYTNGKTYLT	2E2A6	105
V_L CDR 1	KSSQSLLNTNGKTYLT	3C1A5	106
V_L CDR 1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
V_L CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
V_L CDR 2	NAKSLAE	2C9B10	109
V_L CDR 2	LVSELDS	2E2A6	110
V_L CDR 2	LVSKLDS	3C1A5	111
V_L CDR 2	YASQSIS	3C3E2	112
V_L CDR 3	FQGSHVPPT	1D3B8	113
V_L CDR 3	QHHYGTPYT	2C9B10	114
V_L CDR 3	LQSAHFPFT	2E2A6	115
V_L CDR 3	LQSSHFPFT	3C1A5	116
V_L CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

[0256] Non-limiting examples of amino acid sequences comprising V_H CDR domain variants of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by the hybridomas disclosed in the present specification include V_H CDR1 variant SEQ ID NO: 118 for 1D3B8; V_H CDR1 variant SEQ ID NO: 119 for 2C9B10, 2E2A6 and 3C1A5 V_H; V_H CDR1 variant SEQ ID NO: 120 for 3C1A5 V_H and 3C3E2 variant 3; V_H CDR2 variant SEQ ID NO: 121 for 1D3B8 and 2E2A6; V_H CDR2 variant SEQ ID NO: 122 for 2C9B10 and 3C1A5 V_H; V_H CDR2 variant SEQ ID NO: 123 for 3C1A5 V_H and 3C3E2 variant 3; V_H CDR3 variant MDY for 1D3B8 and 2C9B10; V_H CDR3 variant MGY for 2E2A6 and 3C1A5 V_H; and V_H CDR3 variant SEQ ID NO: 124 for

124

3C1A5 V_H and 3C3E2 variant 3. Non-limiting examples of amino acid sequences comprising V_L CDR domain variants of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by the hybridomas disclosed in the present specification include V_L CDR1 variant SEQ ID NO: 125 for 1D3B8; V_L CDR1 variant SEQ ID NO: 126 for 2C9B10; V_L CDR1 variant SEQ ID NO: 127 for 2E2A6; V_L CDR1 variant SEQ ID NO: 128 for 3C1A5; V_L CDR1 variant SEQ ID NO: 129 for 3C3E2; V_L CDR2 variant KVS for 1D3B8; V_L CDR2 variant NAK for 2C9B10; V_L CDR2 variant LVS for 2E2A6; V_L CDR2 variant YAT for 3C1A5; and V_L CDR2 variant YAS for 3C3E2.

Example VIII

Development of α-SNAP-25 Polyclonal Antibodies that Selectively Bind a SNAP-25 Epitope Having a Free Carboxyl-terminus at the P_1 Residue of the BoNT/A Cleavage Site Scissile Bond

[0257] The following example illustrates how to make α-SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

[0258] To develop α-SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, the 10-residue peptide CGGGRIDEANQ (SEQ ID NO: 46) was designed as a SNAP-25 cleavage product antigen. This peptide comprising a N-terminal Cysteine residue for conjugation to KLH, a G-spacer flexible spacer (GGG) linked to amino acids 191-197 of human SNAP-25 (SEQ ID NO: 5) and has a carboxylated C-terminal glutamine. Blast searches revealed that this peptide has high homology only to SNAP-25 and almost no possible cross-reactivity with other proteins in neuronal cells. The sequence was also carefully scrutinized by utilizing computer algorithms to determine hydropathy index, protein surface probability, regions of flexibility, and favorable secondary structure, followed by proper orientation and presentation of the chosen peptide sequence. The peptide was synthesized and conjugated to Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) to increase immunogenicity. Before the animals were immunized, naïve rabbits were first screened against cell lysates from candidate cell lines in a Western blot in order to identify animals that had no immunoreactivity to the proteins present in the cell lysates. Two pre-screened rabbits were immunized with this peptide, and after three immunizations in about eight weeks, the rabbits were bled for testing. The blood was allowed to clot by incubating at 4 °C for 60 minutes. The clotted blood was centrifuged at 10,000x g at 4 °C for 10 minutes to pellet the cellular debris. The resulting serum sample was dispensed into 50 µL aliquots and stored at -20 °C until needed.

[0259] A similar strategy based on other SNAP-25 antigens disclosed in the present specification is used to develop α-SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. For example, the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 47 can be conjugated to KLH instead of the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 46. As another example, the amino acids 191-197 of human SNAP-25 from the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO:

38 can be replaced with SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, or SEQ ID NO: 44.

2. Screening for the presence of α-SNAP-25 polyclonal antibodies.

[0260] To determine the presence of α-SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, comparative ELISA and cell-based cleavage assays were performed using the extracted rabbit serum as described in Example III. The serum from both rabbits contained α-SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. The α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibodies were designated as NTP 22 and NTP 23.

3. Purification of α-SNAP-25 polyclonal antibodies.

[0261] To purify α-SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, NTP 22 and NTP 23 antibodies from rabbit serum were purified using affinity columns containing the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 46.

4. Evaluation of binding specificity of α-SNAP-25 polyclonal antibodies.

[0262] To evaluate binding specificity of an α-SNAP-25 polyclonal antibody that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, purified NTP 22 and NTP 23 α-SNAP-25 polyclonal antibodies were used to detect cleavage product using the cell-based activity assay, immunnocytochemistry and immunoprecipitation as described in Example III. The cell-based cleavage assay, immunocytochemistry analysis and immunoprecipitation analysis all indicated that NTP 22 and NTP 23 α-SNAP-25 polyclonal antibodies did not cross-react with uncleaved SNAP-25. Thus both NTP 22 and NTP 23 have high binding specificity for the SNAP-25_{197} cleavage product that allows for the preferential recognition of this cleavage product relative to the SNAP-25_{206} uncleaved substrate. Affinity for the antigens can be determined using SPR in the BIAcore as described in Example III.

Example IX
Component and Condition Preparation for a Sandwich ELISA

[0263] The following example illustrates how to identify and prepare the components and conditions necessary to perform a sandwich ELISA useful for conducting immuno-based methods of detecting

retargeted endopeptidase activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using an α-SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

1. Preparation of cell lysates from cells treated with re-targeted endopeptidase.

[0264] To obtain a re-targeted endopeptidase treated cell lysate for analysis, a suitable density of cells from a stock culture of Neuro-2a was seeded into a T175 flask containing 50 mL of a serum-free medium containing Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES. These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 2 to 3 days). As a control, a suitable density of cells from a stock culture of Neuro-2a was seeded into a T175 flask containing 50 mL of an appropriate growth medium (Table 1). These undifferentiated control cells were grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until 50% confluence was reached (approximately 18 hours). The media from both differentiated and undifferentiated control cultures was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample) or 10 nM of a re-targeted endopeptidase. After an overnight incubation, the cells were washed and the cells harvested by lysing in freshly prepared Triton X-100 Lysis Buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100) at 4°C for 30 minutes with constant agitation. Lysed cells were centrifuged at 4000 rpm for 20 min at 4°C to eliminate debris using a bench-top centrifuge. The protein concentrations of cell lysates were measured by Bradford assay.

2. Preparation and identification of sandwich ELISA components.

[0265] To identify an appropriate capture antibody-detection antibody pair an ECL sandwich ELISA analysis was conducted on twenty-six different combinations of capture and detection antibody pairs comprising eleven different α-SNAP-25 capture antibodies and seven different α-SNAP-25 detection antibodies (Table 12). The α-SNAP-25 antibodies used were 2E2A6 and 3C1A5 α-SNAP-25 mouse monoclonal antibodies disclosed in the present specification, SMI-81, MC-6050, and MC-6053 α-SNAP-25 mouse monoclonal antibodies disclosed in the present specification, NTP 23 α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibodies disclosed in the present specification, S9684 α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibodies (Sigma, St. Louis, MO), H-50 α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), C-18 α-SNAP-25 goat polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), N-19 α-SNAP-25 goat polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), and SP12 α-SNAP-25 mouse polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

[0266] To prepare the capture antibody solution, the α-SNAP-25 monoclonal antibodies contained in the ascites from hybridoma cell lines 2E2A6 and 3C1A5 as well as the α-SNAP-25 MC-6050 and MC-6053 monoclonal antibodies were purified using a standard Protein A purification protocol. All other α-SNAP-25 antibodies were purchased as purified antibodies.

[0267] To prepare the detection antibody solution, the appropriate α-SNAP-25 antibody was conjugated to Ruthenium(II)-tris-bipyridine-(4-methysulfonate) NHS ester labeling reagent (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). The conjugation reaction was performed by adding 30 µL of distilled water reconstituted MSD SULFO-TAG™ stock solution to 200 µL of 2 mg/mL α-SNAP-25 polyclonal antibodies and incubating the reaction at room temperature for 2 hours in the dark. The labeled antibodies were purified using a standard spin column protocol and the protein concentration determined using a standard colorimetric protein assay. The absorbance of the α-SNAP-25 antibody/MSD SULFO-TAG™ conjugate was measured at 455 nm using a spectrophotometer to determine the concentration in moles per liter. The detection antibody solution was stored at 4 °C until needed.

[0268] To prepare the solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleavage product, approximately 5 µL of the appropriate α-SNAP-25 monoclonal antibody solution (20 µg/mL in 1 x PBS) is added to each well of a 96-well MSD High Bind plate and the solution is allowed to air dry in a biological safety cabinet for 2-3 hours in order to liquid evaporate the solution. The capture antibody-bound wells were then blocked by adding 150 µL of Blocking Buffer comprising 2% Amersham Blocking Reagent (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) and 10% goat serum (VWR, West Chester, PA) at room temperature for 2 hours. Blocked plates were sealed and stored at 4 °C until needed.

[0269] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 cleavage product by ECL sandwich ELISA analysis, the Blocking Buffer from stored plates was aspirated from the wells, 25 µL of a lysate from cells treated with re-targeted endopeptidase, as described above, was added to each well and the plates were incubated at 4 °C for overnight. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 µl of 5 µg/mL detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate) was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated at room temperature at room temperature for 1 hour with shaking. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 150 µL of 1 x Read Buffer (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) was added to each well and the plates were read using a SECTOR™ Imager 6000 Image Reader (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). A ratio was calculated by dividing the signal obtained at the 10 nM dose for each antibody-pair by the signal obtained at the 0 nM dose for each antibody-pair (Table 24). These results indicated that among the twenty-six different combinations of antibody pairs tested, only three antibody

pairs had signal-to-noise ratios above 10:1 for the higher dose tested: Pair No. 1 (2E2A6 mouse mAb and S9684 rabbit pAb), Pair No. 4 (3C1A5 mouse mAb and S9684 rabbit pAb), and Pair No. 18 (S9684 rabbit pAb and 2E2A6 mouse mAb). Antibody Pair 1 was chosen for further assay development.

Table 24. Screening of α-SNAP-25 Antibody Combinations

Antibody Pair No.	Capture Antibody	Detection Antibody	Detection SNAP-25 cleavage product	Detection SNAP-25 uncleaved substrate	Signal/Noise Ratio (10 nM/0 nM)
1	2E2A6 mouse mAb	S9684 rabbit pAb	Yes	No	26.6:1
2	2E2A6 mouse mAb	N-19 goat pAb	Yes	No	7.3:1
3	2E2A6 mouse mAb	H-50 rabbit pAb	Yes	No	0.9:1
4	3C1A5 mouse mAb	S9684 rabbit pAb	Yes	No	12.1:1
5	3C1A5 mouse mAb	N-19 goat pAb	Yes	No	1.9:1
6	3C1A5 mouse mAb	H-50 rabbit pAb	Yes	No	0.9:1
7	C-18 goat pAb	S9684 rabbit pAb	No	No	0.8:1
8	C-18 goat pAb	N-19 goat pAb	No	No	0.9:1
9	C-18 goat pAb	H-50 rabbit pAb	No	No	0.9:1
10	H-50 rabbit pAb	2E2A6 mouse mAb	Yes	No	0.9:1
11	H-50 rabbit pAb	C-18 goat pAb	No	No	1.0:1
12	N-19 goat pAb	2E2A6 mouse mAb	Yes	No	0.9:1
13	N-19 goat pAb	C-18 goat pAb	No	No	1.1:1
14	NTP 23 rabbit pAb	N-19 goat pAb	Yes	No	1.2:1
15	NTP 23 rabbit pAb	C-18 goat pAb	No	No	1.1:1
16	NTP 23 rabbit pAb	SP12 mouse pAb	Yes	No	1.3:1
17	NTP 23 rabbit pAb	H-50 rabbit pAb	Yes	No	1.1:1
18	S9684 rabbit pAb	2E2A6 mouse mAb	Yes	No	21.3:1
19	S9684 rabbit pAb	C-18 goat pAb	No	No	0.7:1
20	S9684 rabbit pAb	SMI-81mouse mAb	Yes	Yes	1.2:1
21	SMI-81 mouse mAb	S9684 rabbit pAb	Yes	Yes	1.1:1
22	SMI-81 mouse mAb	N-19 goat pAb	Yes	Yes	1.0:1
23	SMI-81 mouse mAb	C-18 goat pAb	No	No	0.8:1
24	SP12 mouse pAb	C-18 goat pAb	No	No	1.0:1
25	MC-6050 mouse mAb	S9684 rabbit pAb	Yes	Yes	5.0:1
26	MC-6053 mouse mAb	S9684 rabbit pAb	Yes	Yes	7.1:1

Example X

Immuno-Based method of Detecting Re-targeted Endopeptidase Having a BoNT/A Light Chain Enzymatic Activity Using ECL Sandwich ELISA

[0270] The following example illustrates immuno-based methods of detecting retargeted endopeptidase activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using an α-SNAP-25 monoclonal antibody specific for a

129

SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond by ECL sandwich ELISA.

[0271] To prepare a lysate from cells treated with a re-targeted endopeptidase having BoNT/A light chain enzymatic activity, a suitable density of cells from an established cell line was plated into the wells of 96-well tissue culture plates containing 100 µL of the appropriate media. These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for about 24 hours. The media from the cells was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample) or one of the doses determined from a dose-response experiment for that re-targeted endopeptidase. After 24 hours incubation, the cells were washed and harvested.

[0272] To prepare the α-SNAP-25 capture antibody solution, the α-SNAP-25 monoclonal antibody contained in the ascites from hybridoma cell line 2E2A6 was purified using a standard Protein A purification protocol To prepare the α-SNAP-25 detection antibody solution, α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibody S9684 (Sigma, St. Louis, MO) was conjugated to Ruthenium(II)-tris-bipyridine-(4-methysulfonate) NHS ester labeling reagent (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). The conjugation reaction, purification of labeled α-SNAP-25 antibody, concentration determination and storage were as described in Example VI.

[0273] To prepare the solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleaved product, approximately 5 µL of α-SNAP-25 monoclonal antibody 2E2A6 solution (20 µg/mL in 1 x PBS) was added to each well of a 96-well MSD High Bind plate and the solution is allowed to air dry in a biological safety cabinet for 2-3 hours in order to liquid evaporate the solution. The capture antibody-bound wells were then blocked and used directly to detect retargeted endopeptidase activity.

[0274] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by ECL sandwich ELISA analysis, the Blocking Buffer from stored plates was aspirated from the wells, 25 µL of a lysate from cells treated with re-targeted endopeptidase was added to each well and the plates were incubated at 4 °C for overnight. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 µL of 5 µg/mL detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate) was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated at room temperature at room temperature for 1 hour with shaking. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 150 µL of 1 x Read Buffer (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) was added to each well and the plates were read using a SECTOR™ Imager 6000 Image Reader (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). The collected data was analyzed and the EC_{50} calculated as described in Example VI. For opioid re-targeted

endopeptidases, these results indicated that on average 1.0 nM of Noc/A at the EC_{50} was detected (a range of about 0.3 nM to about 2.0 nM) with a signal-to-noise ratio for the lower asymptote of about 15:1 to about 20:1 and a signal-to-noise ratio for the upper asymptote of about 180:1 to about 300:1.

Example XI

Immuno-Based method of Detecting re-targeted endopeptidase Activity Using CL Sandwich ELISA

[0275] The following example illustrates immuno-based methods of detecting retargeted endopeptidase activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using an α-SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond by CL sandwich ELISA.

[0276] Lysate from cells treated with a re-targeted endopeptidase and the α-SNAP-25 capture antibody solution will be prepared as described in Example VII.

[0277] To prepare the α-SNAP-25 detection antibody solution, α-SNAP-25 polyclonal antibody S9684 (Sigma, St. Louis, MO) will be conjugated to Horseradish peroxidase (HRP) according to the manufacturer's instructions (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). The conjugation reaction will be performed by adding to 500 µL of 1 mg/mL α-SNAP-25 polyclonal antibodies to a vial containing lyophilized activated peroxidase, mixing the components, and then adding 10 µL of sodium cyanoborohydride. This reaction mixture will be incubated at room temperature for 1 hour in a fume hood. After quenching the reaction, the labeled antibodies will be purified using a standard spin column protocol and the protein concentration will be determined using a standard colorimetric protein assay. The absorbance of the α-SNAP-25 polyclonal antibody/HRP conjugate will be measured at 455 nm using a spectrophotometer to determine the concentration in moles per liter. The α-SNAP-25 detection antibody solution will be stored at 4 °C until needed.

[0278] To prepare the solid phase support comprising the α-SNAP-25 capture antibody that is specific for the SNAP-25 cleaved product, approximately 100 µL of α-SNAP-25 monoclonal antibody 2E2A6 solution (1 mg/mL in 1 x PBS) will be added to each well of a 96-well Greiner white plate and the plates will be incubated at 4 °C overnight, and then any excess antibody solution will be discarded. The capture antibody-bound wells will then be blocked by adding 150 µL of Blocking Buffer comprising 2% Amersham Blocking Reagent (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) and 10% goat serum (VWR, West Chester, PA) at room temperature for 1 hour. The blocking buffer will be discarded and the plates will be blotted dry on paper towels by inverting and tapping. The capture antibody-bound wells will then be blocked and will be used directly to detect retargeted endopeptidase activity.

[0279] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by CL sandwich ELISA analysis, 50 µL of a lysate from cells treated with retargeted-endopeptidase will be added to each well, the plate will be

sealed, and the sealed plate will be incubated on a shaker rotating at 500 rpm at 4 °C for 2-4 hours to overnight. Plate wells will be washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µl 1 x PBS, 0.05 % TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 100 µL of 1 mg/mL α-SNAP-25 polyclonal antibody/HRP detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate) will be added to each well, the plate will be sealed, and the sealed plate will be incubated on a shaker rotating at 650 rpm at room temperature for 1 hour. After detection antibody incubation, the wells will be washed three times with 200 µl 1 x PBS, 0.05% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 100 µl of SuperSignal ELISA Pico 1:1 mixture (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) will be added to each well and the plates will be read using a luminometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 395 nm. The collected data will be analyzed and the EC_{50} will be calculated as described in Example VI.

Example XII

Immuno-Based method of Detecting re-targeted endopeptidase Activity Using Multiplex ECL Sandwich ELISA

[0280] The following example illustrates multiplex immuno-based methods of detecting retargeted endopeptidase activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using an α-SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 cleavage product and a second antibody pair for a different protein.

[0281] A re-targeted endopeptidase potency assay can be performed using a multiplex ECL sandwich ELISA. Such an assay is described in companion patent application Ester Fernandez-Salas, et al., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, U.S. Patent Application Serial No: 12/403,531, which is hereby incorporated by reference in its entirety, and can be used using the cell lines and re-targeted endopepitases and the corresponding cell lines disclosed in the present specification.

Example XIII

Immuno-Based method of Detecting re-targeted endopeptidase Activity Using Multiplex EC Sandwich ELISA

[0282] The following example illustrates multiplex immuno-based methods of detecting retargeted endopeptidase activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using an α-SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 cleavage product and a second antibody pair for a different protein.

[0283] A re-targeted endopeptidase potency assay can be performed using a multiplex EC sandwich ELISA. Such an assay is described in companion patent application Ester Fernandez-Salas, et al., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, U.S. Patent Application Serial No:

12/403,531, which is hereby incorporated by reference in its entirety, and can be used using the cell lines and re-targeted endopepitases and the corresponding cell lines disclosed in the present specification.

Example XIV

Immuno-Based Method to Detect Nanomolar Amounts of Retargeted Endopeptidases

[0284] The following example illustrates how to perform immuno-based methods of detecting Nanomolar amounts of retargeted endopeptidase activity.

1. Immuno-based method of detecting Retargeted Endopeptidases using ECL sandwich ELISA.

[0285] To prepare a lysate from cells treated with a retargeted endopeptidase, approximately 50,000 to 150,000 cells from an established cell line suitable for the assay were plated into the wells of 96-well tissue culture poly-D-lysine plates containing 100 µL of the appropriate media (see Examples I and II). These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for 24 hours. The media from the cells was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample) and the appropriate dose response as described for each retargeted endopeptidase in this application. After a 24 hour incubation, the cells were washed and harvested or incubated for an additional two days without retargeted endopeptidase before harvesting. To harvest the cells, the medium was aspirated, washed with 1 x PBS, and lysed by adding 30 µL of Lysis Buffer comprising 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100 to each well, and the plate incubated on a shaker rotating at 500 rpm for 30 minutes at 4 °C. The plate was centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes at 4 °C to pellet cellular debris and the supernatant was transferred to a capture antibody coated 96-well plate to perform the detection step.

[0286] The α-SNAP-25 capture antibody solution, the α-SNAP-25 detection antibody solution, and the solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleaved product were prepared as described in Example VII.

[0287] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by ECL sandwich ELISA analysis, the Blocking Buffer from stored plates was aspirated, 25-30 µL of a lysate from cells treated with retargeted endopeptidase was added to each well and the plates were incubated at 4 °C for either 2 hours or 24 hours. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 µL of 5 µg/mL α-SNAP-25 detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate) was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated at room temperature for 1 hour with shaking. After α-SNAP-25 detection antibody incubation, the wells were washed three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, the plates were processed,

collected data was analyzed, and the EC_{50} calculated as described in Example VI. These results indicated that on average 1.0 nM of Noc/A at the EC_{50} was detected when using SK-N-DZ clonal cell line #3 cells (a range of about 0.3 nM to about 2.0 nM) with a signal-to-noise ratio for the upper asymptote of about 20:1 to about 300:1. Moreover, on average 3.7 nM of Noc/A at the EC_{50} was detected when using AGN P33 clonal cell line #6 cells (a range of about 2.0 nM to about 5.5 nM) with a signal-to-noise ratio for the upper asymptote of about 20:1 to about 500:1. For the SK12 cells that are specific for the retargeted endopeptidase containing a dynorphin A ligand, on average 8.4 nM of Dyn/A at the EC_{50} was detected when using SK12 cells (a range of about 4.5 nM to about 10.0 nM) with a signal-to-noise ratio for the upper asymptote of about 10:1 to about 20:1. Additionally, on average 8.8 nM of TVEMP-galanin at the EC_{50} was detected when using Neuro-2a clonal cell line #7 cells (a range of about 5.0 nM to about 15.5 nM) with a signal-to-noise ratio for the upper asymptote of about 20:1 to about 200:1. This method can also be performed in a multiplex fashion as described in Example IX.

2. Immuno-based method of detecting retargeted endopeptidases using CL sandwich ELISA.

[0288] Lysate from cells treated with a retargeted endopeptidase and the α-SNAP-25 capture antibody solution will be prepared as described in Example VII. The α-SNAP-25 detection antibody solution and solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleaved product will be prepared as described in Example VIII.

[0289] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by CL sandwich ELISA analysis, 100 µL of a lysate from cells treated with a retargeted endopeptidase will be added to each well, the plate will sealed, and the sealed plate will be incubated on a shaker rotating at 500 rpm at 4 °C for either 2 hours or 24 hours. Plate wells will be washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µL 1 x PBS, 0.05 % TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 100 µL of 1 mg/mL α-SNAP-25 polyclonal antibody/HRP detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate) will be added to each well, the plate will be sealed, and the sealed plate will be incubated on a shaker rotating at 650 rpm at room temperature for 1 hour. After detection antibody incubation, the wells will be washed three times with 200 µL 1 x PBS, 0.05% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 100 µL of SuperSignal ELISA Pico 1:1 mixture (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) will be added to each well and the plates will be read using a luminometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 395 nm. The collected data will be analyzed and the EC_{50} will be calculated as described in Example VI. This method can also be performed in a multiplex fashion as described in Example IX.

Example XV

Immuno-Based Method to Detect Neutralizing α-retargeted-endopeptidase Antibodies

[0290] The following example illustrates how to perform an immuno-based method that can detect the presence of neutralizing α-Noc/A antibodies.

[0291] Noc/A, is currently being evaluated for treating painful conditions, some of them chronic. With repeated long-term treatment of Noc/A, a patient may develop neutralizing α-Noc/A antibodies to the retargeted endopeptidase leading to immunoresistance. Neutralizing α-Noc/A antibodies will inhibit retargeted endopeptidase activity by stopping the retargeted endopeptidase's uptake into neuronal and other target cells by binding to the targeting ligand and/or the translocation domain (H_N) of the retargeted endopeptidase. There is not established assay to determine the presence of the neutralizing α-Noc/A antibodies in patient's blood. It would be more cost and time efficient if a cell-based assay could be developed to detect neutralizing antibodies in patients treated with retargeted endopeptidases.

[0292] To detect the presence or absence of neutralizing α-Noc/A antibodies, the immuno-based methods of determining retargeted endopeptidase activity disclosed in the present specification can be used. One way is to determine the amount of SNAP-25 cleavage product present after treatment with various concentrations of Noc/A using a Western blot detection method, the other way was to use an ECL sandwich ELISA detection method.

[0293] To prepare a sample comprising neutralizing α-Noc/A antibodies, serum was isolated from blood of a monkey immunized with Noc/A and the antibodies were affinity purified. Rabbits were also immunized with the nociceptin variant peptide, the targeting ligand present in the Noc/A molecule, their serum collected, and the antibodies affinity purified (anti-nociceptin polyclonal antibodies).

[0294] To prepare a lysate from cells treated with a sample comprising Noc/A, SK-N-DZ clonal cell line #3 cells and AGN P33 clonal cell line #6 cells were seeded in poly-D-lysine 96-well plates for 16-18 hours. Anti-nociceptin pAb at 0-3 µg/mL was diluted in RPMI SFM (with N2, B27, and NGF supplements) containing 1 nM of Noc/A and the mix was pre-incubated at room temperature for 1 hour. Then the solutions were added to the cells and incubated for 24 h before performing the ECL ELISA assay. This anti-nociceptin variant antibody totally blocked 1 nM Noc/A uptake at 1 µg/mL (>90% inhibition) on both cell lines. Anti-Noc/A monkey polyclonal antibody was also assayed these cell lines. Cells were plated in a 96-well poly-D-lysine plate at 100,000 cells per well for 24 hours in RPMI growth media supplemented with N2, B27, and NGF. Anti-Noc/A polyclonal antibodies at 0-20 µg/mL was diluted in media containing 1 nM Noc/A and the mix was pre-incubated at room temperature for 1 h. Then the mix was added to the cells and incubated for 24 h before performing the ECL ELISA assay. Up to 60% inhibition was seen at the higher concentrations of 6-20 µg/mL of anti-Noc/A pAb on the SK-N-DZ cell line and about 30% on the AGN P33 clonal cell line #6 cell line. This may due to the fact that the anti-Noc/A polyclonal antibodies is not specific to the binding site and contains other antibodies that bind other parts of the molecule producing only partial blocking at the concentrations tested. Higher concentrations maybe needed to achieve complete blocking.

[0295] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by Western blot analysis, the media will aspirated from each well, the cells suspended in 50 µL of SDS-PAGE loading buffer, and then heated to 95 °C for 5 minutes. An aliquot from each harvested sample will be analyzed by Western blot as described in Example I, except that harvested samples will be separated by SDS-PAGE using 12 % 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the rabbit polyclonal α-SNAP-25_{197} antibody serum will be used as the primary antibody (see Example V). The results will reveal the lowest concentration of retargeted endopeptidase that will produce a detectable band of SNAP-25 cleavage product in the Western blot.

[0296] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by ECL Sandwich ELISA, the media was removed from each well and the cells were lysed as described in Example VI. The α-SNAP-25 capture antibody solution, the α-SNAP-25 detection antibody solution, and the α-SNAP-25 solid phase support were prepared as described in Example VIII. Supernatants were transferred to the α-SNAP-25 solid phase support and an ECL sandwich ELISA assay was performed as detailed in Example VI. The collected data was analyzed and the EC_{50} calculated as described in Example VI, except that the EC_{50} is the serum dilution needed to inhibit the activity of the retargeted endopeptidase to ½ its maximum and the ratio of maximal signal ($Signal_{Max}$) to minimum signal ($Signal_{Min}$) was obtained by dividing the SNAP-25 cleavage product signal obtained with the highest dilution of antibody by the signal obtained with the lowest antibody dilution.

[0297] The results indicate that the presence of neutralizing α-Noc/A antibodies in monkey serum and the presence of α-nociceptin variant antibodies from rabbit could be detected. The activity of the Noc/A molecule incubated in affinity purified antibodies from the immunized animal decreased as the antibody dilution decreased. The same assay will be performed with the Dyn/A and the TVEMP-galanin compounds utilizing the cell lines specific for each compound to be tested.

Example XV

Development of a cell-based assay for a galanin re-targeted endopeptidase

[0298] The following example illustrates how to identify established cell lines possessing the re-targeted endopeptidase uptake capacity required to develop a cell-based potency assay.

1. Growth of Stock Culture of candidate cell lines.

[0299] To grow the cell lines, a suitable density of cells from the cell line being tested were plated in a 162 cm^2 tissue culture flask containing 30 mL of a suitable growth medium (see Table 25), and grown in a 37 °C incubator under 5% or 10% carbon dioxide until cells reached the desired density.

136

Table 25. Summary table of all cell lines and their respective media.		
Cell type; description; source	**Complete Media (CM) All from Invitrogen (unless otherwise specified)**	**Serum Free media (SFM) All from Invitrogen, (unless otherwise specified)**
SiMa (Human neuroblastoma cell line, DSMZ# ACC 164, Braunschweig, Germany) SiMa H1 (cloned cell line from SiMa cells)	RPMI 1640 (90 %) Fetal Bovine Serum (FBS, 10 %) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), Sodium Pyruvate (1 mM) Penicillin (100 U per ml) Streptomycin (100 µg per ml),	RPMI 1640 (90 %) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), Sodium Pyruvate (1 mM) Penicillin (100 U per ml) Streptomycin (100 µg per ml) N2 supplement (1x) B27 supplement (1x)
Neuro-2a (Mouse neuroblastoma : (ATCC#CCI131, Manassas, VA,)	Earle's MEM (90 %) Fetal Bovine Serum 10 %) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), Sodium Pyruvate (1 mM), Penicillin (100 U per ml), Streptomycin (100 µg per ml)	EMEM (90 %) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), Sodium Pyruvate (1 mM), Penicillin (100 U per ml), Streptomycin (100 µg per ml)
PC-12 Rat Pheochromocytoma (ATCC # CRL-1721)	RPMI 1640 (90 %) Dialyzed FBS (5 %) Horse serum (10 %) HEPES (10 mM) Sodium Pyruvate (1 mM) D-glucose (0.5 % ,Sigma) Penicillin (100 U per ml); Streptomycin (100 µg per ml) N2 supplement (1x)	*Differentiation media* : RPMI 1640 (90 %) HEPES (10 mM) Sodium Pyruvate (1 mM) D-glucose (0.5 % ,Sigma) Penicillin (100 U per ml); Streptomycin (100 µg per ml) N2 supplement (1x) Bovine serum albumin (0.2 % w/v) NGF (50 ng per ml, Promega)
P19 Mouse embryonic carcinoma (ATCC #CRL-1825)	Alpha MEM (90 %) Bovine Calf Serum (7.5 %) FBS (2.5 %) Penicillin (100 U per ml); Streptomycin (100 µg per ml)	Alpha MEM (90 %) FBS (2.5 %) Penicillin (100 U per ml); Streptomycin (100 µg per ml)
NEAA: Non-Essential Amino Acids, MEM: Minimum Essential Media. DMEM: Dulbecco's MEM. EMEM- Earle's MEM. Please note PC-12 cells were differentiated in differentiation media and not SFM.		

2. Screening of commercial cell lines for sensitivity to galanin TVEMP-galanin compounds

[0300] Commercial cell lines were screened for their sensitivity to TVEMP-galanin compounds as measured by the cleavage of SNAP25 after treatment with the corresponding compounds. Various TVEMP-galanin compounds were used for screening and testing. PC-12, Neuro-2a, SIMa, and P19 cells were plated in serum free media for three days or in CM for one day. These differentiated and naïve cells were treated for 18 hours with TVEMP-galanin Batch A at concentrations of 0 and 75 nM. TVEMP-galanin Batch A showed activity in both PC-12 and Neuro-2a cells as seen by the increased presence of cleaved SNAP25, and Neuro-2a cells in the differentiated condition are more sensitive to TVEMP compounds with galanin ligand, than the naïve cells. The rank order in activity of the cells shows PC-12

have the most activity, followed by Neuro-2a and finally SiMa cells. It was necessary to determine if the uptake was specific for these galanin-retargeted compounds and therefore it was important to test the cells with other compounds that do not contain the galanin ligand. Noc/A is a retargeted compound which contains a nociceptin variant ligand, and LH_N/A (a negative control) a compound that lacks the binding domain. The uptake of LH_N/A is non-specific and should have significantly lower activity than the TVEMP-galanin compound if the cell line possess specific uptake for the retargeted compund. The Noc/A compound has been shown previously to have specific uptake in the SiMa cells and will be used as a baseline to test the cell lines. A favorable cell line should have low uptake of the LH_N/A and the Noc/A compound and high uptake of the TVEMP-galanin compound. Table 26 displays the results from this experiment.

Table 26. Screening of PC-12, Neuro-2a, and SiMa cells at different conditions using TVEMP-galanin.

		TVEMP-galanin Batch A	TVEMP-galanin Batch B	LH_N/A	Noc/A
Conc. (mg/mL)		0.168	0.175	1.63	1.00
EC_{50} Values (nM)	PC-12, naïve	73.4 ± 10.7	105.6 ± 16.0	>200	72.9 ± 26.9
	SiMa, naïve	138.6 ± 43.9	133.8 ± 24.2	>300	48.3 ± 18.1
	Neuro-2a, naïve	122.4 ± 15.7	116 ± 17.5	>200	>150
	SiMa, Dif O/N	>400	>150	>400	16.1 ± 11.9
	Neuro-2a Dif 4 d		34.5 ± 7.5	39.7 ± 5.6	105.9 ± 44.3
	SiMa, Dif 4 d	101.8 ± 20.5	65.3 ± 7.8	>150	88.7 ± 23.3

TVEMP-galanin Batches A and B, and LH_N/A and Noc/A controls testing on various cell lines and growth /differentiation conditions. Summary chart showing details of each compound tested plus EC_{50} values.

[0301] The results show that TVEMP-galanin Batch A and TVEMP-galanin Batch B had plots or EC_{50} values that were either similar to, or only 1-2 fold more active than the negative controls in the cell lines tested. This data implies that the native cells are not sensitive enough and that these cells will have to be transfected with the plasmids encoding galanin receptor proteins GalR1 or GalR2 receptors.

3. *Stable transfection of PC-12, Neuro-2a, and SiMa cells with GalR.*

[0302] One day before transfection, cells were seeded at densities of 0.5 x 10^6 cells/well in either a 6-well Collagen IV coated plate (Cat#354554: BD Biosciences) (SiMa, PC-12) or a 6 well Costar plate (Cat# 3516: Corning) (Neuro-2a). Transfections were performed by diluting 12 µl of Lipofectamine™ 2000 (Cat # 52758, Invitrogen) in 250 µl Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Cat# 3195, Invitrogen) followed by incubation at room temperature for 5 min. Four micrograms of GalR plasmid DNA was mixed with 0.4 µg pAdVantage™ vector (1 mg per ml, Cat#E1711, Promega) in 250 µl Opti-MEM® I Reduced Serum Media for 5 minutes. After 5 minutes of incubation, the diluted Lipofectamine™ 2000 and the diluted plasmids DNA were mixed and incubated for an additional 20 min at room temperature, for complex formation. In the meantime, the cells were washed with OPTI-MEM® and 0.5 ml OPTI-MEM® was added to each well.

After the 20 minute incubation, 0.5 ml containing the complexes of diluted Lipofectamine™ 2000 and diluted plasmids DNA was carefully added to the wells containing cells in 0.5 ml OPTI-MEM®. The plate was incubated at 37 °C for 5 hours, after which 1 ml of complete media was added. The next day, the medium was replaced with growth media for 48 hours. On day 4, after cells were recovered from the transfection, the growth media was replaced with fresh growth media containing Geneticin® (Cat #10131: Invitrogen) at 0.5 mg per ml (1:100 dilution) and incubated for an additional 3 days. On day 7 post transfection, the cells were transferred to a 75 cm Collagen IV flask (Cat# 35423: BD Biosciences) containing growth medium and geneticin (0.5 mg per ml, 1:100 dilution). On this transfer, approximately 90 % of the cells were dead and were removed during the media change. Growth media containing geneticin (0.5 mg per ml, 1:100 dilution) was changed every two days till day 21.

[0303] For the selection of stable cells able to take up galanin TVEMP compounds, the parameters were to screen for clones that produced the highest percentage of SNAP25 cleavage with TVEMP-galanin treatment in the ECL Sandwich ELISA using monoclonal 2E2A6 coated plates for capture and polyclonal SNAP25 (Sigma Cat # S9684) sulfotagged antibody for detection. The EC_{50} values in Table 27 show that TVEMP-galanin Batch D exhibits at least 10-fold greater uptake than the negative control in the SiMa and Neuro-2a cells transfected with GalR1 and GalR2, and only 2-4 fold greater uptake in transfected PC-12 cells. Since the PC-12 transfected cells seem to have lower sensitivity and specificity than the SiMa and Neuro-2a cells they will not be cloned. Also, since the galanin 1-16 mer ligand in the TVEMP-Galanin compounds binds to GALR1 receptor with more affinity than the GALR2, only cells transfected with GALR1 will be cloned. The figure also shows that TVEMP-galanin Batches C and D exhibit 9-10 fold greater uptake than both LH_N/A and the retargeted nociceptin compound TVEMP-nociceptin in the Neuro-2a GalR1.

Table 27. Test of stably transfected but non-clonal populations of SiMa, Neuro-2a, and PC12 transfected with GalR1 or GalR2 receptors

		TVEMP-galanin C	TVEMP-galanin D	LH_N/A	TVEMP-nociceptin
Conc. (mg/mL)		1.260	0.303	1.46	1.00
EC_{50} Values (nM)	SiMa GalR1		36.2 ± 8.6	>300	
	SiMa GalR2		26.6 ± 6.7	>300	
	PC-12 GalR1		64.1 ± 19.5	202.7	
	PC-12 GalR2		>150	>300	
	Neuro-2a GalR1	32.2 ± 3.3	40.8 ± 6.0	>300	>300
	Neuro-2a GalR2	35.2 ± 3.1	46.0 ± 6.1	>300	>300

[0304] The non-clonal selected populations are not a good population of cells to use on a regular basis because they contain a mix of cells expressing different levels of receptor and these populations can

change over time. To obtain stable cell lines derived from single cells, a dilutional cloning approach was initiated. On day 21, the transfected cells were trypsinized, needle-dissociated and counted. The remaining transfected cell lines were frozen for future use. The cells were serially diluted to 10 cells per ml in growth media containing geneticin (0.5 mg per ml, 1:100 dilution). Either 2 x 96-well Collagen IV coated plates (SiMa, PC-12) or 2 x 96-well Costar plates (Neuro-2a) were plated at 100 µl per well to achieve 1 cell per well density. The plates were returned to the incubator and left untouched for two weeks for colony formation. After two weeks (day 35), the wells were carefully checked for the presence of single colonies formed on the bottom of the well (the entire well was carefully checked for multiple colonies). When a well was identified with a single cluster of cells, that entire well was carefully scrutinized to make sure that one and only one cluster of cells was present. A picture of that single cluster was taken. If there were any queries about additional clusters, the well was not selected. On day 36, the clones that were selected were detached with TrypLE and 0.5 ml of complete media containing geneticin (0.5 mg per ml, 1:100 dilution) was added to stop the trypsin reaction. This entire volume was transferred to 6-well plates and further diluted with 3.0 ml additional complete media containing geneticin (0.5 mg per ml, 1:100 dilution). The clones were allowed to grow to 90% confluence, then trypsinized again and transferred to 75 cm Collagen IV or Costar flasks with 10.0 ml complete media containing geneticin (0.5 mg per ml, 1:100 dilution). Once the cells were 90% confluent again, the cells were used to either fill three cryovials for frozen storage or used for screening in the ELISA assay for galanin retargeted compounds.

[0305] The reference compound TVEMP-galanin Batch C was used to test these clones using two operators performing independent tests. The SiMa GalR1 clones grew slowly and were not available for testing at this time. Fortunately, the Neuro-2a clones grew faster, and soon sufficient quantities of 8 of the 12 clones were available for testing. These Neuro-2a GalR1 clonal cells were tested with a full dose range of TVEMP-galanin compounds (0-300 nM) and the results of nine of these clones is shown below. The remaining four clones grew very slowly and were not tested. The selected but non-clonal parental cells were plated along with the clones to use as a benchmark. Table 28 shows the activity of each of the eight clones together with the selected non-clonal Neuro-2a GalR1 cells, when tested with TVEMP-galanin compound. Out of the eight clones tested, only clones #4, 7 and 12 showed good uptake of the TVEMP-galanin compound with acceptable EC_{50} values. Neuro-2a GalR1clones # 1, 3 and 10 did not take up the TVEMP-galanin compound, while clones # 5, 11 and 13 together with the non-clonal population generated very high EC_{50} values and no further testing was done with these cells.

Table 28. Results of screening Neuro-2a GalR1 single-cell derived clones with the TVEMP-galanin Batch C.

		EC50 ± Std. error (nM)	
Plate	**Cell type**	**Operator 1**	**Operator 2**
1	N2A Non-clonal	82.1±9.6	92.0±10.8
1	N2A GALR1 Clone #1	>300	>300
1	N2A GALR1 Clone #3	>300	>300
1	N2A GALR1 Clone #4	39.7±3.4	39.4±6.6

2	N2A Non-clonal	211.2±167.7	116.0±26.8
2	N2A GALR1 Clone #5	202.6±82.9	113.0±18.1
2	N2A GALR1 Clone #7	23.1±3.3	15.5±1.8
2	N2A GALR1 Clone #10	>300	>300
3	N2A GALR1 Clone #7	20.3 ± 1.6	38.0±6.3
3	N2A GALR1 Clone #11	270.0±243	247.0±101
3	N2A GALR1 Clone #12	43.2±5.2	57.5±14.3
3	N2A GALR1 Clone #13	144.1±143	184.7±15.6

4. Characterization of GalR1 expression in the clonal cell lines

[0306] The screening of the clones showed that only clones # 4, 7, and 12 are more sensitive than the non-clonal cells. Messenger RNA (mRNA) was extracted from these 3 clones as well as the non-transfected parental and stably transfected non-clonal Neuro-2a cells for characterization by RT-PCR using the RT-PCR conditions described in Example V and the primers described in Table 29.

Table 29. Specific GALR1 and GALR2 primers

Name	Sequence	SEQ ID NO:
GALR1 fwd	5' ' CCCCATCATGTCATCCACCT 3'	150
GALR1 rev	5' ATGGGGTTCACCGAGGAGTT 3'	151
GALR2 fwd	5' CATCGTGGCGGTGCTTTT 3'	152
GALR2 rev	5' AGCGGGAAGCGACCAAAC 3'	153

[0307] The results in Table 30 show that the transfected non-clonal cells and clones have much greater amounts of GALR1 mRNA than the parental cells. In the TVEMP-Galanin cell screening, Clone #7 was shown to be the most sensitive to TVEMP-galanin. Clone #7 also is shown to have the highest amount of GALR1 mRNA according to Table 30. The CT values for Neuro-2a GalR1 clone 7 (Neuro-2a #7) was the lowest, followed by clone 4 and then clone 12. The non-clonals tested at this time provided a CT close to clone 12, however, these cells contain a constantly changing population of cells containing varying concentrations of GalR1 receptor, and therefore were not considered a good population for future work. Of the three clones with low EC_{50}'s, Neuro-2a clone GalR1 clone #12 (Neuro-2a # 12) grew the fastest, followed by Neuro-2a clone #7 and lastly Neuro-2a clone #4. In addition to its slow growth rate, Neuro-2a clone # 4 was not tested further because the sensitivity of Neuro-2a clone #7 was much better than for clone #4.

Table 30. Large differences in GALR1 mRNA in Neuro-2a transfected clonal cells vs. transfected non-clonal and parental cells.

Cell line	Parental	Non-Clonal	Clone 4	Clone 7	Clone 12
Ave CT	32.0	21.7	20.8	19.3	21.6

A1

fold mRNA change	1.0	1269.5	2418.7	6793.8	1332.6

5. Comparison of the sensitivity and specificity of Neuro-2a clones #7 and #12 with TVEMP-galanin compounds

[0308] The two clones were tested side-by-side in an attempt to identify the most sensitive and selective of the two, so that data could be confidently collected from the best performing clone. Table 31 shows the results of these two clones when treated with TVEMP-galanin Batch C and LH_N/A for sensitivity and selectivity respectively. Both clones exhibit high Signal-to-Noise ratios. Neuro-2a Clone #7 has an EC_{50} of 5.5 nM while the EC_{50} for Neuro-2a clone #12 is 68.4 nM. The Neuro-2a clone #12 has to be tested with a dose range of 0-300 nM, while the Neuro-2a Clone #7 can be tested with a dose range of 0-30 nM to elicit a plateau at the highest concentration used. Both clones show good separation between the LH_N/A and TVEMP-galanin Batch C, Neuro-2a Clone #12 shows some non-specific uptake at the high concentrations, while Neuro-2a Clone #7 does not. As seen in the tabulated results, the range for testing with Neuro-2a #7 cells is 10-fold lower than that for Neuro-2a #12 cells resulting in a10-fold less compound being used for Neuro-2a # 7 than Neuro-2a #12. Neuro-2a #7 is 8-fold more selective than Neuro-2a clone #12 when LH_N/A was used as a comparison. The Signal-to-Noise ratio is over 100 for both clones, however a ratio of 10 would be sufficient to develop a cell based potency assay. The EC_{50} for the Neuro-2a #7 clone is 5.5 nM about 12-fold lower than that for Neuro-2a #12, whose EC_{50} is 68.4 nM. The lower dose-range for testing, the 24-fold selectivity over LH_N/A, the high signal-to-noise ratio, the excellent sensitivity resulting in low EC_{50}, and the low amount of protein required for each test, all imply that Neuro-2a Clone #7 would be the clone to go forward with the cell-based potency assay for use in determining potency ratios for TVEMP-galanin compounds.

Table 31. Comparison of characteristics of Neuro-2a clone #7 and #12.

	Neuro-2a #7	**Neuro-2a #12**
Range	0-30 nM	0-300 nM
Selectivity	24-fold	3-fold
Signal-to-Noise ratio	190	547
Percent of max LH_N/A signal over max TVEMP-Gal signal	4.3%	37.6%
EC_{50}	5.5 nM	68.4 nM
Protein required	~ 1 µg	~ 10 µg

Neuro-2a # 7 and #12 were treated with TVEMP-galanin Batch C and LH_N/A for 16 hours in CM. Activity was detected using ECL-ELISA.

Example XVI

Generation of clonal cell lines overexpressing the KOR-1 receptor for Dynorphin A retargeted endopeptidase uptake

[0309] The following example illustrates how to characterize and compare several clonal cell lines originated from an established cell line transfected with the target receptor and subsequent cloning of the cell line. This specific example refers to the identification and characterization of clonal cell lines transfected with hKOR-1 that were first described in Example III, Table 9.

[0310] Four of the AGN P33-KOR clones (clones number 8, 9, 10, and 12 Table 9 in Example III) were selected and tested with Dyn/A with a full dose response of 0-150 nM. At the same time, two SiMa-KOR clones (clones number 12, and 16 from Table 9 in Example III) selected and tested with with Dyn/A with a full dose response of 0-150 nM. In this experiment, AGN P33-KOR clones 8, 9, and 12 produced very low uptake and were therefore discarded; AGN P33-KOR clone 10 displayed good uptake and an EC_{50} of 30.3 nM was obtained. The two SiMa-KOR clones tested displayed good uptake and an EC_{50} of 26.6 nM was obtained for clone 16 and an EC_{50} of 11.8 nM was obtained for clone 12. These three clones were then tested for sensitivity and selectivity by comparing the uptake of the target Dyn/A compound against the negative control LH_N/A that lacks a targeting ligand and the Noc/A control. The comparison of the three clones and the parental SiMa cells utilizing a full dose response of 0-150 nM is summarized in Table 32.

Table 32.

Cell Line	EC_{50} Dyn/A (nM)	EC_{50} LHN/A (nM)	EC_{50} Noc/A (nM)
SiMa Parental	> 100	> 100	5.4
AGN P33-KOR clone 10	9.7	> 150	9.4
SiMa-KOR clone 16	10.6	> 100	1.6
SiMa-KOR clone 12	4.65	>150	19.7

[0311] There was a marked increase in Dyn/A uptake in the KOR-1 transfected clones treated with Dyn/A while the parental SiMa cells showed minimal uptake of the compound (uptake was similar to the negative control LH_N/A). There is some Noc/A in all the cell lines including parental SiMa cells. This is not surprising as uptake of Noc/A in SiMa cells was observed during the assay development for this retargeted compound. Moreover, Noc/A uptake is best in the AGN P33 cell line that was specifically derived for this retargeted endopeptidase. The difference between Noc/A uptake and Dyn/A compound uptake is greater in the clonal SiMa-KOR clone 12 (SK12) cells. In all the graphs, activity of the negative control, LHN/A, is minimal, showing that in the absence of the binding domain there is no specific uptake in these cell lines and the lowest was in the SK12 cells showing that the uptake of the Dyn/A compound is highly specific. From these results, the SK12 clone was selected for future optimization and characterization.

[0312] Optimization studies were performed with the SK12 cells in order to develop a robust, specific and sensitive assay. Several parameters were assayed including plating media and plating densities,

treatment media, and treatment time. A summary of the data obtained during the optimization is provided in Table33.

Table 33.							
Medium used			Cells/well				
plating	treating	Treatment time	25000	50000	75000	100000	150000
complete	complete	6 hr + o/n	51.3	76	13.4	9.2	n/a
complete	complete	16 hr	21.3	19.0	4.96	4.64	n/a
complete	complete	16 hr	n/a	n/a	n/a	2.1	15.3
serum free	serum free	16 hr	n/a	n/a	n/a	9.0	12.1
complete	serum free	16 hr	n/a	10.3	5.4	8.97	8.38
complete	complete	16 hr	n/a	7.7	4.86	13.72	11.26
serum free	serum free	16 hr	n/a	11.2	8.5	8.4	9.2

[0313] Table B shows that cells plated at 100,000 cells per well in CM and treated with compounds in CM showed more variability in EC_{50} values from one experiment to the next (4.6; 1.2 and 13.72 nM) while cells plated at 100,000 cells per well in SFM and treated with compounds diluted in SFM provided the best curves and consistent EC_{50} values (9.0 and 8.4 nM). In future, cells would be plated at 100,000 cells per well in SFM and treated with compounds in SFM too.

[0314] SK12 plated on PDL plates at 100,000 cells per well in SFM for 24 hours, followed by treatment in SFM for 16 hours yielded the lowest EC_{50} value of 8.4 +/- 1.1 nM and a Signal-to Noise ratio of 12. Both these values would be acceptable for future use of this cell in CBPA.

Characterization of SK12 cells with the Saturation Binding Assay

[0315] The saturation Binding assay utilized here was described in detail in Example V. Saturation binding studies were performed using the KOR-1 antagonist ^{3}H-diprenorphine to evaluate binding. The total, specific, and non-specific binding were measured in several experiments. A saturation binding curve of ^{3}H-diprenorphine with the receptor was generated from two independent experiments. It appears that about 25% binding is non-specific and 75% specific binding of the molecule to the receptor. The affinity of the molecule to the receptor is adequate at 6.5 nM. The Bmax indicates that there are 23 fmol KOR-1 receptors per cell on the SK12 cells.

[0316] Unless otherwise indicated, all numbers expressing quantities of ingredients, properties such as molecular weight, reaction conditions, and so forth used in the specification and claims are to be understood as being modified in all instances by the term "about." Accordingly, unless indicated to the contrary, the numerical parameters set forth in the specification and attached claims are approximations

that may vary depending upon the desired properties sought to be obtained by the present invention. At the very least, and not as an attempt to limit the application of the doctrine of equivalents to the scope of the claims, each numerical parameter should at least be construed in light of the number of reported significant digits and by applying ordinary rounding techniques. Notwithstanding that the numerical ranges and parameters setting forth the broad scope of the invention are approximations, the numerical values set forth in the specific examples are reported as precisely as possible. Any numerical value, however, inherently contains certain errors necessarily resulting from the standard deviation found in their respective testing measurements.

[0317] The terms "a," "an," "the" and similar referents used in the context of describing the invention (especially in the context of the following claims) are to be construed to cover both the singular and the plural, unless otherwise indicated herein or clearly contradicted by context. Recitation of ranges of values herein is merely intended to serve as a shorthand method of referring individually to each separate value falling within the range. Unless otherwise indicated herein, each individual value is incorporated into the specification as if it were individually recited herein. All methods described herein can be performed in any suitable order unless otherwise indicated herein or otherwise clearly contradicted by context. The use of any and all examples, or exemplary language (e.g., "such as") provided herein is intended merely to better illuminate the invention and does not pose a limitation on the scope of the invention otherwise claimed. No language in the specification should be construed as indicating any non-claimed element essential to the practice of the invention.

[0318] Groupings of alternative elements or embodiments of the invention disclosed herein are not to be construed as limitations. Each group member may be referred to and claimed individually or in any combination with other members of the group or other elements found herein. It is anticipated that one or more members of a group may be included in, or deleted from, a group for reasons of convenience and/or patentability. When any such inclusion or deletion occurs, the specification is deemed to contain the group as modified thus fulfilling the written description of all Markush groups used in the appended claims.

[0319] Certain embodiments of this invention are described herein, including the best mode known to the inventors for carrying out the invention. Of course, variations on these described embodiments will become apparent to those of ordinary skill in the art upon reading the foregoing description. The inventor expects skilled artisans to employ such variations as appropriate, and the inventors intend for the invention to be practiced otherwise than specifically described herein. Accordingly, this invention includes all modifications and equivalents of the subject matter recited in the claims appended hereto as permitted by applicable law. Moreover, any combination of the above-described elements in all possible variations thereof is encompassed by the invention unless otherwise indicated herein or otherwise clearly contradicted by context.

[0320] Specific embodiments disclosed herein may be further limited in the claims using consisting of or consisting essentially of language. When used in the claims, whether as filed or added per amendment, the transition term "consisting of" excludes any element, step, or ingredient not specified in the claims. The transition term "consisting essentially of" limits the scope of a claim to the specified materials or steps and those that do not materially affect the basic and novel characteristic(s). Embodiments of the invention so claimed are inherently or expressly described and enabled herein.

[0321] Furthermore, numerous references have been made to patents and printed publications throughout this specification. Each of the above-cited references and printed publications are individually incorporated herein by reference in their entirety.

[0322] In closing, it is to be understood that the embodiments of the invention disclosed herein are illustrative of the principles of the present invention. Other modifications that may be employed are within the scope of the invention. Thus, by way of example, but not of limitation, alternative configurations of the present invention may be utilized in accordance with the teachings herein. Accordingly, the present invention is not limited to that precisely as shown and described.

What is claimed:

1. A method of detecting retargeted endopeptidase activity, the method comprising the steps of:

   a. treating a cell from an established cell line with a sample comprising a retargeted endopeptidase, wherein the cell from an established cell line is susceptible to retargeted endopeptidase activity by about 500 pM or less of a retargeted endopeptidase;

   b. isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus glutamine of the BoNT/A cleavage site scissile bond;

   c. contacting the SNAP-25 component with an α-SNAP-25 antibody linked to a solid phase support,

      wherein the α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus glutamine of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, the α-SNAP-25 antibody has an association rate constant for an epitope from a SNAP-25 not comprising a carboxyl-terminus glutamine of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product of less than 1×10^{1} M^{-1} s^{-1}; and the α-SNAP-25 antibody has an equilibrium disassociation constant for the epitope of less than 0.450 nM;

   d. detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus glutamine from the BoNT/A cleavage site scissile bond;

   wherein detection by the antibody-antigen complex is indicative of retargeted endopeptidase activity.

2. The method of Claim 1, wherein the SNAP-25 cleavage product is $SNAP\text{-}25_{197}$.

3. The method of Claim 1, wherein the presence of an antibody-antigen complex is detected using a sandwich ELISA.

4. The method of Claim 1, wherein the method has a signal-to-noise ratio at the lower asymptote of at least 3:1 and a signal-to-noise ratio at the upper asymptote of at least 10:1.

5. The method of Claim 1, wherein the sample comprises at most 100 pM of a retargeted endopeptidase

47

6. The method of Claim 1, wherein the cell from an established cell line is susceptible to re-targeted endopeptidase inhibition of exocytosis by about 100 pM or less of the re-targeted endopeptidase.

7. The method of Claim 1, wherein the method is performed in a singleplex fashion or a multiplex fashion.

148

ABSTRACT

[0323] The present specification discloses SNAP-25 immune response inducing compositions, methods of making α-SNAP-25 antibodies that selectively binds to an epitope comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, α-SNAP-25 antibodies that selectively bind to an epitope comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, methods of detecting retargeted endopeptidase activity, and methods of detecting neutralizing α-re-targeted endopeptidase antibodies.

FIG. 1A.

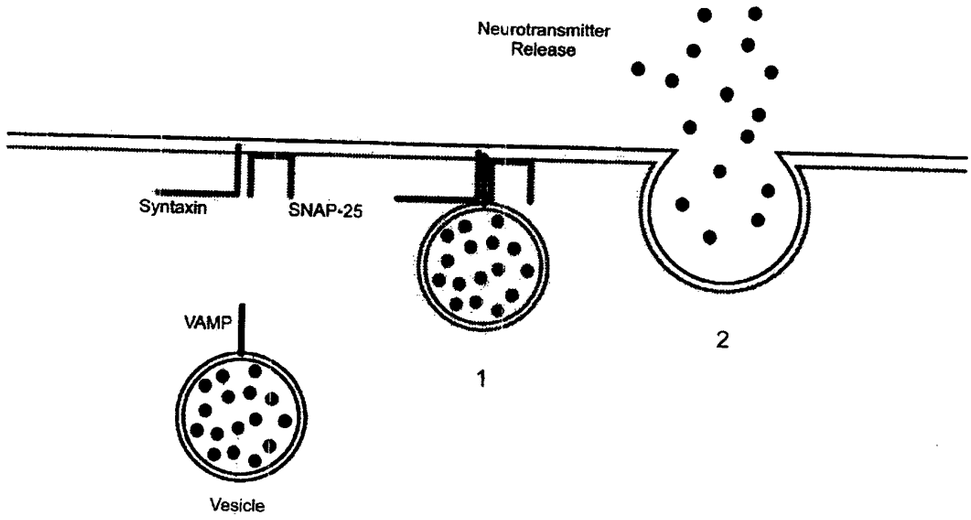

Neurotransmitter
Release
Syntaxin
SNAP-25
VAMP
Vesicle
1
2

FIG. 1B.

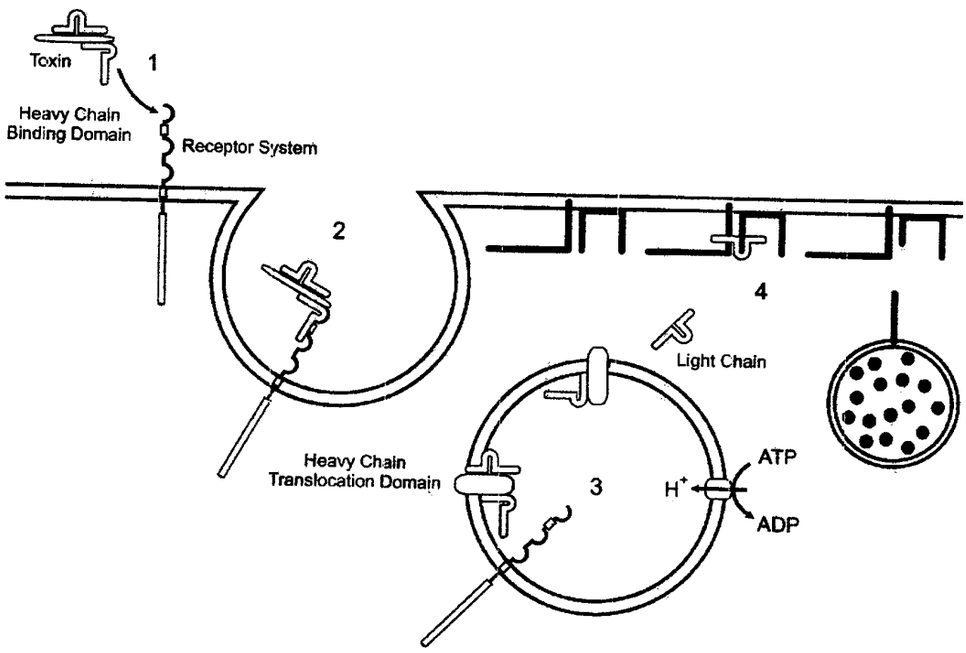

Toxin
1
Heavy Chain
Binding Domain
Receptor System
2
4
Light Chain
Heavy Chain
Translocation Domain
3
ATP
H+
ADP

FIG. 2.

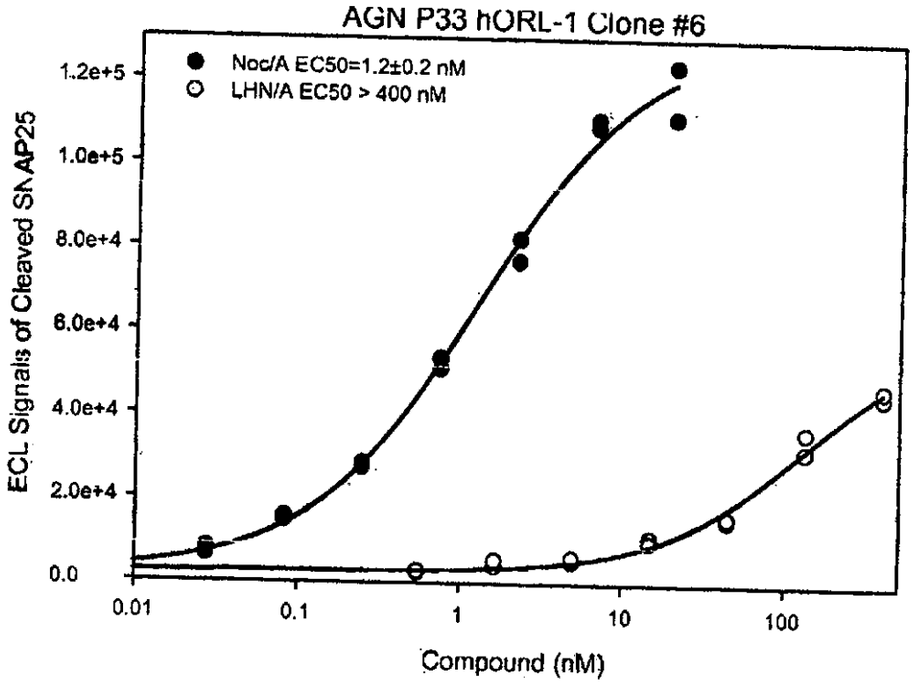

AGN P33 hORL-1 Clone #6
Noc/A EC50=1.2±0.2 nM
LHN/A EC50 > 400 nM
ECL Signals of Cleaved SNAP25
1.2e+5
1.0e+5
8.0e+4
6.0e+4
4.0e+4
2.0e+4
0.0
0.01
0.1
1
10
100
Compound (nM)

FIG. 3.

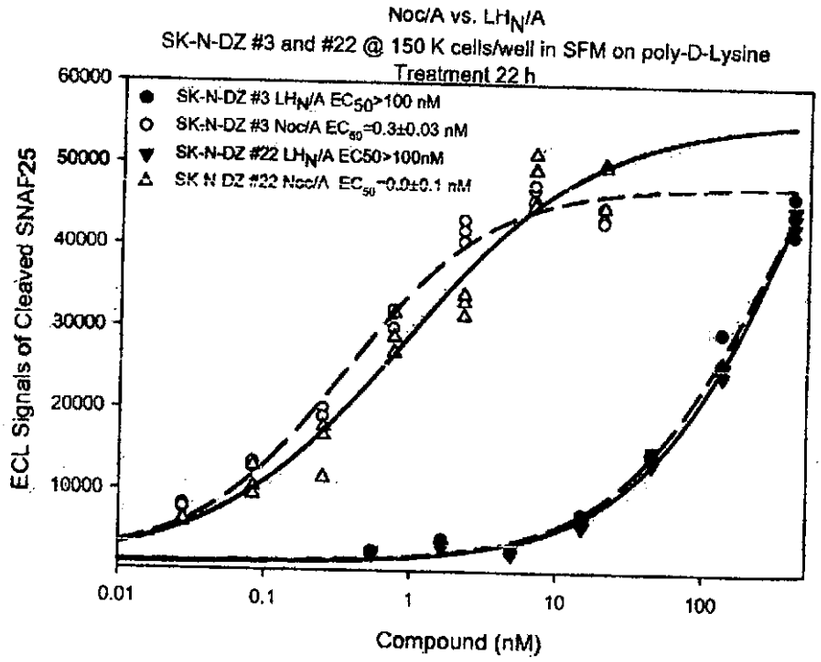
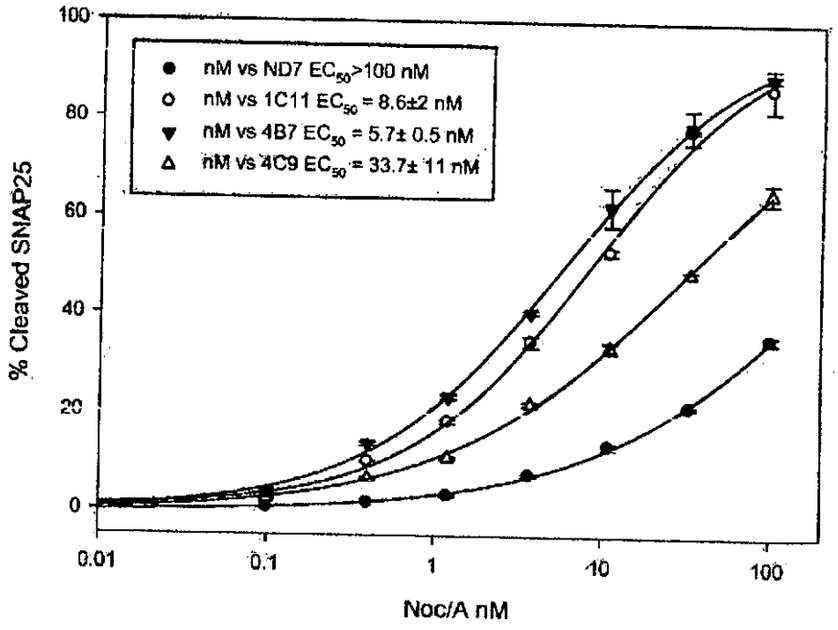

Noc/A vs. LHN/A
SK-N-DZ #3 and #22 @ 150 K cells/well in SFM on poly-D-Lysine
Treatment 22 h
SK-N-DZ #3 LHN/A EC50>100 nM
SK-N-DZ #3 Noc/A EC50=0.3±0.03 nM
SK-N-DZ #22 LHN/A EC50>100nM
SK N DZ #22 Noc/A EC50=0.0±0.1 nM
ECL Signals of Cleaved SNAP25
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0.01
0.1
1
10
100
Compound (nM)

FIG. 4.


100
80
60
40
20
0
% Cleaved SNAP25
nM vs ND7 EC50>100 nM
nM vs 1C11 EC50 = 8.6±2 nM
nM vs 4B7 EC50 = 5.7± 0.5 nM
nM vs 4C9 EC50 = 33.7± 11 nM
0.01
0.1
1
10
100
Noc/A nM

ISA

FIG. 5.

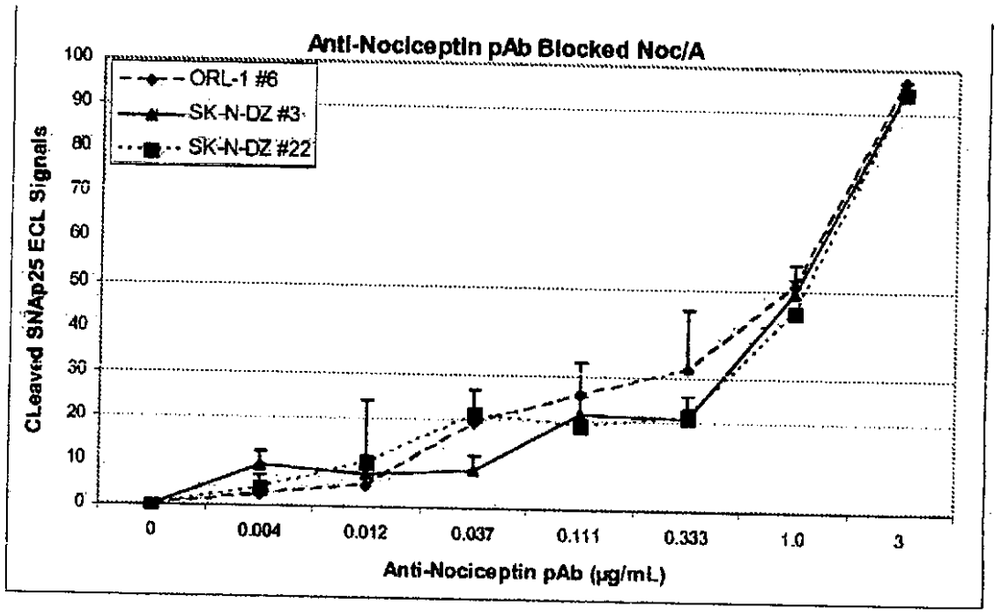

Anti-Nociceptin pAb Blocked Noc/A
ORL-1 #6
SK-N-DZ #3
SK-N-DZ #22
CLeaved SNAp25 ECL Signals
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.004
0.012
0.037
0.111
0.333
1.0
3
Anti-Nociceptin pAb (µg/mL)

FIG. 6.

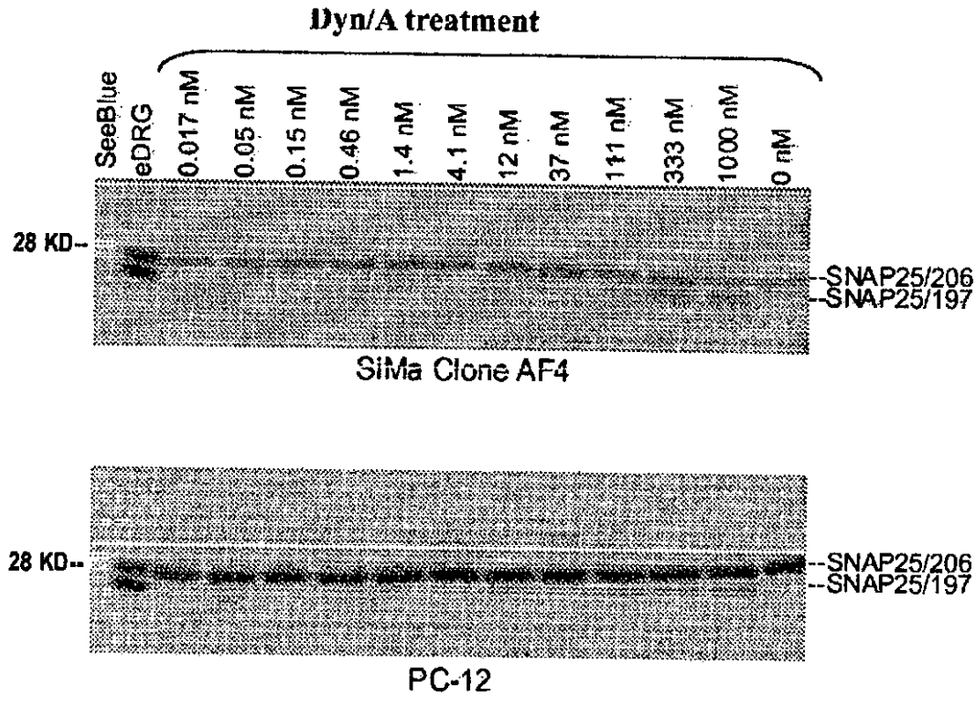

Dyn/A treatment
SeeBlue
eDRG
0.017 nM
0.05 nM
0.15 nM
0.46 nM
1.4 nM
4.1 nM
12 nM
37 nM
111 nM
333 nM
1000 nM
0 nM
28 KD--
--SNAP25/206
--SNAP25/197
SiMa Clone AF4
28 KD--
--SNAP25/206
--SNAP25/197
PC-12

FIG. 7A.

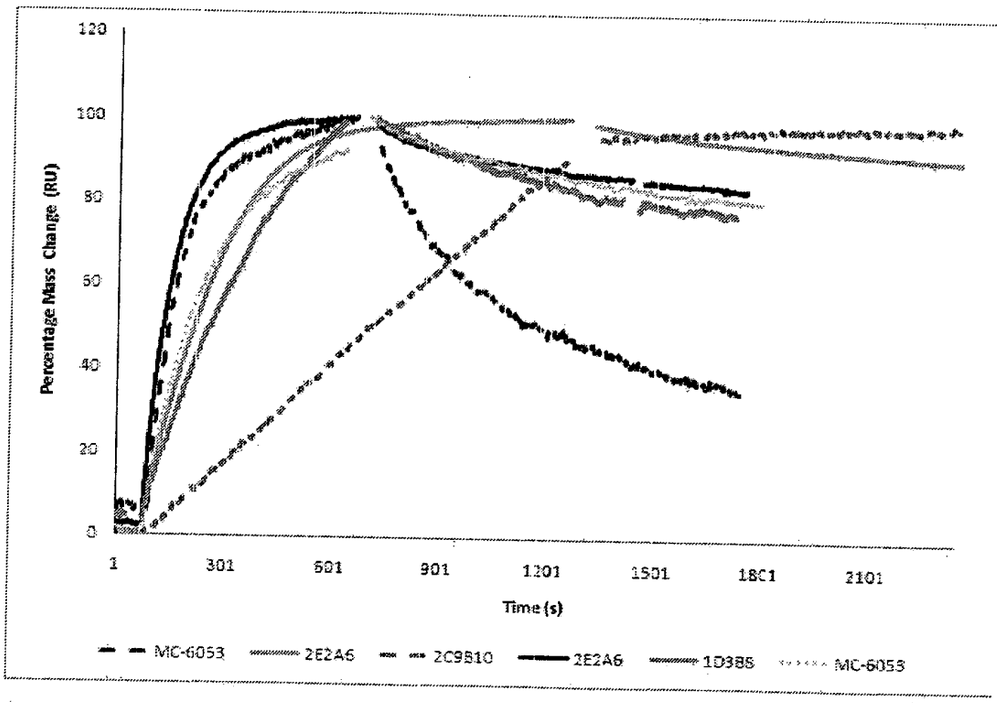
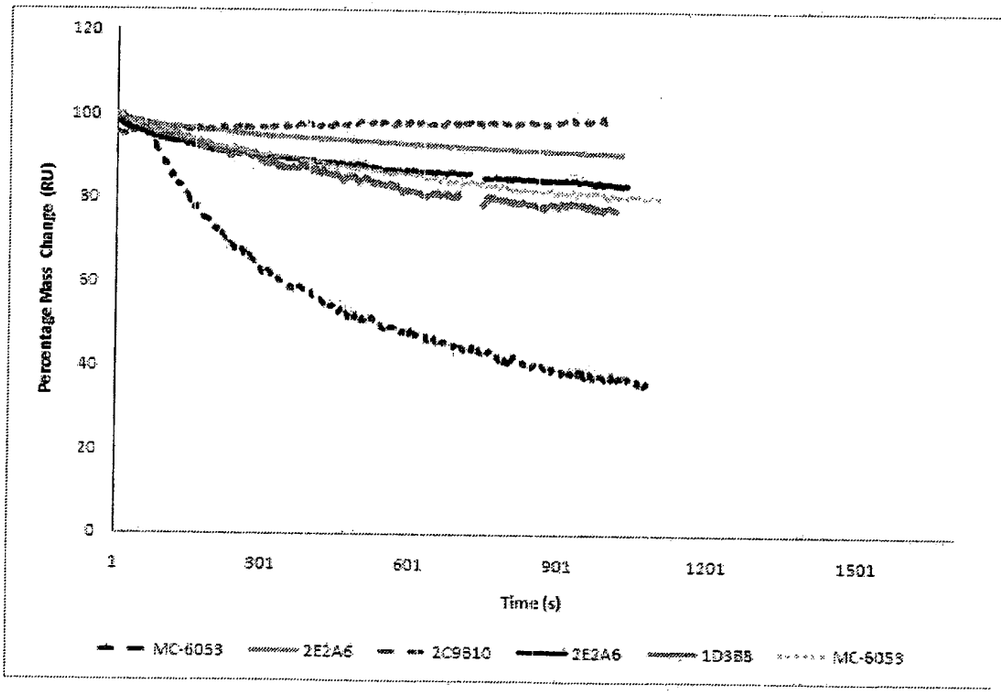

120
100
80
60
40
20
0
Percentage Mass Change (RU)
1
301
601
901
1201
1501
1801
2101
Time (s)
MC-6053
2E2A6
2C9B10
2E2A6
1D3B8
MC-6053

FIG. 7B.


120
100
80
60
40
20
0
Percentage Mass Change (RU)
1
301
601
901
1201
1501
Time (s)
MC-6053
2E2A6
2C9B10
2E2A6
1D3B8
MC-6053

158

SEQUENCE LISTING

<110> Wang, Joanne
Zhu, Hong
Hodges, D. Dianne
Fernandez-Salas, Ester

<120> Immuno-Based Retargeted Endopeptidase
Activity Assays

<130> 18496 (BOT)

<150> US 61/160,217
<151> 2009-03-13

<160> 153

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 903
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Retargeted endopeptidase

<400> 1

```
Met Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro
 1               5                  10                  15
Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln
            20                  25                  30
Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile
        35                  40                  45
Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro
    50                  55                  60
Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys
                85                  90                  95
Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr
            100                 105                 110
Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr
        115                 120                 125
Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp
    130                 135                 140
Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser
145                 150                 155                 160
Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu
                165                 170                 175
Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser
            180                 185                 190
Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn
        195                 200                 205
Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu
    210                 215                 220
Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile
225                 230                 235                 240
Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met
```

```
                245                 250                 255
Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His
            260                 265                 270
Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr
        275                 280                 285
Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys
    290                 295                 300
Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe
305                 310                 315                 320
Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val
                325                 330                 335
Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr
            340                 345                 350
Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr
        355                 360                 365
Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys
    370                 375                 380
Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu
385                 390                 395                 400
Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe
                405                 410                 415
Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu
            420                 425                 430
Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Asp Asp Asp Asp
        435                 440                 445
Lys Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys Arg Lys
    450                 455                 460
Asn Gln Ala Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
465                 470                 475                 480
Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp
                485                 490                 495
Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn
            500                 505                 510
Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu
        515                 520                 525
Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe
    530                 535                 540
Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile
545                 550                 555                 560
Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly
                565                 570                 575
Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala
            580                 585                 590
Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val
        595                 600                 605
Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser
    610                 615                 620
Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu
625                 630                 635                 640
Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu
                645                 650                 655
Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr
            660                 665                 670
Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe
        675                 680                 685
Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile
    690                 695                 700
Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr
705                 710                 715                 720
```

Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser
725 730 735
Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn
740 745 750
Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met
755 760 765
Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn
770 775 780
Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe
785 790 795 800
Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala
805 810 815
Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu
820 825 830
Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp
835 840 845
Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly
850 855 860
Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr
865 870 875 880
Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln
885 890 895
Arg Leu Leu Ser Thr Leu Asp
900

<210> 2
<211> 908
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Retargeted endopeptidase

<400> 2
Met Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro
1 5 10 15
Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln
20 25 30
Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile
35 40 45
Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro
50 55 60
Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys
85 90 95
Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr
100 105 110
Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr
115 120 125
Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp
130 135 140
Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser
145 150 155 160
Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu
165 170 175
Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser
180 185 190

Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn
195 200 205
Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu
210 215 220
Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile
225 230 235 240
Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met
245 250 255
Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His
260 265 270
Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr
275 280 285
Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys
290 295 300
Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe
305 310 315 320
Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val
325 330 335
Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr
340 345 350
Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr
355 360 365
Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys
370 375 380
Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu
385 390 395 400
Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe
405 410 415
Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu
420 425 430
Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Asp Asp Asp Asp
435 440 445
Lys Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys Trp Asp
450 455 460
Asn Gln Ala Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
465 470 475 480
Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp
485 490 495
Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn
500 505 510
Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu
515 520 525
Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe
530 535 540
Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile
545 550 555 560
Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly
565 570 575
Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala
580 585 590
Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val
595 600 605
Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser
610 615 620
Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu
625 630 635 640
Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu
645 650 655
Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr

```
            660                 665                 670
Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe
        675                 680                 685
Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile
    690                 695                 700
Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr
705                 710                 715                 720
Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser
                725                 730                 735
Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn
            740                 745                 750
Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met
        755                 760                 765
Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn
    770                 775                 780
Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe
785                 790                 795                 800
Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala
                805                 810                 815
Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu
            820                 825                 830
Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp
        835                 840                 845
Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly
    850                 855                 860
Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr
865                 870                 875                 880
Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln
                885                 890                 895
Arg Leu Leu Ser Thr Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
            900                 905
```

<210> 3
<211> 906
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Retargeted endopeptidase

<400> 3

```
Ile Ser Glu Phe Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr
 1               5                  10                  15
Lys Asp Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn
            20                  25                  30
Ala Gly Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile
        35                  40                  45
Trp Val Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp
    50                  55                  60
Leu Asn Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp
65                  70                  75                  80
Ser Thr Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly
                85                  90                  95
Val Thr Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met
            100                 105                 110
Leu Leu Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr
        115                 120                 125
Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile
```

```
    130                 135                 140
Gln Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile
145                 150                 155                 160
Gly Pro Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His
                165                 170                 175
Glu Val Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile
            180                 185                 190
Arg Phe Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val
        195                 200                 205
Asp Thr Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala
    210                 215                 220
Val Thr Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly
225                 230                 235                 240
Ile Ala Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr
                245                 250                 255
Tyr Glu Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe
            260                 265                 270
Gly Gly His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe
        275                 280                 285
Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn
    290                 295                 300
Lys Ala Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys
305                 310                 315                 320
Asn Val Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys
                325                 330                 335
Phe Ser Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr
            340                 345                 350
Glu Ile Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn
        355                 360                 365
Arg Lys Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile
    370                 375                 380
Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn
385                 390                 395                 400
Thr Asn Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn
                405                 410                 415
Met Asn Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr
            420                 425                 430
Lys Leu Leu Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu
        435                 440                 445
Ile Glu Gly Arg Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn
    450                 455                 460
Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp
465                 470                 475                 480
Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala
                485                 490                 495
Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe
            500                 505                 510
Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser
        515                 520                 525
Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro
    530                 535                 540
Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu
545                 550                 555                 560
Arg Ala Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn
                565                 570                 575
Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe
            580                 585                 590
Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met
        595                 600                 605
```

```
Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr
    610                 615                 620
Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile
625                 630                 635                 640
Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp
                645                 650                 655
Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu
            660                 665                 670
Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val
        675                 680                 685
Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala
    690                 695                 700
Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val
705                 710                 715                 720
Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys
                725                 730                 735
Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile
            740                 745                 750
Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile
        755                 760                 765
Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn
    770                 775                 780
Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser
785                 790                 795                 800
Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp
                805                 810                 815
Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn
            820                 825                 830
Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn
        835                 840                 845
Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp
    850                 855                 860
Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
865                 870                 875                 880
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Val Gly Arg Pro Glu
                885                 890                 895
Trp Trp Met Asp Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly
            900                 905
```

<210> 4
<211> 919
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Retargeted endopeptidase

```
<400> 4
Met Glu 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 Asp
420 425 430
Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Asp Asp Asp Asp Lys Tyr Gly
435 440 445
Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe
450 455 460
Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu Ala Leu Ala
465 470 475 480
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
485 490 495
Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser
500 505 510
Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile
515 520 525
Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp
530 535 540
Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu

545 550 555 560
Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu
565 570 575
Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu
580 585 590
Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His
595 600 605
Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu
610 615 620
Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys
625 630 635 640
Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln
645 650 655
Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp
660 665 670
Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu
675 680 685
Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile
690 695 700
Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile
705 710 715 720
Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val
725 730 735
Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys
740 745 750
Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val
755 760 765
Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu
770 775 780
Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln
785 790 795 800
Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu
805 810 815
Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn
820 825 830
Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile
835 840 845
Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp
850 855 860
Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln
865 870 875 880
Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile
885 890 895
Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr
900 905 910
Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
915

<210> 5
<211> 206
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30

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

<210> 6
<211> 206
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65 70 75 80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
85 90 95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
100 105 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
115 120 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
130 135 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145 150 155 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
165 170 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
180 185 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200 205

<210> 7

<211> 206
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<400> 7
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1   5   10   15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20   25   30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35   40   45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50   55   60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65   70   75   80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85   90   95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100   105   110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115   120   125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130   135   140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145   150   155   160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165   170   175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
            180   185   190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195   200   205

<210> 8
<211> 206
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 8
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1   5   10   15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20   25   30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35   40   45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
    50   55   60
Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
65   70   75   80
Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85   90   95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100   105   110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115   120   125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130   135   140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145   150   155   160

Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
165 170 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
180 185 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200 205

<210> 9
<211> 206
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 9
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65 70 75 80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
85 90 95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
100 105 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
115 120 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
130 135 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145 150 155 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
165 170 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
180 185 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200 205

<210> 10
<211> 206
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65 70 75 80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys

```
                85                  90                  95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100                 105                 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115                 120                 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130                 135                 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145                 150                 155                 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205


<210> 11
<211> 206
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 11
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1               5                  10                  15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20                  25                  30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35                  40                  45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50                  55                  60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65                  70                  75                  80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85                  90                  95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100                 105                 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115                 120                 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130                 135                 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145                 150                 155                 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205


<210> 12
<211> 204
<212> PRT
<213> Carassius auratus

<400> 12
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Ser Asp Met Gln Gln
 1               5                  10                  15
```

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

<210> 13
<211> 203
<212> PRT
<213> Carassius auratus

<400> 13
Met Ala Asp Glu Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Thr Asp Met Gln Ala
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Gly Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65 70 75 80
Leu Gly Asn Leu Cys Gly Leu Cys Pro Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
85 90 95
Gly Gly Gly Gln Ser Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ser Ser
100 105 110
Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser Gly
115 120 125
Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met Asp
130 135 140
Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg His Met
145 150 155 160
Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile Asp
165 170 175
Arg Ile Met Asp Met Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala
180 185 190
Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200

<210> 14
<211> 204
<212> PRT
<213> Danio rerio

<400> 14
Met Ala Glu Asp Ser Asp Met Arg Asn Glu Leu Ala Asp Met Gln Gln
 1   5   10   15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20   25   30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35   40   45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50   55   60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn Leu Asn Asp
65   70   75   80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys Asn Lys Met Lys
                85   90   95
Ser Gly Ala Ser Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala
            100   105   110
Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser
        115   120   125
Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met
    130   135   140
Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu Arg His
145   150   155   160
Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile
                165   170   175
Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu
            180   185   190
Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195   200

<210> 15
<211> 203
<212> PRT
<213> Danio rerio

<400> 15
Met Ala Asp Glu Ser Asp Met Arg Asn Glu Leu Asn Asp Met Gln Ala
 1   5   10   15
Arg Ala Asp Gln Leu Gly Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20   25   30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35   40   45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50   55   60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65   70   75   80
Leu Gly Asn Leu Cys Gly Leu Cys Pro Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85   90   95
Gly Gly Gly Gln Ser Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ser Ser
            100   105   110
Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser Gly
        115   120   125
Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met Asp
    130   135   140

```
Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg His Met
145                 150                 155                 160
Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile Asp
                165                 170                 175
Arg Ile Met Asp Met Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala
            180                 185                 190
Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200
```

<210> 16
<211> 210
<212> PRT
<213> Torpedo marmorata

<400> 16

```
Met Glu Asn Ser Val Glu Asn Ser Met Asp Pro Arg Ser Glu Gln Glu
 1               5                  10                  15
Glu Met Gln Arg Cys Ala Asp Gln Ile Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser
            20                  25                  30
Thr Arg Arg Met Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile
        35                  40                  45
Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile
    50                  55                  60
Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys
65                  70                  75                  80
Asn Leu Ser Asp Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys
                85                  90                  95
Asn Lys Leu Lys Asn Phe Glu Ala Gly Gly Ala Tyr Lys Lys Val Trp
            100                 105                 110
Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Met
        115                 120                 125
Asp Asp Arg Glu Gln Met Ala Met Ser Gly Gly Tyr Ile Arg Arg Ile
    130                 135                 140
Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met Glu Glu Asn Leu Asp Gln Val
145                 150                 155                 160
Gly Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Ser Asn
                165                 170                 175
Glu Ile Gly Ser Gln Asn Ala Gln Ile Asp Arg Ile Val Val Lys Gly
            180                 185                 190
Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys
        195                 200                 205
Met Leu
    210
```

<210> 17
<211> 206
<212> PRT
<213> Xenopus laevis

<400> 17

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

```
    50                  55                  60
Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
65                  70                  75                  80
Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85                  90                  95
Ser Ser Gly Ala Tyr Asn Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100                 105                 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115                 120                 125
Ile Ser Gly Gly Phe Val Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Thr
    130                 135                 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145                 150                 155                 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Ala Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205


<210> 18
<211> 206
<212> PRT
<213> Xenopus laevis

<400> 18
Met Ala Asp Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1               5                  10                  15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20                  25                  30
Leu Gln Tyr Val Glu Gly Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35                  40                  45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50                  55                  60
Glu Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65                  70                  75                  80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85                  90                  95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100                 105                 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115                 120                 125
Ile Ser Gly Gly Phe Val Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Thr
    130                 135                 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145                 150                 155                 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Ala Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205


<210> 19
<211> 212
<212> PRT
<213> Strongylocentrotus purpuratus
```

<400> 19
Met Glu Asp Gln Asn Asp Met Asn Met Arg Ser Glu Leu Glu Glu Ile
 1   5   10   15
Gln Met Gln Ser Asn Met Gln Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg
            20   25   30
Arg Met Leu Gln Met Ala Glu Glu Ser Gln Asp Met Gly Ile Lys Thr
        35   40   45
Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu Glu
    50   55   60
Gly Met Asp Gln Ile Asn Thr Asp Met Arg Glu Ala Glu Lys Asn Leu
65   70   75   80
Thr Gly Leu Glu Lys Cys Cys Gly Ile Cys Val Cys Pro Trp Lys Lys
                85   90   95
Leu Gly Asn Phe Glu Lys Gly Asp Asp Tyr Lys Lys Thr Trp Lys Gly
            100   105   110
Asn Asp Asp Gly Lys Val Asn Ser His Gln Pro Met Arg Met Glu Asp
        115   120   125
Asp Arg Asp Gly Cys Gly Gly Asn Ala Ser Met Ile Thr Arg Ile Thr
    130   135   140
Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met Asp Glu Asn Leu Thr Gln Val Ser
145   150   155   160
Ser Ile Val Gly Asn Leu Arg His Met Ala Ile Asp Met Gln Ser Glu
                165   170   175
Ile Gly Ala Gln Asn Ser Gln Val Gly Arg Ile Thr Ser Lys Ala Glu
            180   185   190
Ser Asn Glu Gly Arg Ile Asn Ser Ala Asp Lys Arg Ala Lys Asn Ile
        195   200   205
Leu Arg Asn Lys
    210

<210> 20
<211> 212
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 20
Met Pro Ala Asp Pro Ser Glu Glu Val Ala Pro Gln Val Pro Lys Thr
 1   5   10   15
Glu Leu Glu Glu Leu Gln Ile Asn Ala Gln Gly Val Ala Asp Glu Ser
            20   25   30
Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ala Leu Cys Glu Glu Ser Lys Glu
        35   40   45
Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val Ala Leu Asp Asp Gln Gly Glu Gln Leu
    50   55   60
Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Ala Asp Met Arg Glu
65   70   75   80
Ala Glu Lys Asn Leu Ser Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Ile Cys Val
                85   90   95
Leu Pro Cys Asn Lys Ser Gln Ser Phe Lys Glu Asp Asp Gly Thr Trp
            100   105   110
Lys Gly Asn Asp Asp Gly Lys Val Val Asn Asn Gln Pro Gln Arg Val
        115   120   125
Met Asp Asp Arg Asn Gly Met Met Ala Gln Ala Gly Tyr Ile Gly Arg
    130   135   140
Ile Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met Glu Glu Asn Met Gly Gln
145   150   155   160
Val Asn Thr Met Ile Gly Asn Leu Arg Asn Met Ala Leu Asp Met Gly

```
                165                 170                 175
Ser Glu Leu Glu Asn Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Asn Arg Lys
            180                 185                 190
Gly Glu Ser Asn Glu Ala Arg Ile Ala Val Ala Asn Gln Arg Ala His
        195                 200                 205
Gln Leu Leu Lys
    210
```

<210> 21
<211> 212
<212> PRT
<213> Hirudo medicinalis

<400> 21

```
Met Ala Lys Asp Ile Lys Pro Lys Pro Ala Asn Gly Arg Asp Ser Pro
 1               5                  10                  15
Thr Asp Leu Gln Glu Ile Gln Leu Gln Met Asn Ala Ile Thr Asp Asp
            20                  25                  30
Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ala Met Cys Glu Glu Ser Lys
        35                  40                  45
Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln
    50                  55                  60
Leu Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Gln Asp Met Arg
65                  70                  75                  80
Asp Ala Glu Lys Asn Leu Glu Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys
                85                  90                  95
Ile Leu Pro Trp Lys Arg Thr Lys Asn Phe Asp Lys Gly Ala Glu Trp
            100                 105                 110
Asn Lys Gly Asp Glu Gly Lys Val Asn Thr Asp Gly Pro Arg Leu Val
        115                 120                 125
Val Gly Asp Gly Asn Met Gly Pro Ser Gly Gly Phe Ile Thr Lys Ile
    130                 135                 140
Thr Asn Asp Ala Arg Glu Glu Glu Met Glu Gln Asn Met Gly Glu Val
145                 150                 155                 160
Ser Asn Met Ile Ser Asn Leu Arg Asn Met Ala Val Asp Met Gly Ser
                165                 170                 175
Glu Ile Asp Ser Gln Asn Arg Gln Val Asp Arg Ile Asn Asn Lys Met
            180                 185                 190
Thr Ser Asn Gln Leu Arg Ile Ser Asp Ala Asn Lys Arg Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Lys Glu
    210
```

<210> 22
<211> 212
<212> PRT
<213> Loligo pealei

<400> 22

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

Glu Gly Leu Asp Gln Ile Asn Gln Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn
65 70 75 80
Leu Glu Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys Val Leu Pro Trp Lys
85 90 95
Arg Gly Lys Ser Phe Glu Lys Ser Gly Asp Tyr Ala Asn Thr Trp Lys
100 105 110
Lys Asp Asp Asp Gly Pro Thr Asn Thr Asn Gly Pro Arg Val Thr Val
115 120 125
Gly Asp Gln Asn Gly Met Gly Pro Ser Ser Gly Tyr Val Thr Arg Ile
130 135 140
Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Asp Met Glu Asn Asn Met Lys Glu Val
145 150 155 160
Ser Ser Met Ile Gly Asn Leu Arg Asn Met Ala Ile Asp Met Gly Asn
165 170 175
Glu Ile Gly Ser Gln Asn Arg Gln Val Asp Arg Ile Gln Gln Lys Ala
180 185 190
Glu Ser Asn Glu Ser Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys Lys Ala Thr Lys
195 200 205
Leu Leu Lys Asn
210

<210> 23
<211> 220
<212> PRT
<213> Lymnaea stagnalis

<400> 23
Met Thr Thr Asn Gly Glu Ile Leu Pro Val Gly Glu Glu Glu Glu Glu
1 5 10 15
Glu Leu Gly Glu Asp Ala Leu Leu Arg Lys Gln Ile Asp Cys Asn Thr
20 25 30
Asn Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ser Leu Cys Glu Glu
35 40 45
Ser Lys Glu Ala Gly Ile Lys Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly
50 55 60
Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Gly Gln Ile Asn Gln Asp
65 70 75 80
Met Arg Asp Ala Glu Lys Asn Leu Glu Gly Leu Glu Lys Cys Cys Gly
85 90 95
Leu Cys Val Leu Pro Trp Lys Arg Ser Lys Asn Phe Glu Lys Gly Ser
100 105 110
Asp Tyr Asn Lys Thr Trp Lys Ala Ser Glu Asp Gly Lys Ile Asn Thr
115 120 125
Asn Gly Pro Arg Leu Val Val Asp Gln Gly Asn Gly Ser Gly Pro Thr
130 135 140
Gly Gly Tyr Ile Thr Arg Ile Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met
145 150 155 160
Glu Gln Asn Ile Gly Glu Val Ala Gly Met Val Ser Asn Leu Arg Asn
165 170 175
Met Ala Val Asp Met Gly Asn Glu Ile Glu Ser Gln Asn Lys Gln Leu
180 185 190
Asp Arg Ile Asn Gln Lys Gly Gly Ser Leu Asn Val Arg Val Asp Glu
195 200 205
Ala Asn Lys Arg Ala Asn Arg Ile Leu Arg Lys Gln
210 215 220

<210> 24

<211> 207
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elegans

<400> 24
Met Ser Gly Asp Asp Asp Ile Pro Glu Gly Leu Glu Ala Ile Asn Leu
 1   5   10   15
Lys Met Asn Ala Thr Thr Asp Asp Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20   25   30
Leu Ala Leu Cys Glu Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ile Lys Thr Leu Val
        35   40   45
Met Leu Asp Asp Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Cys Glu Gly Ala Leu
    50   55   60
Asp Thr Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Asp His Leu Lys Gly
65   70   75   80
Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys Val Leu Pro Trp Asn Lys Thr Asp
                85   90   95
Asp Phe Glu Lys Thr Glu Phe Ala Lys Ala Trp Lys Lys Asp Asp Asp
            100   105   110
Gly Gly Val Ile Ser Asp Gln Pro Arg Ile Thr Val Gly Asp Ser Ser
        115   120   125
Met Gly Pro Gln Gly Gly Tyr Ile Thr Lys Ile Thr Asn Asp Ala Arg
    130   135   140
Glu Asp Glu Met Asp Glu Asn Val Gln Gln Val Ser Thr Met Val Gly
145   150   155   160
Asn Leu Arg Asn Met Ala Ile Asp Met Ser Thr Glu Val Ser Asn Gln
                165   170   175
Asn Arg Gln Leu Asp Arg Ile His Asp Lys Ala Gln Ser Asn Glu Val
            180   185   190
Arg Val Glu Ser Ala Asn Lys Arg Ala Lys Asn Leu Ile Thr Lys
        195   200   205

<210> 25
<211> 370
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Met Glu Pro Leu Phe Pro Ala Pro Phe Trp Glu Val Ile Tyr Gly Ser
 1   5   10   15
His Leu Gln Gly Asn Leu Ser Leu Leu Ser Pro Asn His Ser Leu Leu
            20   25   30
Pro Pro His Leu Leu Leu Asn Ala Ser His Gly Ala Phe Leu Pro Leu
        35   40   45
Gly Leu Lys Val Thr Ile Val Gly Leu Tyr Leu Ala Val Cys Val Gly
    50   55   60
Gly Leu Leu Gly Asn Cys Leu Val Met Tyr Val Ile Leu Arg His Thr
65   70   75   80
Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala
                85   90   95
Asp Thr Leu Val Leu Leu Thr Leu Pro Phe Gln Gly Thr Asp Ile Leu
            100   105   110
Leu Gly Phe Trp Pro Phe Gly Asn Ala Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala
        115   120   125
Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Thr Phe Thr Leu Thr Ala Met
    130   135   140
Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys His Pro Ile Arg Ala Leu Asp
145   150   155   160

Val Arg Thr Ser Ser Lys Ala Gln Ala Val Asn Val Ala Ile Trp Ala
165 170 175
Leu Ala Ser Val Val Gly Val Pro Val Ala Ile Met Gly Ser Ala Gln
180 185 190
Val Glu Asp Glu Glu Ile Glu Cys Leu Val Glu Ile Pro Thr Pro Gln
195 200 205
Asp Tyr Trp Gly Pro Val Phe Ala Ile Cys Ile Phe Leu Phe Ser Phe
210 215 220
Ile Val Pro Val Leu Val Ile Ser Val Cys Tyr Ser Leu Met Ile Arg
225 230 235 240
Arg Leu Arg Gly Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg
245 250 255
Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe
260 265 270
Val Gly Cys Trp Thr Pro Val Gln Val Phe Val Leu Ala Gln Gly Leu
275 280 285
Gly Val Gln Pro Ser Ser Glu Thr Ala Val Ala Ile Leu Arg Phe Cys
290 295 300
Thr Ala Leu Gly Tyr Val Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala
305 310 315 320
Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Ala Cys Phe Arg Lys Phe Cys Cys Ala
325 330 335
Ser Ala Leu Arg Arg Asp Val Gln Val Ser Asp Arg Val Arg Ser Ile
340 345 350
Ala Lys Asp Val Ala Leu Ala Cys Lys Thr Ser Glu Thr Val Pro Arg
355 360 365
Pro Ala
370

<210> 26
<211> 365
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Met Glu Pro Leu Phe Pro Ala Pro Phe Trp Glu Val Ile Tyr Gly Ser
1 5 10 15
His Leu Gln Gly Asn Leu Ser Leu Leu Ser Pro Asn His Ser Leu Leu
20 25 30
Pro Pro His Leu Leu Leu Asn Ala Ser His Gly Ala Phe Leu Pro Leu
35 40 45
Gly Leu Lys Val Thr Ile Val Gly Leu Tyr Leu Ala Val Cys Val Gly
50 55 60
Gly Leu Leu Gly Asn Cys Leu Val Met His Thr Lys Met Lys Thr Ala
65 70 75 80
Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Thr Leu Val Leu
85 90 95
Leu Thr Leu Pro Phe Gln Gly Thr Asp Ile Leu Leu Gly Phe Trp Pro
100 105 110
Phe Gly Asn Ala Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Ile Asp Tyr Tyr Asn
115 120 125
Met Phe Thr Ser Thr Phe Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Tyr
130 135 140
Val Ala Ile Cys His Pro Ile Arg Ala Leu Asp Val Arg Thr Ser Ser
145 150 155 160
Lys Ala Gln Ala Val Asn Val Ala Ile Trp Ala Leu Ala Ser Val Val
165 170 175
Gly Val Pro Val Ala Ile Met Gly Ser Ala Gln Val Glu Asp Glu Glu

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


<210> 27
<211> 372
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Met Glu Pro Ala Pro Ser Ala Gly Ala Glu Leu Gln Pro Pro Leu Phe
 1               5                  10                  15
Ala Asn Ala Ser Asp Ala Tyr Pro Ser Ala Cys Pro Ser Ala Gly Ala
            20                  25                  30
Asn Ala Ser Gly Pro Pro Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ser Leu Ala Leu
        35                  40                  45
Ala Ile Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ser Ala Val Cys Ala Val Gly Leu
    50                  55                  60
Leu Gly Asn Val Leu Val Met Phe Gly Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met
65                  70                  75                  80
Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala
                85                  90                  95
Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Met Glu
            100                 105                 110
Thr Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys Ala Val Leu Ser Ile Asp
        115                 120                 125
Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val
    130                 135                 140
Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Ala Lys Ala Lys Leu Ile Asn Ile Cys Ile Trp Val Leu Ala
                165                 170                 175
Ser Gly Val Gly Val Pro Ile Met Val Met Ala Val Thr Arg Pro Arg
            180                 185                 190
Asp Gly Ala Val Val Cys Met Leu Gln Phe Pro Ser Pro Ser Trp Tyr
        195                 200                 205
Trp Asp Thr Val Thr Lys Ile Cys Val Phe Leu Phe Ala Phe Val Val
    210                 215                 220
```

```
Pro Ile Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Leu Leu Arg Leu
225                 230                 235                 240
Arg Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg Ser Leu
                245                 250                 255
Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Gly Ala Phe Val Val
            260                 265                 270
Cys Trp Ala Pro Ile His Ile Phe Val Ile Val Trp Thr Leu Val Asp
        275                 280                 285
Ile Asp Arg Arg Asp Pro Leu Val Val Ala Ala Leu His Leu Cys Ile
    290                 295                 300
Ala Leu Gly Tyr Ala Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe
305                 310                 315                 320
Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Gln Leu Cys Arg Lys Pro
                325                 330                 335
Cys Gly Arg Pro Asp Pro Ser Ser Phe Ser Arg Ala Arg Glu Ala Thr
            340                 345                 350
Ala Arg Glu Arg Val Thr Ala Cys Thr Pro Ser Asp Gly Pro Gly Gly
        355                 360                 365
Gly Ala Ala Ala
    370
```

<210> 28
<211> 372
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

```
Met Glu Pro Ala Pro Ser Ala Gly Ala Glu Leu Gln Pro Pro Leu Phe
 1               5                  10                  15
Ala Asn Ala Ser Asp Ala Tyr Pro Ser Ala Phe Pro Ser Ala Gly Ala
            20                  25                  30
Asn Ala Ser Gly Pro Pro Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ser Leu Ala Leu
        35                  40                  45
Ala Ile Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ser Ala Val Cys Ala Val Gly Leu
    50                  55                  60
Leu Gly Asn Val Leu Val Met Phe Gly Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met
65                  70                  75                  80
Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala
                85                  90                  95
Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Met Glu
            100                 105                 110
Thr Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys Ala Val Leu Ser Ile Asp
        115                 120                 125
Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val
    130                 135                 140
Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Ala Lys Ala Lys Leu Ile Asn Ile Cys Ile Trp Val Leu Ala
                165                 170                 175
Ser Gly Val Gly Val Pro Ile Met Val Met Ala Val Thr Arg Pro Arg
            180                 185                 190
Asp Gly Ala Val Val Cys Met Leu Gln Phe Pro Ser Pro Ser Trp Tyr
        195                 200                 205
Trp Asp Thr Val Thr Lys Ile Cys Val Phe Leu Phe Ala Phe Val Val
    210                 215                 220
Pro Ile Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Leu Leu Arg Leu
225                 230                 235                 240
Arg Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg Ser Leu
```

```
                245                 250                 255
Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Gly Ala Phe Val Val
            260                 265                 270
Cys Trp Ala Pro Ile His Ile Phe Val Ile Val Trp Thr Leu Val Asp
        275                 280                 285
Ile Asp Arg Arg Asp Pro Leu Val Val Ala Ala Leu His Leu Cys Ile
    290                 295                 300
Ala Leu Gly Tyr Ala Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe
305                 310                 315                 320
Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Gln Leu Cys Arg Lys Pro
                325                 330                 335
Cys Gly Arg Pro Asp Pro Ser Ser Phe Ser Arg Ala Arg Glu Ala Thr
            340                 345                 350
Ala Arg Glu Arg Val Thr Ala Cys Thr Pro Ser Asp Gly Pro Gly Gly
        355                 360                 365
Gly Ala Ala Ala
    370
```

<210> 29
<211> 380
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

```
Met Asp Ser Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Glu Pro Gly Pro Thr Cys
 1               5                  10                  15
Ala Pro Ser Ala Cys Leu Pro Pro Asn Ser Ser Ala Trp Phe Pro Gly
            20                  25                  30
Trp Ala Glu Pro Asp Ser Asn Gly Ser Ala Gly Ser Glu Asp Ala Gln
        35                  40                  45
Leu Glu Pro Ala His Ile Ser Pro Ala Ile Pro Val Ile Ile Thr Ala
    50                  55                  60
Val Tyr Ser Val Val Phe Val Val Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val
65                  70                  75                  80
Met Phe Val Ile Ile Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile
                85                  90                  95
Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Val Thr Thr Thr Met
            100                 105                 110
Pro Phe Gln Ser Thr Val Tyr Leu Met Asn Ser Trp Pro Phe Gly Asp
        115                 120                 125
Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr
    130                 135                 140
Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val
145                 150                 155                 160
Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys
                165                 170                 175
Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Ser
            180                 185                 190
Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile
        195                 200                 205
Glu Cys Ser Leu Gln Phe Pro Asp Asp Asp Tyr Ser Trp Trp Asp Leu
    210                 215                 220
Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu
225                 230                 235                 240
Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val
                245                 250                 255
Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile
            260                 265                 270
```

```
Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Val Cys Trp Thr
        275                 280                 285
Pro Ile His Ile Phe Ile Leu Val Glu Ala Leu Gly Ser Thr Ser His
    290                 295                 300
Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr
305                 310                 315                 320
Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
                325                 330                 335
Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Leu Lys Met Arg Met
            340                 345                 350
Glu Arg Gln Ser Thr Ser Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
        355                 360                 365
Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Gly Met Asn Lys Pro Val
    370                 375                 380
```

<210> 30
<211> 380
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

```
Met Glu Ser Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Glu Pro Gly Pro Thr Cys
 1               5                  10                  15
Ala Pro Ser Ala Cys Leu Pro Pro Asn Ser Ser Ala Trp Phe Pro Gly
            20                  25                  30
Trp Ala Glu Pro Asp Ser Asn Gly Ser Ala Gly Ser Glu Asp Ala Gln
        35                  40                  45
Leu Glu Pro Ala His Ile Ser Pro Ala Ile Pro Val Ile Ile Thr Ala
    50                  55                  60
Val Tyr Ser Val Val Phe Val Val Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val
65                  70                  75                  80
Met Phe Val Ile Ile Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile
                85                  90                  95
Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Val Thr Thr Thr Met
            100                 105                 110
Pro Phe Gln Ser Thr Val Tyr Leu Met Asn Ser Trp Pro Phe Gly Asp
        115                 120                 125
Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr
    130                 135                 140
Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val
145                 150                 155                 160
Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys
                165                 170                 175
Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Ser
            180                 185                 190
Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile
        195                 200                 205
Glu Cys Ser Leu Gln Phe Pro Asp Asp Asp Tyr Ser Trp Trp Asp Leu
    210                 215                 220
Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu
225                 230                 235                 240
Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val
                245                 250                 255
Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile
            260                 265                 270
Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Val Cys Trp Thr
        275                 280                 285
Pro Ile His Ile Phe Ile Leu Val Glu Ala Leu Gly Ser Thr Ser His
```

```
    290                 295                 300
Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr
305                 310                 315                 320
Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
                325                 330                 335
Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Leu Lys Met Arg Met
            340                 345                 350
Glu Arg Gln Ser Thr Ser Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
        355                 360                 365
Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Gly Met Asn Lys Pro Val
    370                 375                 380


<210> 31
<211> 493
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Met Cys Leu His Arg Arg Val Pro Ser Glu Glu Thr Tyr Ser Leu Asp
 1               5                  10                  15
Arg Phe Ala Gln Asn Pro Pro Leu Phe Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ala
            20                  25                  30
Ser Glu Ser Arg Met Ala His Ala Pro Leu Leu Gln Arg Cys Gly Ala
        35                  40                  45
Ala Arg Thr Gly Phe Cys Lys Lys Gln Gln Glu Leu Trp Gln Arg Arg
    50                  55                  60
Lys Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Thr Arg Lys Val Ser Val Leu Leu
65                  70                  75                  80
Ala Thr Ser His Ser Gly Ala Arg Pro Ala Val Ser Thr Met Asp Ser
                85                  90                  95
Ser Ala Ala Pro Thr Asn Ala Ser Asn Cys Thr Asp Ala Leu Ala Tyr
            100                 105                 110
Ser Ser Cys Ser Pro Ala Pro Ser Pro Gly Ser Trp Val Asn Leu Ser
        115                 120                 125
His Leu Asp Gly Asn Leu Ser Asp Pro Cys Gly Pro Asn Arg Thr Asp
    130                 135                 140
Leu Gly Gly Arg Asp Ser Leu Cys Pro Pro Thr Gly Ser Pro Ser Met
145                 150                 155                 160
Ile Thr Ala Ile Thr Ile Met Ala Leu Tyr Ser Ile Val Cys Val Val
                165                 170                 175
Gly Leu Phe Gly Asn Phe Leu Val Met Tyr Val Ile Val Arg Tyr Thr
            180                 185                 190
Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala
        195                 200                 205
Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Val Asn Tyr Leu
    210                 215                 220
Met Gly Thr Trp Pro Phe Gly Thr Ile Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser
225                 230                 235                 240
Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Cys Thr Met
                245                 250                 255
Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp
            260                 265                 270
Phe Arg Thr Pro Arg Asn Ala Lys Ile Ile Asn Val Cys Asn Trp Ile
        275                 280                 285
Leu Ser Ser Ala Ile Gly Leu Pro Val Met Phe Met Ala Thr Thr Lys
    290                 295                 300
Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Asp Cys Thr Leu Thr Phe Ser His Pro Thr
305                 310                 315                 320
```

```
Trp Tyr Trp Glu Asn Leu Leu Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe
                325                 330                 335
Ile Met Pro Val Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Ile Leu
            340                 345                 350
Arg Leu Lys Ser Val Arg Met Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg
        355                 360                 365
Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Ala Val Phe
    370                 375                 380
Ile Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile Tyr Val Ile Ile Lys Ala Leu
385                 390                 395                 400
Val Thr Ile Pro Glu Thr Thr Phe Gln Thr Val Ser Trp His Phe Cys
                405                 410                 415
Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Glu Phe Cys Ile Pro
        435                 440                 445
Thr Ser Ser Asn Ile Glu Gln Gln Asn Ser Thr Arg Ile Arg Gln Asn
    450                 455                 460
Thr Arg Asp His Pro Ser Thr Ala Asn Thr Val Asp Arg Thr Asn His
465                 470                 475                 480
Gln Leu Glu Asn Leu Glu Ala Glu Thr Ala Pro Leu Pro
                485                 490
```

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at the P1

<400> 32
```
Asp Glu Ala Asn Gln
 1               5
```

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<400> 33
```
Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1               5
```

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<400> 34
Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<400> 35
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<400> 36
Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at the P1

<400> 37
Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5 10

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at
the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A
cleavage site

<400> 38
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5 10

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at
the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A
cleavage site

<400> 39
Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5 10

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxylated
carboxyl-terminus at the P1 residue of the
scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<221> SITE
<222> (13)...(13)
<223> carboxylated glutamine

<400> 40
Cys Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5 10

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at
the P1

<400> 41
Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5

<210> 42
<211> 8

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<400> 42
Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1   5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<400> 43
Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1   5

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<400> 44
Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1   5   10

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<400> 45
Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1   5   10

<210> 46

<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxyl-terminus at the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<400> 46
Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen having a free carboxylated carboxyl-terminus at the P1 residue of the scissile bond of the BoNT/A cleavage site

<221> SITE
<222> (13)...(13)
<223> Carboxylated lysine

<400> 47
Cys Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen

<400> 48
Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5 10

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNAP-25 antigen

<400> 49
Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 50
<211> 88
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BirA-HisTag?-SNAP-25-134-197

<400> 50
Met Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
 1   5   10   15
His His His His His His His His Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala
            20   25   30
Arg Glu Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile
        35   40   45
Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr
    50   55   60
Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys
65   70   75   80
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
                85

<210> 51
<211> 97
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BirA-HisTag?-SNAP-25-134-206

<400> 51
Met Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
 1   5   10   15
His His His His His His His His Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala
            20   25   30
Arg Glu Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile
        35   40   45
Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr
    50   55   60
Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys
65   70   75   80
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser
                85   90   95
Gly

<210> 52
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BirA peptide

<400> 52
Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
 1   5   10   15

<210> 53
<211> 7570
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct.

<400> 53
gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgtatc 240
catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 360
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 420
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 660
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 720
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 780
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 840
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900
cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc 960
tccgcgggcc accatggagg gcccggttac cggtaccgga tccagatatc tgggcggccg 1020
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatggtgat gttaacggcc acaagttctc 1140
tgtcagtgga gagggtgaag gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gacttttca agagtgccat 1320
gcccgaaggt tatgtacagg aaaggaccat cttcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380
acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac ccttgttaat agaatcgagt taaaaggtat 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagacccg 1560
ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620
tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaat ctgccctttc 1680
gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagtttgtaa cagctgctgg 1740
gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga ggcggaggtg gacctttgt 1800
taataaacaa tttaattata aagatcctgt aaatggtgtt gatattgctt atataaaaat 1860
tccaaatgca ggacaaatgc aaccagtaaa agcttttaaa attcataata aaatatgggt 1920
tattccagaa agagatacat ttacaaatcc tgaagaagga gatttaaatc caccaccaga 1980
agcaaaacaa gttccagttt catattatga ttcaacatat ttaagtacag ataatgaaaa 2040
agataattat ttaaagggag ttacaaaatt atttgagaga atttattcaa ctgatcttgg 2100
aagaatgttg ttaacatcaa tagtaagggg aataccattt tggggtggaa gtacaataga 2160
tacagaatta aaagttattg atactaattg tattaatgtg atacaaccag atggtagtta 2220
tagatcagaa gaacttaatc tagtaataat aggaccctca gctgatatta tacagtttga 2280
atgtaaaagc tttggacatg aagttttgaa tcttacgcga aatggttatg gctctactca 2340
atacattaga tttagcccag attttacatt tggttttgag gagtcacttg aagttgatac 2400
aaatcctctt ttaggtgcag gcaaatttgc tacagatcca gcagtaacat tagcacatga 2460
acttatacat gctggacata gattatatgg aatagcaatt aatccaaata gggtttttaa 2520
agtaaatact aatgcctatt atgaaatgag tgggttagaa gtaagctttg aggaacttag 2580
aacatttggg ggacatgatg caaagtttat agatagttta caggaaaacg aatttcgtct 2640
atattattat aataagttta aagatatagc aagtacactt aataaagcta aatcaatagt 2700
aggtactact gcttcattac agtatatgaa aaatgttttt aaagagaaat atctcctatc 2760
tgaagataca tctggaaaat tttcggtaga taaattaaaa tttgataagt tatacaaaat 2820
gttaacagag atttacacag aggataattt tgttaagttt tttaaagtac ttaacagaaa 2880

aacatatttg aattttgata aagccgtatt taagataaat atagtaccta aggtaaatta 2940
cacaatatat gatggattta atttaagaaa tacaaattta gcagcaaact ttaatggtca 3000
aaatacagaa attaataata tgaattttac taaactaaaa aattttactg gattgtttga 3060
attttataag ttgctatgtg taagagggat aatcacttcg aaatgaacgc gttggcccta 3120
ttctatagtg tcacctaaat gctagagctc gctgatcagc ctcgactgtg ccttctagtt 3180
gccagccatc tgttgtttgc ccctcccccg tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc 3240
ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 3300
ctattctggg gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca 3360
ggcatgctgg ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc agctggggct 3420
ctagggggta tccccacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta 3480
cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc gctttcttcc 3540
cttccttttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg ggcatcccttt 3600
tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg 3660
gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 3720
cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggtct 3780
attcttttga tttataaggg attttgggga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 3840
tttaacaaaa atttaacgcg aattaattct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtggaaa 3900
gtccccaggc tccccaggca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa 3960
ccaggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 4020
attagtcagc aaccatagtc ccgccctaa ctccgcccat cccgcccta actccgccca 4080
gttccgccca ttctccgccc catggctgac taatttttt tatttatgca gaggccgagg 4140
ccgcctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttgga ggcctaggct 4200
tttgcaaaaa gctcccggga gcttgtatat ccattttcgg atctgatcaa gagacaggat 4260
gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg 4320
tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg 4380
tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg 4440
ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc 4500
cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg 4560
aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca 4620
tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc 4680
aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg 4740
atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg 4800
cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata 4860
tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 4920
accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat 4980
gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcatcgcct 5040
tctatcgcct tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca 5100
agcgacgccc aacctgccat cacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt 5160
gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat 5220
gctggagttc ttcgcccacc ccaacttgtt tattgcagct tataatggtt acaaataaag 5280
caatagcatc acaaatttca caaataaagc attttttttca ctgcattcta gttgtggttt 5340
gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataccg tcgacctcta gctagagctt 5400
ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 5460
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact 5520
cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 5580
gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc 5640
ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 5700
ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 5760
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 5820
taggctccgc cccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 5880
cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 5940
tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 6000
gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 6060
gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 6120
tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 6180
gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta 6240
cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 6300
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 6360
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 6420

ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggtcatgag 6480
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat 6540
ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 6600
tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 6660
aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc 6720
acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 6780
aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag 6840
agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt 6900
ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 6960
agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 7020
tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 7080
tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 7140
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 7200
taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg 7260
aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc 7320
caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag 7380
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7440
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 7500
tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 7560
acctgacgtc 7570

<210> 54
<211> 682
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GFP-BoNT/A light chain amino acid sequence.

<400> 54
Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1   5   10   15
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
            20   25   30
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
        35   40   45
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
    50   55   60
Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
65   70   75   80
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
                85   90   95
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
            100   105   110
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
        115   120   125
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
    130   135   140
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145   150   155   160
Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
                165   170   175
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
            180   185   190
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
        195   200   205
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val

```
    210                 215                 220
Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp
225                 230                 235                 240
Gly Gly Gly Gly Gly Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp
                245                 250                 255
Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly
            260                 265                 270
Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val
        275                 280                 285
Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn
    290                 295                 300
Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr
305                 310                 315                 320
Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr
                325                 330                 335
Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu
            340                 345                 350
Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp
        355                 360                 365
Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro
    370                 375                 380
Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro
385                 390                 395                 400
Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val
                405                 410                 415
Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe
            420                 425                 430
Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr
        435                 440                 445
Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr
    450                 455                 460
Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala
465                 470                 475                 480
Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu
                485                 490                 495
Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly
            500                 505                 510
His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu
        515                 520                 525
Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala
    530                 535                 540
Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val
545                 550                 555                 560
Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser
                565                 570                 575
Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile
            580                 585                 590
Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys
        595                 600                 605
Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro
    610                 615                 620
Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn
625                 630                 635                 640
Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn
                645                 650                 655
Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu
            660                 665                 670
Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys
        675                 680
```

<210> 55
<211> 6259
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pQBI-25/GFP expression construct.

<400> 55
gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat acgttgtatc 240
catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca tgttgacatt 300
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 360
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 420
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 480
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 600
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 660
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 720
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 780
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 840
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg 900
cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc 960
tccgcgggcc accatggagg gcccggttac cggtaccgga tccagatatc tgggcggccg 1020
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag aagaactctt 1080
cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatggtgat gttaacggcc acaagttctc 1140
tgtcagtgga gagggtgaag gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt gctatggtgt 1260
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gacttttca agagtgccat 1320
gcccgaaggt tatgtacagg aaaggaccat cttcttcaaa gatgacggca actacaagac 1380
acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac ccttgttaat agaatcgagt taaaaggtat 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact tcaagacccg 1560
ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa atactccaat 1620
tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaat ctgccctttc 1680
gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagtttgtaa cagctgctgg 1740
gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga ggcggaggtg gatgaacgcg 1800
ttggccctat tctatagtgt cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc 1860
cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctcccccgt gccttccttg accctggaag 1920
gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcatcgcat tgtctgagta 1980
ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caaggggaag gattgggaag 2040
acaatagcag gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca 2100
gctggggctc taggggtat ccccacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg 2160
tggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgccc gctcctttcg 2220
ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg ccggctttcc ccgtcaagct ctaaatcggg 2280
gcatcccttt agggttccga tttagtgctt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt 2340
agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt 2400
tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta 2460
tctcggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttggggat ttcggcctat tggttaaaaa 2520
atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attaattctg tggaatgtgt gtcagttagg 2580
gtgtggaaag tccccaggct ccccaggcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 2640
agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 2700
tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc ccgcccctaa 2760
ctccgcccag ttccgcccat tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 2820
aggccgaggc cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 2880

gcctaggctt ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatatc cattttcgga tctgatcaag 2940
agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg 3000
ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg 3060
atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc 3120
tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga 3180
cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc 3240
tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag 3300
tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgct tgatccggct acctgcccat 3360
tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg 3420
tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca 3480
ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct 3540
tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg 3600
gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg tgatattgct gaagagcttg 3660
gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc 3720
gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat 3780
gaccgaccaa gcgacgccca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 3840
tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg 3900
ggatctcatg ctggagttct tcgcccaccc caacttgttt attgcagctt ataatggtta 3960
caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca ttttttcac tgcattctag 4020
ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt cgacctctag 4080
ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac 4140
aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaatgagt 4200
gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc 4260
gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg 4320
ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt 4380
atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 4440
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 4500
gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag 4560
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt 4620
gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg 4680
aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg 4740
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg 4800
taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 4860
tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtggtg 4920
gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt 4980
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg 5040
tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 5100
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt 5160
ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt 5220
taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 5280
tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactcccgt 5340
cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgctg caatgatacc 5400
gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 5460
cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg 5520
ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg ccattgctac 5580
aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 5640
atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc 5700
tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact 5760
gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 5820
aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 5880
acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 5940
ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac 6000
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 6060
aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact 6120
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 6180
atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 6240
aaaagtgcca cctgacgtc 6259

<210> 56
<211> 245
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GFP amino acid sequence.

<400> 56
Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1   5   10   15
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
            20   25   30
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
        35   40   45
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
    50   55   60
Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
65   70   75   80
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
                85   90   95
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
            100   105   110
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
        115   120   125
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
    130   135   140
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145   150   155   160
Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
                165   170   175
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
            180   185   190
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
        195   200   205
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
    210   215   220
Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp
225   230   235   240
Gly Gly Gly Gly Gly
                245

<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> G-spacer flexible spacer

<400> 57
Gly Gly Gly Gly
 1

<210> 58
<211> 5

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> G-spacer flexible spacer

<400> 58
Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A-spacer flexible spacer

<400> 59
Ala Ala Ala Ala
 1

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A-spacer flexible spacer

<400> 60
Ala Ala Ala Ala Val
 1   5

<210> 61
<211> 3359
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 61
gtcgaggtgc tcatagtgga gccctggctc ccgggcggac ggagccgcac ggtagtagat 60
gggggtgtgg ccgtggcccc cgactctgct cggcggggcc gttcctgctt tgccatccgt 120
gtgggacttc cacgacagtg gaggcacgag agctgggccc catatgctgc ttgcccagct 180
tgggaaagag gaggctgctg caaaggaccg atcggcggct tcgggctgcc ggctcactcg 240
gctgctgcgt ctggtctggc gtctgctgag aagatcctct tctaccctgc tctgcacctg 300
tgctcgactg ccagccggct gagggcgggg gtctccacgg tggtcccagc tcccaaggag 360
gttgcagaag taccgtacag agtggatttg cagggcagtg gcatggagcc cctcttcccc 420
gcgccgttct gggaggttat ctacggcagc caccttcagg gcaacctgtc cctcctgagc 480
cccaaccaca gtctgctgcc cccgcatctg ctgctcaatg ccagccacgg cgccttcctg 540
cccctcgggc tcaaggtcac catcgtgggg ctctacctgg ccgtgtgtgt cggagggctc 600
ctggggaact gccttgtcat gtacgtcatc ctcaggcaca ccaaaatgaa gacagccacc 660
aatatttaca tctttaacct ggccctggcc gacactctgg tcctgctgac gctgcccttc 720
cagggcacgg acatcctcct gggcttctgg ccgtttggga atgcgctgtg caagacagtc 780
attgccattg actactacaa catgttcacc agcaccttca ccctaactgc catgagtgtg 840
gatcgctatg tagccatctg ccaccccatc cgtgccctcg acgtccgcac gtccagcaaa 900
gcccaggctg tcaatgtggc catctgggcc ctggcctctg ttgtcggtgt tcccgttgcc 960

atcatgggct cggcacaggt cgaggatgaa gagatcgagt gcctggtgga gatccctacc 1020
cctcaggatt actggggccc ggtgtttgcc atctgcatct tcctcttctc cttcatcgtc 1080
cccgtgctcg tcatctctgt ctgctacagc ctcatgatcc ggcggctccg tggagtccgc 1140
ctgctctcgg gctcccgaga gaaggaccgg aacctgcggc gcatcactcg gctggtgctg 1200
gtggtagtgg ctgtgttcgt gggctgctgg acgcctgtcc aggtcttcgt gctggcccaa 1260
gggctggggg ttcagccgag cagcgagact gccgtggcca ttctgcgctt ctgcacggcc 1320
ctgggctacg tcaacagctg cctcaacccc atcctctacg ccttcctgga tgagaacttc 1380
aaggcctgct tccgcaagtt ctgctgtgca tctgccctgc gccgggacgt gcaggtgtct 1440
gaccgcgtgc gcagcattgc caaggacgtg gccctggcct gcaagacctc tgagacggta 1500
ccgcggcccg catgactagg cgtggacctg cccatggtgc ctgtcagccc gcagagccca 1560
tctacgccca acacagagct cacacaggtc actgctctct aggcggacac accctgggcc 1620
ctgagcatcc agagcctggg atgggctttt ccctgtgggc cagggatgct cggtcccaga 1680
ggaggaccta gtgacatcat gggacaggtc aaagcattag ggccacctcc atggccccag 1740
acagactaaa gctgccctcc tggtgcaggg ccgaggggac acaaggacct acctggaagc 1800
agctgacatg ctggtggacg gccgtgactg gagcccgtgc ccctccctcc ccgtgcttca 1860
tgtgactctt ggcctctctg ctgctgcgtt ggcagaaccc tgggtgggca ggcacccgga 1920
ggaggagcag cagctgtgtc atcctgtgcc ccccatgtgc tgtgtgctgt ttgcatggca 1980
gggctccagc tgccttcagc cctgtgacgt ctcctcaggg cagctggaca ggcttggcac 2040
tgcccgggaa gtgcagcagg cagcttttct ttggggtggg acttgccctg agcttggagc 2100
tgccacctgg aggacttgcc tgttccgact ccacctgtgc agccggggcc accccaggag 2160
aaagtgtcca ggtgggggct ggcagtccct ggctgcagac cccgagctgg ccctgggcca 2220
gccgcacctc tgaaggtttt ctgtgtgctg cacggtgcag gcctcatccc tgactgcagc 2280
ttgactctgg gcccaacccc catttccctt caggagacca gcgagaggcc ctggcccatt 2340
ccctccagcg gtgcaatgaa ctatcatgct gtggaccgtc aacccagccc tgcttctcag 2400
tgtggggcag gtgtctcagg acgaaggcgc cgcgtgacca catgggcagc tctgttcaca 2460
aagtggaggc ctcgttttcc tggtcttgac tgctctgttt gggtgggaga agattctctg 2520
ggggtcccca catcctccca aggctccgct cacagcctct cctttgcttg aagccagagg 2580
tcagtggccg tgctgtgttg cgggggaagc tgtgtggaag gagaagctgg tggccacagc 2640
agagtcctgc tctggggacg cctgcttcat ttacaagcct caagatggct ctgtgtaggg 2700
cctgagcttg ctgcccaacg ggaggatggc ttcacagcag agccagcatg aggggtgggg 2760
cctggcaggg cttgcttgag ccaaactgca aaggctgtgg tggctgtgag gacactgcgg 2820
gggttggggg gggggcgtct gtacctcagg ggatgccccg ctgtggtcac ccagagaatc 2880
acccttcctg gtctacagat ggaagctgca ggttggtgac tttgcaaatg cacttcctac 2940
agatgaacta ttaaaagacc tgcaacattg aaaaaactca ttttttccac caaaaccttg 3000
gccaggtaac ctaccttagg cacctgcaaa gaacaggaag tgatggctgt ctcgcaacag 3060
agcctgggct gctcctcctg ctctggggag tctaggccgt ggggactgtt ctggggaggc 3120
tcatgctgtc tccatgacgt ctgtggcagg agtccctgag gacgggagct gcctagctac 3180
agttttcttg ccaaggcgag gtgttttgtg aatctgtgct gatgtaatgt gcaccttcac 3240
gtatttatgc atgtggcaag cgttacttcc tgtgcacgta gccagccctg ggtctgtctc 3300
tggggtaatg aaaaaggacc ctaataaaca cctgctcact ggctgggtat tcttcgtaa 3359

<210> 62
<211> 1134
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 62
ttgcagggca gtggcatgga gcccctcttc cccgcgccgt tctgggaggt tatctacggc 60
agccaccttc agggcaacct gtccctcctg agccccaacc acagtctgct gccccccgcat 120
ctgctgctca atgccagcca cggcgccttc ctgcccctcg ggctcaaggt caccatcgtg 180
gggctctacc tggccgtgtg tgtcggaggg ctcctgggga actgccttgt catgcacacc 240
aaaatgaaga cagccaccaa tatttacatc tttaacctgg ccctggccga cactctggtc 300
ctgctgacgc tgcccttcca gggcacggac atcctcctgg gcttctggcc gtttgggaat 360
gcgctgtgca agacagtcat tgccattgac tactacaaca tgttcaccag caccttcacc 420
ctaactgcca tgagtgtgga tcgctatgta gccatctgcc accccatccg tgccctcgac 480
gtccgcacgt ccagcaaagc ccaggctgtc aatgtggcca tctgggccct ggcctctgtt 540
gtcggtgttc ccgttgccat catgggctcg gcacaggtcg aggatgaaga gatcgagtgc 600
ctggtggaga tccctaccc tcaggattac tggggcccgg tgtttgccat ctgcatcttc 660
ctcttctcct tcatcgtccc cgtgctcgtc atctctgtct gctacagcct catgatccgg 720

cggctccgtg gagtccgcct gctctcgggc tcccgagaga aggaccggaa cctgcggcgc 780
atcactcggc tggtgctggt ggtagtggct gtgttcgtgg gctgctggac gcctgtccag 840
gtcttcgtgc tggcccaagg gctgggggtt cagccgagca gcgagactgc cgtggccatt 900
ctgcgcttct gcacggccct gggctacgtc aacagctgcc tcaaccccat cctctacgcc 960
ttcctggatg agaacttcaa ggcctgcttc cgcaagttct gctgtgcatc tgccctgcgc 1020
cgggacgtgc aggtgtctga ccgcgtgcgc agcattgcca aggacgtggc cctggcctgc 1080
aagacctctg agacggtacc gcggcccgca tgactaggcg tggacctgcc catg 1134

<210> 63
<211> 1774
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 63
ccgaggagcc tgcggctgct cctggctcac agcgctccgg gcgaggagag cgggcggacg 60
ccgggggctg ggccggtgcg ggcggcgagg caggcggacg aggcgcagag acagcggggc 120
ggccggggcg cggcagccgg cggcgtcggg gccgcggcct ctgccttgcc gctcccctcg 180
cgtcggatcc ccgcgcccag ggcgcacggt ggagagggac gcggcggagc cggccggcag 240
ccatggaacc ggcccccctcc gccggcgccg agctgcagcc cccgctcttc gccaacgcct 300
cggacgccta ccctagcgcc tgccccagcg ctggcgccaa tgcgtcgggg ccgccaggcg 360
cgcggagcgc ctcgtccctc gccctggcaa tcgccatcac cgcgctctac tcggccgtgt 420
gcgccgtggg gctgctgggc aacgtgcttg tcatgttcgg catcgtccgg tacactaaga 480
tgaagacggc caccaacatc tacatcttca acctggcctt agccgatgcg ctggccacca 540
gcacgctgcc tttccagagt gccaagtacc tgatggagac gtggcccttc ggcgagctgc 600
tctgcaaggc tgtgctctcc atcgactact acaatatgtt caccagcatc ttcacgctca 660
ccatgatgag tgttgaccgc tacatcgctg tctgccaccc tgtcaaggcc ctggacttcc 720
gcacgcctgc caaggccaag ctgatcaaca tctgtatctg ggtcctggcc tcaggcgttg 780
gcgtgcccat catggtcatg gctgtgaccc gtccccggga cggggcagtg gtgtgcatgc 840
tccagttccc cagccccagc tggtactggg acacggtgac caagatctgc gtgttcctct 900
tcgccttcgt ggtgcccatc ctcatcatca ccgtgtgcta tggcctcatg ctgctgcgcc 960
tgcgcagtgt gcgcctgctg tcgggctcca aggagaagga ccgcagcctg cggcgcatca 1020
cgcgcatggt gctggtggtt gtgggcgcct tcgtggtgtg ttgggcgccc atccacatct 1080
tcgtcatcgt ctggacgctg gtggacatcg accggcgcga cccgctggtg gtggctgcgc 1140
tgcacctgtg catcgcgctg ggctacgcca atagcagcct caaccccgtg ctctacgctt 1200
tcctcgacga gaacttcaag cgctgcttcc gccagctctg ccgcaagccc tgcggccgcc 1260
cagaccccag cagcttcagc cgcgcccgcg aagccacggc ccgcgagcgt gtcaccgcct 1320
gcaccccgtc cgatggtccc ggcggtggcg ctgccgcctg accaggccat ccggccccca 1380
gagcgccccct ccctagtgac ccggaggcca catgagtccc agtgggaggc gcgagccatg 1440
atgtggagtg gggcagtaga aggtcggagg cttgggaccg ccagatgggg cctctgtttc 1500
ggagacggga ccgggccgct agatgggcat ggggtgggcc tctggtttgg ggcgaggcag 1560
aggacagatc aatggcgcag tgcctctggt ctgggtgccc cgtccacggc tctaggtggg 1620
gcgggaaagc cagtgactcc aggagaggag cgggacctgt ggctctacaa ctgagtcctt 1680
aaacagggca tctccaggaa ggcggggctt caaccttgag acagcttcgg tttctaactt 1740
ggagccggac tttcggagtt gggggtccgg gccc 1774

<210> 64
<211> 1773
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 64
ccgaggagcc tgcgctgctc ctggctcaca gcgctccggg cgaggagagc gggcggaccg 60
gggggctggg ccggtgcggg cggcgaggca ggcggacgag gcgcagagac agcggggcgg 120
ccggggcgcg gcacgcggcg ggtcggggcc ggcctctgcc ttgccgctcc cctcgcgtcg 180
gatccccgcg cccaggcagc cggtggagag ggacgcggcg gacgccggca gccatggaac 240
cggcccccctc cgccggcgcc gagctgcagc ccccgctctt cgccaacgcc tcggacgcct 300
accctagcgc cttccccagc gctggcgcca atgcgtcggg gccgccaggc gcgcggagcg 360
cctcgtccct cgccctggca atcgccatca ccgcgctcta ctcggccgtg tgcgccgtgg 420
ggctgctggg caacgtgctt gtcatgttcg gcatcgtccg gtacactaag atgaagacgg 480

ccaccaacat ctacatcttc aacctggcct tagccgatgc gctggccacc agcacgctgc 540
ctttccagag tgccaagtac ctgatggaga cgtggccctt cggcgagctg ctctgcaagg 600
ctgtgctctc catcgactac tacaatatgt tcaccagcat cttcacgctc accatgatga 660
gtgttgaccg ctacatcgct gtctgccacc ctgtcaaggc cctggacttc cgcacgcctg 720
ccaaggccaa gctgatcaac atctgtatct gggtcctggc ctcaggcgtt ggcgtgccca 780
tcatggtcat ggctgtgacc cgtccccggg acggggcagt ggtgtgcatg ctccagttcc 840
ccagccccag ctggtactgg gacacggtga ccaagatctg cgtgttcctc ttcgccttcg 900
tggtgcccat cctcatcatc accgtgtgct atggcctcat gctgctgcgc ctgcgcagtg 960
tgcgcctgct gtcgggctcc aaggagaagg accgcagcct gcggcgcatc acgcgcatgg 1020
tgctggtggt tgtgggcgcc ttcgtggtgt gttgggcgcc catccacatc ttcgtcatcg 1080
tctggacgct ggtggacatc gaccggcgcg acccgctggt ggtggctgcg ctgcacctgt 1140
gcatcgcgct gggctacgcc aatagcagcc tcaaccccgt gctctacgct ttcctcgacg 1200
agaacttcaa gcgctgcttc cgccagctct gccgcaagcc ctgcggccgc ccagacccca 1260
gcagcttcag ccgcgcccgc gaagccacgg cccgcgagcg tgtcaccgcc tgcaccccgt 1320
ccgatggtcc cggcggtggc gctgccgcct gaccaggcca tccggccccc agacgcccct 1380
ccctagttgt acccggaggc cacatgagtc ccagtgggag gcgcgagcca tgatgtggag 1440
tggggccagt agataggtcg gagggctttg ggaccgccag atggggcctc tgtttcggag 1500
acgggaccgg gccgctagat gggcatgggg tgggcctctg gtttggggcg aggcagagga 1560
cagatcaatg gcgcagtgcc tctggtctgg gtgccccccgt ccacggctct aggtggggcg 1620
ggaaagccag tgactccagg agaggagcgg gacctgtggc tctacaactg agtccttaaa 1680
cagggcatct ccaggaaggc ggggcttcaa ccttgagaca gcttcggttt ctaacttgga 1740
gccggacttt cggagttggg gggtccgggg ccc 1773

<210> 65
<211> 1154
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 65
atggactccc cgatccagat cttccgcggg gagccgggcc ctacctgcgc cccgagcgcc 60
tgcctgcccc ccaacagcag cgcctggttt cccggctggg ccgagcccga cagcaacggc 120
agcgccggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc catcccggtc 180
atcatcacgg cggtctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tggtgggcaa ctcgctggtc 240
atgttcgtga tcatccgata cacaaagatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300
ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac ggtctacttg 360
atgaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480
tgccaccccg tgaaggcttt ggacttccgc acacccttga aggcaaagat catcaatatc 540
tgcatctggc tgctgtcgtc atctgttggc atctctgcaa tagtccttgg aggcaccaaa 600
gtcagggaag acgtcgatgt cattgagtgc tccttgcagt tcccagatga tgactactcc 660
tggtgggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcatctttg ccttcgtgat ccctgtcctc 720
atcatcatcg tctgctacac cctgatgatc ctgcgtctca agagcgtccg gctcctttct 780
ggctcccgag agaaagatcg caacctgcgt aggatcacca gactggtcct ggtggtggtg 840
gcagtcttcg tcgtctgctg gactcccatt cacatattca tcctggtgga ggctctgggg 900
agcacctccc acagcacagc tgctctctcc agctattact tctgcatcgc cttaggctat 960
accaacagta gcctgaatcc cattctctac gcctttcttg atgaaaactt caagcggtgt 1020
ttccgggact tctgctttcc actgaagatg aggatggagc ggcagagcac tagcagagtc 1080
cgaaatacag ttcaggatcc tgcttacctg agggacatcg atgggatgaa taaaccagta 1140
tgactagtcg tgga 1154

<210> 66
<211> 1143
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 66
atggaatccc cgattcagat cttccgcggg gagccgggcc ctacctgcgc cccgagcgcc 60
tgcctgcccc ccaacagcag cgcctggttt cccggctggg ccgagcccga cagcaacggc 120
agcgccggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc catcccggtc 180

atcatcacgg cggtctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tggtgggcaa ctcgctggtc 240
atgttcgtga tcatccgata cacaaagatg aagacagcaa ccaacattta catatttaac 300
ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac ggtctacttg 360
atgaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta cattgccgtg 480
tgccaccccg tgaaggcttt ggacttccgc acacccttga aggcaaagat catcaatatc 540
tgcatctggc tgctgtcgtc atctgttggc atctctgcaa tagtccttgg aggcaccaaa 600
gtcagggaag acgtcgatgt cattgagtgc tccttgcagt tcccagatga tgactactcc 660
tggtgggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcatctttg ccttcgtgat ccctgtcctc 720
atcatcatcg tctgctacac cctgatgatc ctgcgtctca agagcgtccg gctcctttct 780
ggctcccgag agaaagatcg caacctgcgt aggatcacca gactggtcct ggtggtggtg 840
gcagtcttcg tcgtctgctg gactcccatt cacatattca tcctggtgga ggctctgggg 900
agcacctccc acagcacagc tgctctctcc agctattact tctgcatcgc cttaggctat 960
accaacagta gcctgaatcc cattctctac gcctttcttg atgaaaactt caagcggtgt 1020
ttccgggact tctgctttcc actgaagatg aggatggagc ggcagagcac tagcagagtc 1080
cgaaatacag ttcaggatcc tgcttacctg agggacatcg atgggatgaa taaaccagta 1140
tga 1143

<210> 67
<211> 2738
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 67
cctgtaaaga aaatgatgag ggctaaatcc atcagcacca aagctgggaa gccctccagg 60
ttcatttgga agaaaatact cctctgagct caaaggaagt gtgatctgtc acaatattgt 120
atgcctgcac taagtttgca tcctgaaaac tcactggaag ataggaaagc aagcatgaaa 180
aagcagccgg gtcagacagg cttctggatt cagtgtgtgg acatgacttt gcctgcatga 240
attgcccctt tctcctacaa acaagagaat tcggtcaagt ggatgtggca gaactgggct 300
gctctgagat gatagaaaag ggctcctgct tttcctgtaa ttgcagcccc ttgttcttgt 360
ggttgctaca tgcaataaat gtaattctat gagaaggacc agcccttaca tcccatcaaa 420
atgtttcctg gaaacctgga gcacagaact ctgatatcct ctcacactgt ggcaggagaa 480
gcagcacaag gcacaatgct gaaatagcat ggtccaggat gtgtttgcac agaagagtgc 540
ccagtgaaga gacctactcc ttggatcgct ttgcgcaaaa tccacccctt ttccctcctc 600
cctcccttcc agcctccgaa tcccgcatgg cccacgctcc cctcctgcag cggtgcgggg 660
cagccaggac tggtttctgt aagaaacagc aggagctgtg gcagcggcga aaggaagcgg 720
ctgaggcgct tggaacccga aaagtctcgg tgctcctggc tacctcgcac agcggtgccc 780
gcccggccgt cagtaccatg gacagcagcg ctgcccccac gaacgccagc aattgcactg 840
atgccttggc gtactcaagt tgctccccag cacccagccc cggttcctgg gtcaacttgt 900
cccacttaga tggcaacctg tccgacccat gcggtccgaa ccgcaccgac ctgggcggga 960
gagacagcct gtgccctccg accggcagtc cctccatgat cacggccatc acgatcatgg 1020
ccctctactc catcgtgtgc gtggtggggc tcttcggaaa cttcctggtc atgtatgtga 1080
ttgtcagata caccaagatg aagactgcca ccaacatcta cattttcaac cttgctctgg 1140
cagatgcctt agccaccagt accctgccct tccagagtgt gaattaccta atgggaacat 1200
ggccatttgg aaccatcctt tgcaagatag tgatctccat agattactat aacatgttca 1260
ccagcatatt caccctctgc accatgagtg ttgatcgata cattgcagtc tgccaccctg 1320
tcaaggcctt agatttccgt actccccgaa atgccaaaat tatcaatgtc tgcaactgga 1380
tcctctcttc agccattggt cttcctgtaa tgttcatggc tacaacaaaa tacaggcaag 1440
gttccataga ttgtacacta acattctctc atccaacctg gtactgggaa aacctgctga 1500
agatctgtgt tttcatcttc gccttcatta tgccagtgct catcattacc gtgtgctatg 1560
gactgatgat cttgcgcctc aagagtgtcc gcatgctctc tggctccaaa gaaaaggaca 1620
ggaatcttcg aaggatcacc aggatggtgc tggtggtggt ggctgtgttc atcgtctgct 1680
ggactcccat tcacatttac gtcatcatta aagccttggt tacaatccca gaaactacgt 1740
tccagactgt ttcttggcac ttctgcattg ctctaggtta cacaaacagc tgcctcaacc 1800
cagtccttta tgcatttctg gatgaaaact tcaaacgatg cttcagagag ttctgtatcc 1860
caacctcttc caacattgag caacaaaact ccactcgaat tcgtcagaac actagagacc 1920
acccctccac ggccaataca gtggatagaa ctaatcatca gctagaaaat ctggaagcag 1980
aaactgctcc gttgccctaa cagggtctca tgccattccg accttcacca agcttagaag 2040
ccaccatgta tgtggaagca ggttgcttca agaatgtgta ggaggctcta attctctagg 2100

aaagtgcctg cttttaggtc atccaacctc tttcctctct ggccactctg ctctgcacat 2160
tagagggaca gccaaaagta agtggagcat ttggaaggaa aggaatatac cacaccgagg 2220
agtccagttt gtgcaagaca cccagtggaa ccaaaaccca tcgtggtatg tgaattgaag 2280
tcatcataaa aggtgaccct tctgtctgta agattttatt ttcaagcaaa tatttatgac 2340
ctcaacaaag aagaaccatc ttttgttaag ttcaccgtag taacacataa agtaaatgct 2400
acctctgatc aaagcacctt gaatggaagg tccgagtctt tttagtgttt tgcaagggaa 2460
tgaatccatt attctatttt agacttttaa cttcacctta aaattagcat ctggctaagg 2520
catcattttc acctccattt cttggttttg tattgtttaa aaaaataaca tctctttcat 2580
ctagctccat aattgcaagg gaagagatta gcatgaaagg taatctgaaa cacagtcatg 2640
tgtcagctgt agaaaggttg attctcatgc actgcaaata cttccaaaga gtcatcatgg 2700
gggatttttc attcttaggc tttcagtggt ttgttcct 2738

<210> 68
<211> 2053
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 68
catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
gctgtctttc cttccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacccgtcac tgacccccca 180
gcccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg gaaagcaccc 300
gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctcgatcgtg tcgaagaagg catgaaccat atcaaccaag 420
acatgaagga ggctgagaaa aatttaaaag atttagggaa atgctgtggc cttttcatat 480
gtccttgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtggt ggccagccag cctgctcgtg tagtggacga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggctt catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aaatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaagtggt taagtgtgcc 840
cacccgtgtt ctcctccaaa tgctgtcggg caagatagct ccttcatgct tttctcatgg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtcc acccccattg tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttggtctct 1020
ttctttccaa aggttgtaca tagtggtcat ttggtggctc taactccttg atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcggtggc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtcc tttgagtgtc aggctctgaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttcctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcatg attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgcactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380
atttttagat tcctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact tttttcctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tccttttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatatgtt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtgtggatg taaattttat aaggctgact cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtac aattctttgt tgcttaatct agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaatatt aaattcctcc 1980
tgtctcctct gtcagtttgt gaagtgattg acattttgta gctagtttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc 2053

<210> 69
<211> 2053
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 69
catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg gaggtcaggc 60
gctgtctttc cttccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacccgtcac tgacccccca 180
gcccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg gaaagcaccc 300
gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctggaacgca ttgaggaagg gatggaccaa atcaataagg 420
acatgaaaga agcagaaaag aatttgacgg acctaggaaa attctgcggg ctttgtgtgt 480
gtccctgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc aataatcagg 540
acggagtggt ggccagccag cctgctcgtg tagtggacga acgggagcag atggccatca 600
gtggcggctt catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aaatgaaatg gatgaaaacc 660
tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaagtggt taagtgtgcc 840
cacccgtgtt ctcctccaaa tgctgtcggg caagatagct ccttcatgct tttctcatgg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtcc acccccattg tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct cttggtctct 1020
ttctttccaa aggttgtaca tagtggtcat ttggtggctc taactccttg atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcggtggc atttgctgaa taacaacaat ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtcc tttgagtgtc aggctctgaa tctctcaaaa tgtgccgtct 1260
ttggttcctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcatg attagacaat gtggaattac 1320
ataacaggca ttgcactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag aactaaatag 1380
atttttagat tcctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg atgagacaac 1440
acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact tttttcctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tccttttta aaaaaaagaa ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatatgtt tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtgtggatg taaattttat aaggctgact cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtac aattctttgt tgcttaatct agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaatatt aaattcctcc 1980
tgtctcctct gtcagtttgt gaagtgattg acattttgta gctagtttaa aattattaaa 2040
aattatagac tcc 2053

<210> 70
<211> 266
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70
Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
 1   5   10   15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
            20   25   30
Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu
        35   40   45
Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
    50   55   60
Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
65   70   75   80
Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
                85   90   95
Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr
            100   105   110
Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
        115   120   125

```
Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
    130                 135                 140
Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
145                 150                 155                 160
Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys
                165                 170                 175
Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
            180                 185                 190
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
        195                 200                 205
Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
    210                 215                 220
Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
225                 230                 235                 240
Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Gly Glu Ser Ala Ser Pro Arg
                245                 250                 255
Val Ala Ala Ala Tyr Gln Pro Ile Leu Ala
            260                 265
```

<210> 71
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 71
caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaagg cttctggcta catcttcact gaccatgctc ttcactgggt gaggcagaag 120
cctgaacagg gcctggaatg gattgggtat atttttcccg gaaatggtaa tattgagtac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag tactgcctac 240
atgcagctca acagcctgac atctggagat tctgcaatgt atttctgtaa aaagatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

<210> 72
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 72
```
Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His
            20                  25                  30
Ala Leu His Trp Val Arg Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
                85                  90                  95
Lys Lys Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 73
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 73
caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
tcctgcaagg cttctggtta caccttcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagaag 120
cctggacagg gcctagaatg gattggatat ctttttcccg gaaatggtaa ttttgaatat 180
aatgagaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
atgcacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaagatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

<210> 74
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 74
Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
            20   25   30
Ser Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35   40   45
Gly Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
    50   55   60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65   70   75   80
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85   90   95
Lys Lys Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
            100   105   110

<210> 75
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 75
caggttcagc tgcagcagtc cgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaggg cttctggcta caccttcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagcag 120
cctggccagg gcctggaatg gatcggatat atttttcccg gaaatggaaa tattgaatac 180
aatgacaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccgg cactgcctac 240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300
tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctca 336

<210> 76
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 76
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
            20   25   30
Ser Ile His Trp Val Lys Gln Gln Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35   40   45
Gly Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Asp Lys Phe
    50   55   60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Gly Thr Ala Tyr

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

<210> 77
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 77
caggtcaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagatc 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gaccattcta ttcactgggt gaagcagaag 120
cctggacagg gcctagaatg gattggatat ctttttcccg gaaatggtaa ttttgagtac 180
aatgaaaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgtctac 240
atgtacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aaggatgggg 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

<210> 78
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 78
Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30
Ser Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Tyr Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Lys Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 79
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 79
caggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

<210> 80
<211> 112

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 80
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20   25   30
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35   40   45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
    50   55   60
Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65   70   75   80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Arg Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100   105   110

<210> 81
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 81
caggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaatgggg 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca   336

<210> 82
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 82
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20   25   30
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35   40   45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
    50   55   60
Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65   70   75   80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100   105   110

<210> 83
<211> 342
<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 83
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300
cctacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ct 342

<210> 84
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 84
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1   5   10   15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
            20   25   30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35   40   45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50   55   60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65   70   75   80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
                85   90   95
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100   105   110
Arg

<210> 85
<211> 324
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 85
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gaacaactga aaatatttac agttattttg tatggtctca gcagagacag 120
ggaaaatctc ctcagctccg ggtctataat gcaaaatcct tagcagaagg tgtgccatca 180
agtttcaatg tcagtgtatc aggcacacag ttttctctga agatcaatag cctgcagcct 240
gaagattttg ggacttatca ctgtcaacac cattatggta ctccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaggc tggaaataag acgg 324

<210> 86
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 86
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
            20   25   30
Phe Val Trp Ser Gln Gln Arg Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Arg Val
        35   40   45

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

<210> 87
<211> 339
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 87
gatgttttg atgacccaaac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcttcc 60
atctcttgc aagtccagtca gagcctctta tatactaatg gaaaaaccta tttgacttgg 120
ttattccag aggccaggcca gtctccaaaa cgcctaatct atctggtgtc tgaattggac 180
tctggagtc cctgacaggtt cagtggcagt ggttcaggga cagatttcac actggaaatc 240
accagagtg gaggctgagga tttgggagtt tattactgct tgcagagtgc acattttcca 300
ttcacgttc ggctcgggcac caagctggaa atcaaacgg 339

<210> 88
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 88
```
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1               5                  10                  15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
            20                  25                  30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile
65                  70                  75                  80
Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
                85                  90                  95
Ala His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
Arg
```

<210> 89
<211> 339
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 89
gatgttgtga tgacccaaac tccactcact ctgtcggtga ccattggaca accagcgttc 60
atctcttgca agtccagtca gagcctcttt aacactaatg gcaaaaccta tttgacttgg 120
ttaattcaga ggccaggcca gtctccacag cgcctgatct atctggtgtc caaattggac 180
tctggcgtcc cggacaggtt cagtggcagt ggctcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgcc tgcagagtag ccattttccg 300
tttacgttcg gctcgggcac caagctggaa atcaaacgg 339

<210> 90
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 90
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1   5   10   15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr
            20   25   30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Ile Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35   40   45
Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50   55   60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65   70   75   80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
                85   90   95
Ser His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100   105   110
Arg

<210> 91
<211> 327
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 91
gatgttgtgc taactcagtc tcctgccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtcagt 60
ctttcctgca gggccagcca aaatattggc aactacctac actggtatca acagaaatca 120
catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc 180
aggttcagtg gcagtggatc agtcacagat ttcactctca atatcaacag tgtggagact 240
gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtgacacct ggcctctcac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa acgggct   327

<210> 92
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 92
Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Asn Tyr
            20   25   30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
        35   40   45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Thr
65   70   75   80
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Thr Trp Pro Leu
                85   90   95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
            100   105

<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 93
Thr Phe Thr Asp His Ser Ile His
 1   5

<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 94
Thr Phe Thr Asn Tyr Val Ile His
 1   5

<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 95
Ile Phe Thr Asp His Ala Leu His
 1   5

<210> 96
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 96
Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Asp Lys Phe Lys
 1   5   10   15
Gly

<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 97
Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1   5   10   15
Gly

<210> 98
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 98
Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1   5   10   15
Gly

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 99
Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1   5   10   15
Gly

<210> 100
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 100
Lys Arg Met Gly Tyr
 1   5

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 101
Lys Lys Met Asp Tyr
 1   5

<210> 102
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 102
Ala Arg Met Asp Tyr
 1   5

<210> 103
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 103
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1   5   10   15

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 104
Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Phe Val
 1   5   10

<210> 105
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 105
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
 1   5   10   15

<210> 106
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 106
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
 1   5   10   15

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 107
Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Asn Tyr Leu His
 1   5   10

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 108
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1   5

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 109
Asn Ala Lys Ser Leu Ala Glu
 1   5

<210> 110
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 110
Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser
 1   5

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 111
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1   5

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 112
Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1   5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 113
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
 1   5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 114
Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr
 1   5

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 115
Leu Gln Ser Ala His Phe Pro Phe Thr
 1   5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 116
Leu Gln Ser Ser His Phe Pro Phe Thr
 1   5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 117
Gln Gln Ser Asp Thr Trp Pro Leu Thr
 1   5

<210> 118
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 118
Asp His Ser Ile His
 1   5

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 119
Asn Tyr Val Ile His
 1   5

<210> 120
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 120
Asp His Ala Leu His
 1   5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 121
Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu

1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 122
Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu
1 5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 123
Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys
1 5

<210> 124
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 124
His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 125
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 125
Ser Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 126
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 126
Glu Asn Ile Tyr Ser
1 5

<210> 127
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 127

Thr Ser Gly Tyr Ser
1 5

<210> 128
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 128
Gln Asp Ile Lys Ser
1 5

<210> 129
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 129
Gln Asn Ile Gly Asn
1 5

<210> 130
<211> 911
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Retargeted endopeptidase

<400> 130
Ile Ser Glu Phe Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr
1 5 10 15
Lys Asp Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn
20 25 30
Ala Gly Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile
35 40 45
Trp Val Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp
50 55 60
Leu Asn Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp
65 70 75 80
Ser Thr Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly
85 90 95
Val Thr Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met
100 105 110
Leu Leu Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr
115 120 125
Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile
130 135 140
Gln Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile
145 150 155 160
Gly Pro Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His
165 170 175
Glu Val Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile
180 185 190
Arg Phe Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val
195 200 205

Asp Thr Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala
210 215 220
Val Thr Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly
225 230 235 240
Ile Ala Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr
245 250 255
Tyr Glu Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe
260 265 270
Gly Gly His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe
275 280 285
Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn
290 295 300
Lys Ala Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys
305 310 315 320
Asn Val Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys
325 330 335
Phe Ser Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr
340 345 350
Glu Ile Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn
355 360 365
Arg Lys Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile
370 375 380
Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn
385 390 395 400
Thr Asn Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn
405 410 415
Met Asn Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr
420 425 430
Lys Leu Leu Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu
435 440 445
Ile Glu Gly Arg Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg
450 455 460
Lys Arg Lys Asn Gln Ala Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
465 470 475 480
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val
485 490 495
Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn
500 505 510
Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala
515 520 525
Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr
530 535 540
Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser
545 550 555 560
Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe
565 570 575
Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr
580 585 590
Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr
595 600 605
Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe
610 615 620
Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala
625 630 635 640
Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu
645 650 655
Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile
660 665 670
Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys

```
        675                 680                 685
Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu
    690                 695                 700
Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu
705                 710                 715                 720
Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn
                725                 730                 735
Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile
            740                 745                 750
Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg
        755                 760                 765
Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala
    770                 775                 780
Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn
785                 790                 795                 800
Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile
                805                 810                 815
Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val
            820                 825                 830
Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu
        835                 840                 845
Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp
    850                 855                 860
Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val
865                 870                 875                 880
Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val
                885                 890                 895
Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
            900                 905                 910
```

<210> 131
<211> 904
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Retargeted endopeptidase

<400> 131

```
Met Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro
 1               5                  10                  15
Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln
            20                  25                  30
Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile
        35                  40                  45
Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro
    50                  55                  60
Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys
                85                  90                  95
Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr
            100                 105                 110
Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr
        115                 120                 125
Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp
    130                 135                 140
Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser
```

```
145                 150                 155                 160
Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu
                165                 170                 175
Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser
            180                 185                 190
Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn
        195                 200                 205
Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu
    210                 215                 220
Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile
225                 230                 235                 240
Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met
                245                 250                 255
Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His
            260                 265                 270
Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr
        275                 280                 285
Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys
    290                 295                 300
Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe
305                 310                 315                 320
Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val
                325                 330                 335
Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr
            340                 345                 350
Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr
        355                 360                 365
Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys
    370                 375                 380
Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu
385                 390                 395                 400
Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe
                405                 410                 415
Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu
            420                 425                 430
Cys Val Asp Gly Gly Gly Gly Ser Ala Asp Asp Asp Asp Lys Gly Trp
        435                 440                 445
Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Val Ala Leu
    450                 455                 460
Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
465                 470                 475                 480
Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
                485                 490                 495
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
            500                 505                 510
Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
        515                 520                 525
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
    530                 535                 540
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
545                 550                 555                 560
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
                565                 570                 575
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
            580                 585                 590
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
        595                 600                 605
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
    610                 615                 620
```

```
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
625                 630                 635                 640
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
                645                 650                 655
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
            660                 665                 670
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
        675                 680                 685
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
    690                 695                 700
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
705                 710                 715                 720
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
                725                 730                 735
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
            740                 745                 750
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
        755                 760                 765
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
    770                 775                 780
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
785                 790                 795                 800
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
                805                 810                 815
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
            820                 825                 830
Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
        835                 840                 845
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
    850                 855                 860
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
865                 870                 875                 880
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
                885                 890                 895
Thr Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
            900
```

<210> 132
<211> 360
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 132
caggtgaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcaaaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacatctc 300
gctaatacct actactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

<210> 133
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 133
```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15
```

```
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60
Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 134
```
Ala Arg Met Gly Tyr
 1               5
```

<210> 135
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 135
```
Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1               5                   10
```

<210> 136
<211> 349
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136
```
Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Trp Pro
 1               5                   10                  15
Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
            20                  25                  30
Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
        35                  40                  45
Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
    50                  55                  60
Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
65                  70                  75                  80
Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
                85                  90                  95
Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
            100                 105                 110
Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
        115                 120                 125
Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
```

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

<210> 137
<211> 349
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 137

```
Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Trp Pro
 1               5                  10                  15
Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
            20                  25                  30
Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
        35                  40                  45
Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
    50                  55                  60
Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
65                  70                  75                  80
Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
                85                  90                  95
Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
            100                 105                 110
Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
        115                 120                 125
Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
    130                 135                 140
Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp
145                 150                 155                 160
Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu
                165                 170                 175
Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro
            180                 185                 190
```

```
Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly
        195                 200                 205
Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu
    210                 215                 220
Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala
225                 230                 235                 240
Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Val Phe
                245                 250                 255
Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe
            260                 265                 270
Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala
        275                 280                 285
His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala
    290                 295                 300
Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys
305                 310                 315                 320
His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu Ser Lys Ser
                325                 330                 335
Arg Ile Asp Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val
            340                 345
```

<210> 138
<211> 349
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138

```
Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Cys Pro
 1               5                  10                  15
Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
            20                  25                  30
Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
        35                  40                  45
Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
    50                  55                  60
Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
65                  70                  75                  80
Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
                85                  90                  95
Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
            100                 105                 110
Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
        115                 120                 125
Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
    130                 135                 140
Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp
145                 150                 155                 160
Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu
                165                 170                 175
Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro
            180                 185                 190
Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly
        195                 200                 205
Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu
    210                 215                 220
Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala
225                 230                 235                 240
Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Val Phe
```

```
                245                 250                 255
Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe
            260                 265                 270
Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala
        275                 280                 285
His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala
    290                 295                 300
Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys
305                 310                 315                 320
His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu Asn Lys Ser
                325                 330                 335
Arg Ile Asp Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val
            340                 345
```

<210> 139
<211> 387
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 139

```
Met Asn Val Ser Gly Cys Pro Gly Ala Gly Asn Ala Ser Gln Ala Gly
 1               5                  10                  15
Gly Gly Gly Gly Trp His Pro Glu Ala Val Ile Val Pro Leu Leu Phe
            20                  25                  30
Ala Leu Ile Phe Leu Val Gly Thr Val Gly Asn Thr Leu Val Leu Ala
        35                  40                  45
Val Leu Leu Arg Gly Gly Gln Ala Val Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile
    50                  55                  60
Leu Asn Leu Gly Val Ala Asp Leu Cys Phe Ile Leu Cys Cys Val Pro
65                  70                  75                  80
Phe Gln Ala Thr Ile Tyr Thr Leu Asp Gly Trp Val Phe Gly Ser Leu
                85                  90                  95
Leu Cys Lys Ala Val His Phe Leu Ile Phe Leu Thr Met His Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Phe Thr Leu Ala Ala Val Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Arg
        115                 120                 125
Tyr Pro Leu His Ser Arg Glu Leu Arg Thr Pro Arg Asn Ala Leu Ala
    130                 135                 140
Ala Ile Gly Leu Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Phe Ser Gly Pro Tyr
145                 150                 155                 160
Leu Ser Tyr Tyr Arg Gln Ser Gln Leu Ala Asn Leu Thr Val Cys His
                165                 170                 175
Pro Ala Trp Ser Ala Pro Arg Arg Arg Ala Met Asp Ile Cys Thr Phe
            180                 185                 190
Val Phe Ser Tyr Leu Leu Pro Val Leu Val Leu Gly Leu Thr Tyr Ala
        195                 200                 205
Arg Thr Leu Arg Tyr Leu Trp Arg Ala Val Asp Pro Val Ala Ala Gly
    210                 215                 220
Ser Gly Ala Arg Arg Ala Lys Arg Lys Val Thr Arg Met Ile Leu Ile
225                 230                 235                 240
Val Ala Ala Leu Phe Cys Leu Cys Trp Met Pro His His Ala Leu Ile
                245                 250                 255
Leu Cys Val Trp Phe Gly Gln Phe Pro Leu Thr Arg Ala Thr Tyr Ala
            260                 265                 270
Leu Arg Ile Leu Ser His Leu Val Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Val Asn
        275                 280                 285
Pro Ile Val Tyr Ala Leu Val Ser Lys His Phe Arg Lys Gly Phe Arg
    290                 295                 300
```

Thr Ile Cys Ala Gly Leu Leu Gly Arg Ala Pro Gly Arg Ala Ser Gly
305 310 315 320
Arg Val Cys Ala Ala Ala Arg Gly Thr His Ser Gly Ser Val Leu Glu
325 330 335
Arg Glu Ser Ser Asp Leu Leu His Met Ser Glu Ala Ala Gly Ala Leu
340 345 350
Arg Pro Cys Pro Gly Ala Ser Gln Pro Cys Ile Leu Glu Pro Cys Pro
355 360 365
Gly Pro Ser Trp Gln Gly Pro Lys Ala Gly Asp Ser Ile Leu Thr Val
370 375 380
Asp Val Ala
385

<210> 140
<211> 368
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 140
Met Ala Asp Ala Gln Asn Ile Ser Leu Asp Ser Pro Gly Ser Val Gly
1 5 10 15
Ala Val Ala Val Pro Val Val Phe Ala Leu Ile Phe Leu Leu Gly Thr
20 25 30
Val Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala Val Leu Leu Gln Pro Gly Pro Ser
35 40 45
Ala Trp Gln Glu Pro Gly Ser Thr Thr Asp Leu Phe Ile Leu Asn Leu
50 55 60
Ala Val Ala Asp Leu Cys Phe Ile Leu Cys Cys Val Pro Phe Gln Ala
65 70 75 80
Thr Ile Tyr Thr Leu Asp Ala Trp Leu Phe Gly Ala Leu Val Cys Lys
85 90 95
Ala Val His Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Met Tyr Ala Ser Ser Phe Thr
100 105 110
Leu Ala Ala Val Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Arg His Pro Leu
115 120 125
Arg Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Arg Asn Ala Arg Ala Ala Val Gly
130 135 140
Leu Val Trp Leu Leu Ala Ala Leu Phe Ser Ala Pro Tyr Leu Ser Tyr
145 150 155 160
Tyr Gly Thr Val Arg Tyr Gly Ala Leu Glu Leu Cys Val Pro Ala Trp
165 170 175
Glu Asp Ala Arg Arg Arg Ala Leu Asp Val Ala Thr Phe Ala Ala Gly
180 185 190
Tyr Leu Leu Pro Val Ala Val Val Ser Leu Ala Tyr Gly Arg Thr Leu
195 200 205
Arg Phe Leu Trp Ala Ala Val Gly Pro Ala Gly Ala Ala Ala Ala Glu
210 215 220
Ala Arg Arg Arg Ala Thr Gly Arg Ala Gly Arg Ala Met Leu Ala Val
225 230 235 240
Ala Ala Leu Tyr Ala Leu Cys Trp Gly Pro His His Ala Leu Ile Leu
245 250 255
Cys Phe Trp Tyr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Pro Ala Thr Tyr Ala Cys
260 265 270
Arg Leu Ala Ser His Cys Leu Ala Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro
275 280 285
Leu Val Tyr Ala Leu Ala Ser Arg His Phe Arg Ala Arg Phe Arg Arg
290 295 300
Leu Trp Pro Cys Gly Arg Arg Arg Arg His Arg Ala Arg Arg Ala Leu

```
305                 310                 315                 320
Arg Arg Val Arg Pro Ala Ser Ser Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Asp
                325                 330                 335
Ala Arg Pro Ser Gly Arg Leu Leu Ala Gly Gly Gly Gln Gly Pro Glu
            340                 345                 350
Pro Arg Glu Gly Pro Val His Gly Gly Glu Ala Ala Arg Gly Pro Glu
        355                 360                 365
```

<210> 141
<211> 1050
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 141
atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gccccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt gctggcgcgc 180
agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctcgcccgtg gcctaccacc agggcctctt ccacccgcgc 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctcgccacaa gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tggtgtttgg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgct gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaca gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga   1050

<210> 142
<211> 1050
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 142
atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga gccccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt gctggcgcgc 180
agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctcgcccgtg gcctaccacc agggcctctt ccacccgcgc 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctcgccacaa gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tggtgtttgg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgct gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaca gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa gtaaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga   1050

<210> 143
<211> 1050
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 143
atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctgtccgga gccccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg cgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt gctggcgcgc 180
agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat cgtgcactcg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctcgcccgtg gcctaccacc agggcctctt ccacccgcgc 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctcgccacaa gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tggtgtttgg aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgct gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaca gcaattcctc cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaaagtcg aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga 1050

<210> 144
<211> 1164
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 144
atgaacgtct cgggctgccc aggggccggg aacgcgagcc aggcgggcgg cgggggaggc 60
tggcaccccg aggcggtcat cgtgcccctg ctcttcgcgc tcatcttcct cgtgggcacc 120
gtgggcaaca cgctggtgct ggcggtgctg ctgcgcggcg gccaggcggt cagcactacc 180
aacctgttca tccttaacct gggcgtggcc gacctgtgtt tcatcctgtg ctgcgtgccc 240
ttccaggcca ccatctacac cctggacggc tgggtgttcg gctcgctgct gtgcaaggcg 300
gtgcacttcc tcatcttcct caccatgcac gccagcagct tcacgctggc cgccgtctcc 360
ctggacaggt atctggccat ccgctacccg ctgcactccc gcgagctgcg cacgcctcga 420
aacgcgctgg cagccatcgg gctcatctgg gggctgtcgc tgctcttctc cgggccctac 480
ctgagctact accgccagtc gcagctggcc aacctgaccg tgtgccatcc cgcgtggagc 540
gcccctcgcc gccgcgccat ggacatctgc accttcgtct tcagctacct gcttcctgtg 600
ctggttctcg gcctgaccta cgcgcgcacc ttgcgctacc tctggcgcgc cgtcgacccg 660
gtggccgcgg gctcgggtgc ccggcgcgcc aagcgcaagg tgacacgcat gatcctcatc 720
gtggccgcgc tcttctgcct ctgctggatg ccccaccacg cgctcatcct ctgcgtgtgg 780
ttcggccagt tcccgctcac gcgcgccact tatgcgcttc gcatcctctc gcacctggtc 840
tcctacgcca actcctgcgt caaccccatc gtttacgcgc tggtctccaa gcacttccgc 900
aaaggcttcc gcacgatctg cgcgggcctg ctgggccgtg ccccaggccg agcctcgggc 960
cgtgtgtgcg ctgccgcgcg gggcacccac agtggcagcg tgttggagcg cgagtccagc 1020
gacctgttgc acatgagcga ggcggcgggg gcccttcgtc cctgccccgg cgcttcccag 1080
ccatgcatcc tcgagccctg tcctggcccg tcctggcagg gcccaaaggc aggcgacagc 1140
atcctgacgg ttgatgtggc ctga 1164

<210> 145
<211> 1107
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 145
atggctgatg cccagaacat ttcactggac agcccaggga gtgtgggggc cgtggcagtg 60
cctgtggtct ttgccctaat cttcctgctg ggcacagtgg gcaatgggct ggtgctggca 120
gtgctcctgc agcctggccc gagtgcctgg caggagcctg gcagcaccac ggacctgttc 180
atcctcaacc tggcggtggc tgacctctgc ttcatcctgt gctgcgtgcc cttccaggcc 240
accatctaca cgctggatgc ctggctcttt ggggccctcg tctgcaaggc cgtgcacctg 300
ctcatctacc tcaccatgta cgccagcagc tttacgctgg ctgctgtctc cgtggacagg 360
tacctggccg tgcggcaccc gctgcgctcg cgcgccctgc gcacgccgcg taacgcccgc 420
gccgcagtgg ggctggtgtg gctgctggcg gcgctcttct cggcgcccta cctcagctac 480
tacggcaccg tgcgctacgg cgcgctggag ctctgcgtgc ccgcctggga ggacgcgcgc 540
cgccgcgccc tggacgtggc caccttcgct gccggctacc tgctgcccgt ggctgtggtg 600
agcctggcct acgggcgcac gctgcgcttc ctgtgggccg ccgtgggtcc cgcgggcgcg 660
gcggcggccg aggcgcggcg gagggcgacg ggccgcgcgg ggcgcgccat gctggcggtg 720
gccgcgctct acgcgctctg ctggggtccg caccacgcgc tcatcctgtg cttctggtac 780
ggccgcttcg ccttcagccc ggccacctac gcctgccgcc tggcctcaca ctgcctggcc 840
tacgccaact cctgcctcaa cccgctcgtc tacgcgctcg cctcgcgcca cttccgcgcg 900
cgcttccgcc gcctgtggcc gtgcggccgc cgacgccgcc accgtgcccg ccgcgccttg 960
cgtcgcgtcc gccccgcgtc ctcgggccca cccggctgcc ccggagacgc ccggcctagc 1020
gggaggctgc tggctggtgg cggccagggc ccggagccca gggagggacc cgtccacggc 1080
ggagaggctg cccgaggacc ggaataa 1107

<210> 146
<211> 889
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LHn/A fragment

<221> VARIANT
<222> (453)...(455)
<223> Xaa is any amino acid

<400> 146
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 Gly Gly Gly Gly Glu Asn
435 440 445
Leu Tyr Phe Gln Xaa Xaa Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Gly Tyr
450 455 460
Asn Lys Ala Phe Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu
465 470 475 480
Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly
485 490 495
Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile
500 505 510
Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn
515 520 525
Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly
530 535 540
Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys
545 550 555 560
Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu
565 570 575
Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu
580 585 590
Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr
595 600 605
Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp
610 615 620
Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser
625 630 635 640
Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly

```
                645                 650                 655
Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly
            660                 665                 670
Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu
        675                 680                 685
Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala
    690                 695                 700
Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg
705                 710                 715                 720
Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu
                725                 730                 735
Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu
            740                 745                 750
Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln
        755                 760                 765
Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile
    770                 775                 780
Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile
785                 790                 795                 800
Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn
                805                 810                 815
Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser
            820                 825                 830
Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu
        835                 840                 845
Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser
    850                 855                 860
Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu
865                 870                 875                 880
Leu Ser Thr His His His His His His
                885
```

<210> 147
<211> 2661
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LHn/A fragment

<400> 147

```
atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagacccag tcaacggcgt ggacattgcc 60
tatatcaaaa tcccgaatgc gggtcaaatg cagcccgtga aagcatttaa aatccataac 120
aaaatttggg tgatcccgga gcgcgatacg ttcacgaacc cggaagaagg agatttaaac 180
ccaccgcctg aggctaaaca ggtcccggtg tcttactatg atagcacata cctgagtacc 240
gacaatgaaa aggacaacta cctgaaaggt gttaccaaac tgttcgagcg catttattcg 300
acagatctcg gtcgcatgtt gctgacttct attgtgcgcg gcattccgtt ttggggtggt 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt gattcagcct 420
gatgggagct accggtccga agagcttaac ctcgtaatca ttggcccgag cgcggatatt 480
atccaattcg aatgtaaatc ttttgggcat gaagtcctga atctgacgcg gaatggctat 540
ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga agaaagcctc 600
gaagttgata cgaaccctct tttaggcgcg ggaaaattcg cgacggaccc agcggtgacc 660
ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgtatg gaatcgccat taacccgaac 720
cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgtat tacgagatgt cgggcttaga agtgtccttt 780
gaagaactgc gcacgtttgg cggtcatgat gcaaaattta ttgatagtct gcaagaaaac 840
gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt aaacaaggcg 900
aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt caaagaaaaa 960
tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa atttgataaa 1020
```

ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt cttcaaggtc 1080
ttgaatcgga aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa catcgtaccg 1140
aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct ggcggcgaac 1200
tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa aaattttacc 1260
ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggta ttatcaccag caaaaccaaa 1320
tccttgggcg gtggtggcga aaacctgtac ttccagggcg gtggcggtgg tgataagggc 1380
tataacaagg ccttcaatga tttatgcatc aaggtgaaca actgggactt gtttttctct 1440
ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag aggaaattac ttccgatacc 1500
aacatcgaag cagcggaaga gaatattagt ctagatctta ttcaacaata ttacctgacc 1560
tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc tgacatcatc 1620
ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgctttccta atggaaagaa atatgaattg 1680
gacaaataca ccatgttcca ctatctccgc gcgcaggagt ttgagcacgg caagtctcgt 1740
attgctctga ccaattcggt aaacgaagcc cttttaaatc cttcgcgtgt gtacaccttt 1800
ttctcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat gtttttggga 1860
tgggtggaac aactggtata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc gaccaccgac 1920
aaaattgccg atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgcactgaa cattggtaac 1980
atgctgtata aagatgattt tgtgggcgcc ctgatctttt caggcgctgt tatcctgctg 2040
gaatttatcc cggaaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgcgctggt gtcctatatc 2100
gcaaacaaag ttttgactgt ccagacgatc gacaacgcgc tcagtaaacg taacgaaaaa 2160
tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaaa cacccagatt 2220
gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc gaccaaagct 2280
attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat caacttcaac 2340
atcgacgact tatcttcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat taatattaac 2400
aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc ttacggtgtg 2460
aaacgtctgg aagacttcga tgcaagcctt aaagatgccc ttctgaagta tatttacgat 2520
aatcgcggaa ctcttattgg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa caacacgctg 2580
agtacagaca tccctttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgcct gctgtccacg 2640
caccatcacc atcaccacta a 2661

<210> 148
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ORL-1 forward oligonucleotide primer

<400> 148
cactcggctg gtgctggtgg 20

<210> 149
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ORL-1 reverse oligonucleotide primer

<400> 149
aatggccacg gcagtctcgc 20

<210> 150
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Galanin receptor 1 forward oligonucleotide primer

<400> 150
ccccatcatg tcatccacct 20

<210> 151
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Galanin receptor 1 reverse oligonucleotide primer

<400> 151
atggggttca ccgaggagtt 20

<210> 152
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Galanin receptor 2 forward oligonucleotide primer

<400> 152
catcgtggcg gtgctttt 18

<210> 153
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Galanin receptor 2 reverse oligonucleotide primer

<400> 153
agcgggaagc gaccaaac 18

ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE ENDOPEPTIDASA REDIRIGIDA BASADOS EN INMUNOENSAYOS

La presente solicitud de patente reivindica prioridad conforme al 35 U.S.C. § 119(e) de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. de serie 61/160,217, presentada el 13 de marzo de 2009, la cual se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Las secuencias descritas en la presente memoria descriptiva están contenidas dentro del Listado de Secuencias presentado con la presente que se incorpora a modo de referencia en su totalidad.

La capacidad de las toxinas clostridiales, por ej., neurotoxinas botulínicas (BoNT), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F y BoNT/G y neurotoxina del tétanos (TeNT) para inhibir la transmisión neuronal se explota en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y cosméticas, véase por ej., William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin (Slack, Inc., 2004). Las toxinas clostridio comercialmente disponibles como composiciones farmacéuticas incluyen preparaciones de BoNT/A, tales como, por ej., BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, Inglaterra), PURTOX®

(Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Alemania), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, Corea del Sur), BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China) y preparaciones de BoNT/B, tales como, por ej., MYOBLOC®/NEUROBLOC® (Solstice Neurosciences, Inc., San Francisco del Sur, CA). A modo de ejemplo, BOTOX® está actualmente aprobado en uno o más países para las siguientes indicaciones: acalasia, espasticidad en adultos, fisura anal, lumbalgia, blefaroespasmo, bruxismo, distonia cervical, temblor esencial, líneas en el entrecejo o líneas faciales hiperquinéticas, cefalea, espasmo hemifacial, hiperactividad de la vejiga, hiperhidrosis, parálisis cerebral juvenil, esclerosis múltiple, trastornos mioclónicos, líneas labiales y nasales, disfonía espasmódica, estrabismo y trastorno del nervio VII.

Un tratamiento con toxina clostridio inhibe la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos por medio de la interrupción del proceso exocitótico usado para secretar los neurotransmisores y neuropéptidos en la hendidura sináptica. La industria farmacéutica desea expandir el uso de las terapias CON toxina clostridio más allá de sus aplicaciones miorrelajantes actuales para tratar dolencias basadas en los nervios sensoriales tales como, por ej., diversos tipos de dolor crónico, inflamación neurogénica y

trastornos urogenitales, así como otros trastornos tales como, por ej., pancreatitis. Actualmente se está explotando un enfoque para expandir las terapias basadas en toxina clostridio que implica la modificación de una toxina clostridio de forma tal que la toxina modificada tenga una capacidad de direccionamiento celular alterada para una célula neuronal o no neuronal de interés. Llamadas endopeptidasa redirigida o proteínas moduladoras de exocitosis vesicular dirigidas (TVEMP), estas moléculas logran sus efectos de inhibición de la exocitosis por medio del uso de un receptor diana presente en la célula diana neuronal o no neuronal de interés. Esta capacidad redirigida se logra reemplazando un dominio de unión de origen natural de una toxina clostridio con un dominio de direccionamiento que muestra una actividad de unión selectiva para un receptor de toxina que no es de clostridio presente en una célula diana neuronal o no neuronal de interés. Tales modificaciones a un dominio de unión dan como resultado una molécula que es capaz de unirse de forma selectiva a un receptor de toxina que no es clostridio presente en la célula diana. Una endopeptidasa redirigida se puede unir a un receptor diana, desplazarse hacia el citoplasma y ejercer su efecto proteolítico en el complejo SNARE de la célula diana neuronal o no neuronal de interés.

Un grupo de endopeptidasas redirigidas comprende moléculas que tienen un dominio de direccionamiento opioide.

Estas endopeptidasas redirigidas opioides comprenden un dominio de direccionamiento opioide, un dominio de desplazamiento de toxina clostridio y un dominio enzimático de toxina clostridio. Los ejemplos no taxativos de endopeptidasas redirigidas desde opioides o TVEMP opioides se describen en, por ej., Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, patente estadounidense 5,989,545; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, patente estadounidense 7,132,259; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, patente estadounidense 7,244,437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, patente estadounidense 7,413,742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, patente estadounidense 7,415,338; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, patente estadounidense 7,514,088; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, publicación de patente estadounidense 2008/0064092; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, publicación de patente estadounidense 2009/0035822; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, publicación de patente estadounidense 2009/0048431; Keith A. Foster, *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, publicación de patente estadounidense 2009/0162341; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin*

Conjugates, publicación de patente internacional WO 2005/023309 y Lance E. Steward, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente internacional WO 2008/008805; cada una de las cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Una diferencia general entre las endopeptidasas redirigidas y las toxinas clostridio es que debido a que las endopeptidasas redirigidas típicamente no se dirigen a las neuronas motoras, la letalidad asociada con una sobredosis de una endopeptidasa redirigida en un mamífero se reduce en gran medida o directamente se evita. Por ejemplo, las endopeptidasas redirigidas desde opioides se pueden administrar a 10,000 veces la dosis terapéuticamente eficaz antes de observarse evidencia de letalidad y esta letalidad se debe a la difusión pasiva de la molécula y no por medio del proceso de intoxicación. Por lo tanto, a todos los fines prácticos las endopeptidasas redirigidas son moléculas no letales. Pese a que esta propiedad de no letalidad tiene un gran beneficio terapéutico, surge un problema de fabricación debido a que el ensayo de actividad estándar usado para fabricar productos biológicos basados en toxina clostridio es un bioensayo de LD_{50} de ratón, una prueba de letalidad. S. S.

Arnon et al., JAMA 285: 1059-1070 (2001). Actualmente, todos los fabricantes farmacéuticos usan un bioensayo de LD_{50} de ratón para expresar la potencia de sus preparaciones de toxina clostridio. De hecho, las unidades de actividad de las toxinas de clostridio son unidades LD_{50} de ratón. Sin embargo, debido a que las endopeptidasas redirigidas son esencialmente no letales, no se puede un bioensayo LD_{50} de ratón usar para evaluar la potencia de estas moléculas. Por lo tanto, sería de gran valor contar con un ensayo de actividad simple, confiable, validado y aceptable para las agencias gubernamentales que pueda evaluar la integridad de todas las etapas necesarias para la absorción de endopeptidasas redirigidas.

La presente memoria descriptiva proporciona composiciones, células y métodos novedosos para evaluar la actividad de endopeptidasas redirigidas útiles para diversas industrias tales como, por ej., las industrias farmacéuticas y de alimentos y también proporciona ventajas relacionadas. Tales composiciones, células y métodos no usan animales vivos o tejidos tomados de animales vivos, pero pueden evaluar todas las etapas necesarias para la acción de endopeptidasas redirigidas.

Descripción detallada de los dibujos

La FIG. 1 muestra un esquema del paradigma actual sobre la liberación de neurotransmisores e intoxicación por toxina clostridio en una neurona central y periférica. La FIG. 1A es un esquema del mecanismo de liberación de neurotransmisores de una neurona central y periférica. El proceso de liberación se puede describir como que comprende dos etapas: 1) acoplamiento de vesícula, donde la proteína SNARE unida a la vesícula de una vesícula que contiene moléculas de neurotransmisores se asocia con las proteínas SNARE unidas a la membrana ubicadas en la membrana plasmática y 2) liberación de neurotransmisores, donde la vesícula se fusiona con la membrana plasmática y las moléculas de neurotransmisores se exocitan. La FIG. 1B muestra un esquema del mecanismo de intoxicación para la actividad de toxina del tétanos y botulínica en una neurona central y periférica. Este proceso de intoxicación se puede describir como que comprende cuatro etapas: 1) unión al receptor, donde la toxina clostridio se une a un complejo de receptor de clostridio e inicia el proceso de intoxicación; 2) internalización de complejo, donde luego de la unión de la toxina, una vesícula que contiene un complejo de toxina/sistema receptor se endocita a la célula; 3) desplazamiento de cadena ligera, donde se cree que ocurren múltiples eventos, incluyendo cambios en el pH interno de la

vesícula, formación de un poro de canal que comprende el dominio H_N de la cadena pesada de toxina clostridio, separación de la cadena ligera de toxina clostridio de la cadena pesada y liberación de la cadena ligera y 4) modificación de la diana enzimática, donde la cadena ligera de la toxina clostridio escinde proteolíticamente sus sustratos SNARE diana, tales como, por ej., SNAP-25, VAMP o Sintaxina, previniendo así el acoplamiento de vesícula y la liberación de neurotransmisores.

La FIG. 2 muestra una respuesta a la dosis completa de la Noc/A de endopeptidasa redirigida en la línea celular clonal ORL-1Clon #6 que sobreexpresa ORL-1. La absorción específica de Noc/A se puede observar en el Clon #6 de la línea celular clonal ORL-1 que sobreexpresa ORL-1. El tratamiento con Noc/A (LHN/A más variante de nociceptina del ligando de unión) y LH_N/A (LC/A y H_N sin ningún dominio de unión) realizado en el clon #6 de la línea celular estable ORL-1 en el ELISA ECL para la $SNAP\text{-}25_{197}$ escindida demostró que la absorción de Noc/A es específica en esta línea celular clonal. La línea celular clonal también mostró gran sensibilidad a Noc/A con una EC_{50} de 1.2 nM.

La FIG. 3 muestra una respuesta de dosis completa a Noc/A en los clones #3 y #22 de SK-N-DZ derivados de una única

célula. Absorción específica de Noc/A en clones #3 y #22 de SK-N-DZ en comparación con LH_N/A (n=4 experimentos independientes ejecutados). Las células se colocaron en placas de 96 pocillos de poli-D-lisina en RPMI SFM +N2+B27+NGF. El tratamiento con los compuestos duró 22 horas. ELISA ECL para la $SNAP\text{-}25_{197}$ escindida demostró que la absorción de Noc/A es específica en estas líneas celulares clonales. Las líneas celulares clonales también mostraron una gran sensibilidad a Noc/A con una EC_{50} de 0.3 nM para el clon #3 y una EC_{50} de 0.9 nM para el clon #22.

La FIG. 4 muestra los resultados de un ensayo ELISA tipo sándwich ECL de los clones de ORL1 ND7 1C11, 4B7 y 4C9 que se trataron con la endopeptidasa redirigida Noc/A. Los clones ND7 y ORL1 ND7 originales se trataron durante 24 horas con Noc/A seguido por dos días de incubación. La EC_{50} de ND7 original no se pudo calcular ya que solo alcanzó aproximadamente 50% de escisión de la $SNAP\text{-}25_{197}$. Los clones 4B7 y 1C11 alcanzaron más de 80% de escisión de la $SNAP\text{-}25_{197}$. Los valores de EC_{50} se calcularon y fueron 5.7±0.5, 6.7±1 y 8.6±2 nM, respectivamente.

La FIG. 5 muestra que los anticuerpos policlonales antinociceptina pueden bloquear la absorción de endopeptidasa redirigida Noc/A en las líneas celulares del clon #3 y clon

#22 de SK-N-DZ y el clon #6 de AGN P33 ORL-1. Las células se colocaron en placas de 96 pocillos de poli-D-lisina en RPMI SFM+N2+B27+NGF y se trataron durante 22 horas en medio libre de suero que contenía los anticuerpos policlonales antinociceptina en diferentes diluciones (0-3 µg/mL) en 1 nM de Noc/A.

La FIG. 6 muestra las células del clon de SiMa AF4 y la línea celular establecida PC-12 que se trataron con la endopeptidasa redirigida Dyn/A en concentraciones de 0.017 nM a 1 µM como se ilustra en la imagen de la transferencia Western. Se pudo observar absorción dependiente de la dosis para ambas líneas celulares.

La FIG. 7 muestra curvas SPR BIAcore normalizadas de 7.8 nM de los anticuerpos 2E2A6, 1D3B8, 3C1A5 y 2C9B10 y MC-6050 y MC-6053 comerciales. La FIG. 7A muestra los datos normalizados para la velocidad de asociación de cada anticuerpo. La FIG. 7B muestra los datos normalizados para la velocidad de disociación de cada anticuerpo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente memoria descriptiva proporciona ensayos novedosos para determinar la presencia o ausencia de una

endopeptidasa redirigida desdectiva en una muestra y para determinar la actividad/potencia de una endopeptidasa redirigida. Los ensayos novedosos basados en células descritos en la presente memoria descriptiva dependen de células, reactivos y métodos de detección que permiten que el ensayo detecte cantidades nanomolares de una endopeptidasa redirigida en una muestra. Los ensayos basados en células descritos en la presente memoria descriptiva sirven para analizar múltiples funciones de una endopeptidasa redirigida, a saber, unión de una endopeptidasa redirigida desde un receptor de superficie celular, internalización del complejo endopeptidasa-receptor, desplazamiento del dominio enzimático al citoplasma, escisión del dominio enzimático de un sustrato. Como se discutirá a continuación, los métodos y composiciones novedosos se pueden usar para analizar muestras brutas y globales así como endopeptidasas redirigidas de cadena doble altamente purificadas y productos de endopeptidasa redirigida formulada y además son susceptibles a formatos de ensayos automatizados de alta producción.

Por lo tanto, un aspecto descrito en la presente memoria descriptiva proporciona composiciones que inducen una respuesta inmune para producir anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a un epítopo que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo

carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Las composiciones que inducen una respuesta inmune pueden comprender un adyuvante y una composición que induce una respuesta inmune que incluye un antígeno de SNAP-25, un portador unido a un antígeno de SNAP-25 o un portador unido a un espaciador flexible unido a un antígeno de SNAP-25, donde el enlazador flexible interviene entre el antígeno de SNAP-25 y el portador. Se prevé que cualesquiera y todos los antígenos de SNAP-25 que desencadenan una respuesta inmune que produce un anticuerpo α-SNAP-25 que se puede unir de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puedan ser útiles como un antígeno de SNAP-25, incluyendo, a modo no taxativo, un antígeno de SNAP-25 derivado de una SNAP-25 de origen natural, un antígeno de SNAP-25 derivado de una SNAP-25 de origen no natural y un antígeno de SNAP-25 que comprende un fragmento inmunorreactivo de la SNAP-25, la SNAP-25 de una SNAP-25 de origen natural o una SNAP-25 de origen no natural. Los antígenos de SNAP-25 útiles para producir anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil de escisión de la BoNT/A incluyen, a modo no taxativo, antígenos de SNAP-25 que comprenden un péptido de SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal

carboxilada unida a un péptido portador incluyendo, a modo no taxativo la SEQ ID NO: 38. Otras composiciones que inducen una respuesta inmune útiles para hacer anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil de escisión de la BoNT/A incluyen, a modo no taxativo, una composición que induce una respuesta inmune que comprende un portador unido a un enlazador flexible unido a un antígeno de SNAP-25, una glutamina C-terminal carboxilada, donde el enlazador flexible interviene entre el antígeno de SNAP-25 y el portador. Se prevé que cualesquiera y todos los adyuvantes puedan ser útiles en tal composición que induce una respuesta inmune incluyendo, a modo no taxativo, polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol (mPEG), alcohol polivinílico (PVA), adyuvante completo e incompleto de Freund.

Otro aspecto descrito en la presente memoria descriptiva proporciona métodos para producir un anticuerpo α-SNAP-25 que se puede unir de forma selectiva a un epítopo que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) administrar a un animal una composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 descrita en la presente memoria descriptiva; (b) recoger del animal una

muestra que contiene anticuerpo α-SNAP-25 o una célula que produce un anticuerpo α-SNAP-25 y (c) aislar el anticuerpo α-SNAP-25 de la muestra. Los métodos descritos son útiles para realizar anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a un epítopo que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A o anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a un epítopo que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A.

Aun otro aspecto descrito en la presente memoria descriptiva proporciona anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a un epítopo que comprende una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Tales anticuerpos α-SNAP-25 incluyen anticuerpos tanto de origen natural como de origen no natural así como anticuerpos α-SNAP-25 monoclonales o anticuerpos α-SNAP-25 policlonales. Los anticuerpos α-SNAP-25 monoclonales útiles como anticuerpos α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A incluyen, a

modo no taxativo, los anticuerpos α-SNAP-25 monoclonales producidos a partir de las líneas celulares de hibridoma 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2.

Aun otro aspecto descrito en la presente memoria descriptiva proporciona métodos basados en inmunoensayos de detectar la actividad de endopeptidasa redirigida. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a la actividad de endopeptidasa redirigida por la endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (c) poner en contacto el componente de la SNAP-25 con una anticuerpo α-SNAP-25 descrito en la presente memoria descriptiva y (d) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A donde la detección por el complejo de anticuerpo-antígeno indica la actividad de la endopeptidasa redirigida. El anticuerpo α-

SNAP-25 de la etapa (c) puede unirse opcionalmente a un soporte de fase sólida.

Aun otro aspecto descrito en la presente memoria descriptiva proporciona métodos basados en inmunoensayos para detectar la actividad de TVEMP opioide. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una enopeptidasa redirigida donde la célula de una línea celular establecida puede absorber una endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (c) poner en contacto el componente de SNAP-25 con una anticuerpo α-SNAP-25 descrito en la presente memoria descriptiva y (d) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A donde la detección por el complejo de anticuerpo-antígeno indica la actividad de endopeptidasa redirigida. El anticuerpo α-SNAP-25 de la etapa (c) puede unirse opcionalmente a un soporte de fase sólida.

Un aspecto adicional descrito en la presente memoria descriptiva proporciona métodos para determinar la inmunorresistencia a la endopeptidasa redirigida en un mamífero. Los aspectos de este método comprenden las etapas de (a) agregar una endopeptidasa redirigida desde una muestra de prueba obtenida de un mamífero al que se le están realizando pruebas para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes de endopeptidasa α-redirigida; (b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a la actividad de endopeptidasa redirigida; (c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 descrito en la presente memoria descriptiva; (e) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (f) repetir las etapas a-e con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba y (g) comparar la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa (e) con la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la

etapa (f), donde la detección de una cantidad menor de un complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa (e) con relación a la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa (f) indica la presencia de anticuerpos neutralizantes de endopeptidasa α-redirigida. El anticuerpo α-SNAP-25 de la etapa (d) puede unirse opcionalmente a un soporte de fase sólida. La muestra de control de la etapa (f) también puede incluir una muestra de control positivo además de la muestra de control negativo.

Las toxinas Clostridio producidas por *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium baratii* y *Clostridium butyricum* son las más usadas en los tratamientos terapéuticos y cosméticos de humanos y otros mamíferos. Las cepas de *C. botulinum* producen siete serotipos de toxinas botulínicas (BoNT) distintos desde el punto de vista de los antígenos, que han sido identificados al investigar los brotes de botulismo en el hombre (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E y BoNT/F), animales (BoNT/C1 y BoNT/D) o aislados de la tierra (BoNT/G). Mientras que los siete serotipos de toxina botulínica tienen una estructura y propiedades biológicas similares, cada uno también manifiesta características heterogéneas, tales como, por ej., propiedades farmacológicas diferentes. Por el contrario, la toxina del tétanos (TeNT) es producida por un grupo uniforme de *C. tetani*. Otras dos especies de Clostridio,

C. baratii y *C. butyricum* también producen toxinas similares a BoNT/F y BoNT/E, respectivamente.

Cada una de las toxinas clostridio se traduce como un polipéptido de cadena simple de aproximadamente 150 kDa que luego es escindido por un corte proteolítico dentro de un bucle de disulfuro por una proteasa de origen natural tal como, por ej., una proteasa de toxina clostridio endógena o una proteasa de origen natural producida en el medio ambiente. Este procesamiento postraduccional proporciona una molécula de doble cadena que comprende una cadena ligera (LC) de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada (HC) de aproximadamente 100 kDa unidas por un solo enlace de disulfuro e interacciones no covalentes. Cada molécula de doble cadena madura comprende tres dominios funcionalmente diferentes: 1) un dominio enzimático ubicado en la LC que incluye una región de metaloproteasa que contiene actividad de endopeptidasa dependiente de cinc que se dirige específicamente a los componentes centrales del aparato de liberación de neurotransmisores; 2) un dominio de desplazamiento contenido dentro de la mitad del extremo aminoterminal de la HC (H_N) que facilita la liberación de la LC desde vesículas intracelulares al citoplasma de la célula diana y 3) un dominio de unión encontrado dentro de la mitad del extremo carboxiloterminal de la HC (H_C) que determina la actividad de unión y la

especificidad de unión de la toxina al complejo de receptor ubicado en la superficie de la célula diana.

Tanto la unión como el desplazamiento y la actividad enzimática de estos tres dominios funcionales son necesarios para la toxicidad. Mientras que los detalles de este proceso no se conocen aun con exactitud, el mecanismo de intoxicación celular global por el cual las toxinas clostridio ingresan a una neurona e inhiben la liberación de los neurotransmisores es similar, sin importar el serotipo o el subtipo. Pese a que los solicitantes no desean verse limitados por la siguiente descripción, el mecanismo de intoxicación se puede describir como que comprende al menos cuatro etapas: 1) unión al receptor, 2) internalización del complejo, 3) desplazamiento de cadena ligera y 4) modificación de diana enzimática (FIG. 1). El proceso se inicia cuando el dominio H_C de una toxina clostridio se une a un sistema de receptor específico para las toxinas que se ubica en la superficie de membrana plasmática de una célula diana. Se cree que se logra la especificidad de unión de un complejo receptor, en parte, mediante combinaciones específicas de gangliósidos y receptores de proteína que parecen comprender claramente cada complejo de receptor de toxina clostridio. Una vez unidos, los complejos de toxina/receptor se internalizan por endocitosis y las vesículas internalizadas se clasifican en caminos

intracelulares específicos. La etapa de desplazamiento parece desencadenarse por la acidificación del compartimiento de vesícula. Este proceso parece iniciar nuevas disposiciones estructurales importantes dependientes del pH que aumentan la hidrofobicidad, promueven la formación de poros y facilitan la separación de las cadenas pesada y ligera de la toxina. Una vez separadas, la endopeptidasa de cadena ligera de la toxina se libera desde la vesícula intracelular al citosol donde parece que se dirige específicamente a los componentes centrales del aparato de liberación de neurotransmisores. Estas proteínas centrales, proteínas de membrana asociadas con la vesícula (VAMP)/sinaptobrevina, proteína asociada de forma sinaptosomal de 25 kDa (SNAP-25) y Sintaxina son necesarias para el acoplamiento y la fusión sináptica de la vesícula en el extremo del nervio y constituyen miembros de la familia de receptor de proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida soluble (SNARE). BoNT/A y BoNT/E escinden la SNAP-25 en la región carboxiloterminal, liberando un fragmento de nueve o veintiséis aminoácidos, respectivamente y BoNT/C1 también escinde la SNAP-25 cerca del extremo carboxiloterminal, liberando un fragmento de ocho aminoácidos. Los serotipos botulínicos BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G y la toxina del tétanos actúan en la porción central conservada de VAMP y liberan la porción aminoterminal de VAMP al citosol. La BoNT/C1 escinde la sintaxina en un único sitio cerca de la

superficie de membrana citosólica. La proteólisis selectiva de SNARE sinápticas explica el bloqueo de la liberación de neurotransmisores causado por las toxinas clostridio in vivo. Las dianas de la proteína SNARE de las toxinas clostridio son comunes para la exocitosis en una variedad de tipos no neuronales; en estas células, como en las neuronas, la actividad de peptidasa de cadena ligera inhibe la exocitosis, véase, por ej., Yann Humeau et al., *How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release*, 82(5) Biochimi. 427-446 (2000); Kathryn Turton et al., *Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility*, 27(11) Trends Biochem. Sci. 552-558. (2002); Giovanna Lalli et al., *The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons*, 11(9) Trends Microbiol. 431-437, (2003).

Las endopeptidasas redirigidas generalmente sustituyen el sitio de escisión de proteasa de bucle de doble cadena de origen natural con un sitio de escisión a la proteasa exógena. Véase, por ej., Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, patente estadounidense 7,419,676, que se incorpora a la presente a modo de referencia. Pese a que las endopeptidasas redirigidas varían en su peso molecular global debido al tamaño del resto de direccionamiento, el proceso de activación y su dependencia de la escisión en el sitio de escisión exógena para producir una molécula de doble cadena

son esencialmente los mismos que los de las toxinas clostridio. Véase, por ej., Steward, L.E. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, publicación de patente estadounidense 2009/0005313; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, publicación de patente estadounidense 11/776,075; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity for Clostridial Toxin Target Cells*, publicación de patente estadounidense 2008/0241881, cada una de las cuales se incorpora a la presente a modo de referencia.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, una composición que induce una respuesta inmune para producir anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Tal como se usa en la presente, el término "composición que induce una respuesta inmune" se refiere a una composición que comprende un antígeno de SNAP-25 que, al ser administrado a un animal, estimula una respuesta inmune contra el antígeno de SNAP-25, produciendo así anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace

escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. El término "respuesta inmune" se refiere a cualquier respuesta por parte del sistema inmune de un animal a una composición que induce una respuesta inmune. Los ejemplos de respuestas inmunes incluyen, a modo no taxativo, inmunidad humoral sistémica y local tal como, por ej., respuestas CTL, incluyendo inducción específica del antígeno de CTL de CD8+, respuestas de células T ayudantes, incluyendo respuestas proliferativas de células T y liberación de citocina y respuestas de células B incluyendo, por ej., una respuesta que produce anticuerpos. El término "que induce una respuesta inmune" se refiere a la administración de una composición que induce una respuesta inmune o un polinucleótido que codifica la composición que induce una respuesta inmune, mediante lo cual una respuesta inmune es afectada, es decir, estimulada, iniciada o inducida.

Una composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25. Tal como se usa en la presente, el término "antígeno" se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmune e incluye, a modo no taxativo, péptidos, polisacáridos y conjugados de lípidos tales como, por ej., lipoproteínas y glucolípidos. Tal como se usa en la presente, el término "antígeno de SNAP-25" se refiere a cualquier antígeno que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la

BoNT/A que puede provocar una respuesta inmune. Un antígeno de SNAP-25 usado en una composición que induce una respuesta inmune debe ser lo suficientemente grande como para ser sustancialmente único en secuencia para reducir así la posibilidad de producir anticuerpos con reactividad cruzada contra otros antígenos que no sean de SNAP-25. Además, un antígeno de SNAP-25 usado en una composición que induce una respuesta inmune debe ser lo suficientemente pequeño como para solamente desencadenar una respuesta inmune sustancialmente contra una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, aumentando así la posibilidad de producir anticuerpos α-SNAP-25 que pueden distinguir una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de una SNAP25 que no tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Además, también es muy deseable generar anticuerpos α-SNAP-25 de una secuencia de un solo aminoácido con un buen rendimiento que son selectivos de forma reproducible y que se unen con avidez aceptable para permitir el diseño de un ensayo altamente sensible.

La secuencia que rodea un sitio de escisión de la BoNT/A presente en una SNAP-25 se denomina P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5', donde P_1-P_1' representa el enlace escísil. Luego de la

escisión por una endopeptidasa redirigida, los productos de escisión resultantes producidos comprenden un fragmento que incluye la secuencia P_5-P_4-P_3-P_2-P_1 y un fragmento que incluye P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'. Por lo tanto, como se usa en la presente, el término "SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, se refiere a cualquier SNAP-25 que tiene el residuo P_1 como su aminoácido de extremo carboxiloterminal. Por ejemplo, Q_{197}-R_{198} de la SNAP-25 humana (SEQ ID NO: 5) representa el enlace escísil P_1-P_1' del sitio de escisión de la BoNT/A. Como tal, "SNAP-25 que tiene una glutamina de extremo carboxiloterminal del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A" sería cualquier producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene una glutamina en su aminoácido de extremo carboxiloterminal donde la glutamina representa Q_{197} del enlace escísil. Como otro ejemplo, K_{204}-H_{205} de la SNAP-25 de *Torpedo marmorata* (SEQ ID NO: 16) representa el enlace escísil P_1-P_1' del sitio de escisión de la BoNT/A. Como tal, "SNAP-25 que tiene una lisina de extremo carboxiloterminal del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A" sería cualquier producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene una lisina en su aminoácido de extremo carboxiloterminal donde la lisina representa K_{204} del enlace escísil.

El antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A del sitio de escisión de la BoNT/A se puede modificar para mejorar la inmunogenicidad de un antígeno de SNAP-25, un hapteno o cualquier otro compuesto antigénico que es inmunogénico, no inmunogénico o débilmente inmunogénico cuando no está asociado con la modificación. En un aspecto de esta modalidad, el residuo P_1 del extremo carboxiloterminal del enlace escísil del sitio de escisión de un antígeno de la SNAP-25 puede ser carboxilado. La carboxilación aumenta las propiedades inmunogénicas deseadas de un antígeno de SNAP-25 en dos sentidos. En primer lugar, debido a que los aminoácidos cargados mejoran la innmunogenicidad, y agregan un grupo COO^- al residuo del extremo carboxilotemrinal que aumenta la inmunogenicidad total de un antígeno de SNAP-25. En segundo lugar, debido a que el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A está en un estado cargado tras la escisión, y agrega un grupo COO^- al residuo del extremo carboxiloterminal que imitará en mejor forma al antígeno real al que los anticuerpos α-SNAP-25 descritos en la presente memoria descriptiva están diseñados para unirse de forma selectiva.

En un aspecto de esta modalidad, el residuo del extremo aminoterminal de un antígeno de SNAP-25 se puede modificar por

la adición de un aminoácido adaptado para unir el antígeno de SNAP-25 a una proteína portadora, tal como, por ej., hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de tripsina de soja (STI) o un péptido de múltiple unión (MAP). Por ejemplo, un residuo de cisteína se puede ubicar en el extremo aminoterminal para conjugar la proteína portadora KLH.

Por lo tanto, una modalidad, un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener, por ej., al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 aminoácidos de longitud. En otra una modalidad, un antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener, por ej., como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, como máximo 8, como máximo 9, como máximo 10, como máximo 11, como máximo 12, como máximo 13, como máximo 14, como máximo 15, como máximo 16, como máximo 17, como máximo 18, como máximo 19, como máximo 20, como máximo 25 o como máximo 30 aminoácidos de longitud. En aun otra modalidad, un antígeno de

SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener, por ej., entre 7 y 12 aminoácidos, entre 10 y 15 aminoácidos o entre 13 y 18 aminoácidos.

En otra modalidad, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 33. En aspectos de esta modalidad, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A comprende las SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39. En una modalidad adicional, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 40.

En aun otra modalidad, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 41. En aspectos de esta modalidad, el antígeno de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A comprende las SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46. En una modalidad adicional, el antígeno de

SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A comprende la SEQ ID NO: 47.

Se prevé que cualesquiera y todos los antígenos de SNAP-25 que desencadenan una respuesta inmune que produce anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A pueden ser útiles como antígeno de SNAP-25. Por lo tanto, las variantes de secuencia de aminoácidos que comprenden SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 46 pueden ser útiles como un antígeno de SNAP-25 para desencadenar una respuesta inmune que produce anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxilotemrinal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Por lo tanto, en una modalidad, un antígeno de SNAP-25 puede sustituir al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos a los antígenos SNAP-25 que comprenden SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID

NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 46. En aun otra modalidad, un antígeno de SNAP-25 puede tener al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos a los antígenos SNAP-25 que comprenden SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 46.

Se prevé que uno o más portadores se puedan unir a un antígeno de SNAP-25 para poder mejorar la inmunogenicidad de un antígeno de SNAP-25 que es inmunogénico, no inmunogénico o débilmente inmunogénico cuando no está asociado con el portador. Los ejemplos no taxativos incluyen, por ej., una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de tripsina de soja (STI) o un péptido de múltiple unión (MAP). Como es sabido en la técnica un antígeno no antigénico o débilmente antigénico se puede hacer antigénico al acoplarlo a un portador. En la técnica se conocen otros portadores y métodos para acoplar un antígeno a un portador. Véase, por ej., Harlow and Lane, anteriormente, 1998a; Harlow and Lane, anteriormente, 1998b; and David W. Waggoner, Jr. et al., *Immunogenicity-enhancing carriers and*

compositions thereof and methods of using the same, publicación de patente estadounidense No. 20040057958 (25 de marzo, 2004). Un epítopo también se puede generar expresando el epítopo como una proteína de fusión. Los métodos para expresar fusiones de polipéptidos son conocidos por los expertos en la técnica como se describe, por ejemplo, en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999). Como el extremo carboxiloterminal del antígeno de SNAP-25 debe ser el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, un portador debe estar unido al extremo amino del antígeno de SNAP-25.

Se prevé que uno o más espaciadores flexibles puedan estar unidos a un antígeno de SNAP-25 para mejorar la inmunogenicidad de un antígeno de SNAP-25 que es inmunogénico, no inmunogénico o débilmente inmunogénico cuando no está asociado con los enlazadores flexibles. Un espaciador flexible aumenta la longitud total del péptido del antígeno de SNAP-25 y proporciona flexibilidad, facilitando así la presentación adecuada del antígeno de SNAP-25 a las células inmunes. Como un ejemplo no taxativo, una composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 puede comprender un antígeno de SNAP-25 unido a uno o más espaciadores flexibles conjuntamente

para presentar en mejor forma el antígeno de SNAP-25 a células inmunes facilitando así la respuesta inmune.

Un espaciador flexible que comprende un péptido tiene al menos un aminoácido de longitud y comprende aminoácidos no cargados con grupos R de cadena lateral pequeños tales como, por ej., glicina, alanina, valina, leucina o serina. Por lo tanto, en una modalidad un espaciador flexible puede tener, por ej., al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 aminoácidos de longitud. En otra modalidad, un espaciador flexible puede tener, por ej., al menos 1, como máximo 2, como máximo 3, como máximo 4, como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, como máximo 8, como máximo 9 o como máximo 10 aminoácidos de longitud. En aun otra modalidad, un espaciador flexible puede tener, por ej., entre 1 y 3 aminoácidos, entre 2 y 4 aminoácidos, entre 3 y 5 aminoácidos, entre 4 y 6 aminoácidos o entre 5 y 7 aminoácidos. Los ejemplos no taxativos de un espaciador flexible incluyen, por ej., espaciadores G tales como GGG, GGGG (SEQ ID NO: 57) y GGGGS (SEQ ID NO: 58) o espaciadores A tales como AAA, AAAA (SEQ ID NO: 59) y AAAAV (SEQ ID NO: 60). Un espaciador flexible está unido dentro del marco con el antígeno de SNAP-25 como una proteína de fusión.

Como se discutió anteriormente, se usa un espaciador flexible, en parte, para aumentar la longitud total del péptido del antígeno de SNAP-25. Por ejemplo, se puede aumentar la longitud total de un antígeno de SNAP-25 de 5 a 10 aminoácidos al unir un espaciador flexible de 3 a 5 aminoácidos al extremo aminoterminal del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, se puede aumentar la longitud total de un antígeno de SNAP-25 de 5 a 10 aminoácidos al unir un espaciador flexible de 4 a 6 aminoácidos al extremo aminoterminal del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, se puede aumentar la longitud total de un antígeno de SNAP-25 de 5 a 10 aminoácidos al unir un espaciado flexible de 7 a 10 aminoácidos al extremo aminoterminal del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, se puede aumentar la longitud total de un antígeno de SNAP-25 de 7 a 12 aminoácidos al unir un espacio flexible de 1 a 3 aminoácidos al extremo aminoterminal del antígeno de SNAP-25. Como otro ejemplo, se puede aumentar la longitud total de un antígeno de SNAP-25 de 7 a 12 aminoácidos al unir un espacio flexible de 4 a 6 aminoácidos al extremo aminoterminal del antígeno de SNAP-25. La longitud aumentada proporcionada por el espaciador flexible permite la selección de un antígeno de SNAP-25 de tamaño pequeño, aumentando así la probabilidad de que el antígeno de SNAP-25 solo desencadene una respuesta inmune sustancialmente contra una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace

escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, aumentando así la posibilidad de producir anticuerpos α-SNAP-25 que pueden distinguir una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de una SNAP-25 que no tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A.

Se prevé que una composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 descrita en la presente memoria descriptiva pueda comprender opcionalmente un antígeno de SNAP-25 descrito en la presente memoria descriptiva y uno o más adyuvantes. Tal como se usa en la presente, el término "adyuvante" cuando se lo usa en referencia a una composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que aumentan o diversifican la respuesta inmune a un antígeno de SNAP-25. Un adyuvante que induce una respuesta inmune puede, por ejemplo, ser útil para reducir el número de inmunizaciones o la cantidad de antígeno requerido para la inmunización protectora. Se conoce el uso de adyuvantes que inducen una respuesta inmune en una composición que induce una respuesta inmune. El objetivo principal de estos adyuvantes es permitir un aumento en la respuesta inmune. A modo no taxativo, los adyuvantes incluyen, por ej., liposomas, fases oleosas incluyendo, a modo no taxativo,

adyuvantes de tipo Freund tales como, por ej., adyuvante completo de Freund (FCA); adyuvante incompleto de Freund (FIA), glucósidos de sapogenina, tales como, por ej., saponinas, carbopol, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (conocida comúnmente como dipéptido de muramilo o "MDP") y lipopolisacáridos (LPS). Tales adyuvantes se usan generalmente en forma de una emulsión con una fase acuosa o, más comúnmente, pueden consistir en sales inorgánicas no solubles en agua. Estas sales inorgánicas pueden consistir, por ejemplo, en hidróxido de aluminio, sulfato de cinc, hidróxido de hierro coloidal, fosfato de calcio o cloruro de calcio. El hidróxido de aluminio ($Al(OH)_3$) es un adyuvante comúnmente usado. Actualmente, el único adyuvante aprobado por la FDA para usarse en humanos son las sales de aluminio (Alum) que se usan para "almacenar" antígenos por la precipitación de los mismos. Los adyuvantes proporcionados anteriormente son únicamente ejemplos. De hecho, se puede usar cualquier adyuvante que induce una respuesta inmune en una composición que induce una respuesta inmune descrita en la presente memoria descriptiva siempre que el adyuvante satisfaga las características necesarias para inducir una respuesta inmune.

Un portador descrito en la presente memoria descriptiva también puede actuar como un adyuvante. Los adyuvantes y métodos específicos de realizarlos y usarlos se describen en,

por ej., Gupta et al. Vaccine, 11: 993-306, 1993; Arnon, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987 y David W. Waggoner, Jr. et al., *Immunogenicity-Enhancing Carriers and Compositions Thereof and Methods of Using the Same*, publicación de patente estadounidense o. 20040057958 (25 de marzo, 2004). Los adyuvantes adicionales incluyen cualquier compuesto descrito en el capítulo 7 (pp 141-227) de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell, M. F. and Newman, M. J.) Pharmaceutical Biotechnology, Tomo 6, Plenum Press (Nueva York). Los ejemplos de este compendio incluyen dipéptido de muramilo (MDP) y montanida 720. Las moléculas tales como poliinosina:citosina (Poli I:C) o ADN plásmido que contiene motivos CpG también se pueden administrar como adyuvantes en combinación con antígenos encapsulados en micropartículas. En otro ejemplo, el adyuvante es un agente que facilita el ingreso del compuesto antigénico en el citoplasma de una célula tal como listeriolisina, estreptolisina o una mezcla de las mismas.

Por lo tanto, en una modalidad, una composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilada de extremo carboxiloterminal unida a un péptido portador. En aspectos de esta modalidad, un antígeno de SNAP-25 que tienen una

glutamina carboxilada de extremo carboxiloterminal comprende SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39. En otro aspecto de esta modalidad, un antígeno de SNAP-25 comprende la SEQ ID NO: 40. En aspectos de esta modalidad, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de tripsina de soja (STI) o un péptido de múltiple unión (MAP).

En otra modalidad, una composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilada de extremo carboxiloterminal unida a un péptido portador. En aspectos de esta modalidad, un antígeno de SNAP=25 que tienen una lisina carboxilada de extremo carboxilotemrinal comprende las SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 46. En otro aspecto de esta modalidad, un antígeno de SNAP-25 comprende la SEQ ID NO: 47. En aspectos de esta modalidad, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovalbúmina (OVA), uan tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de tripsina de soja (STI) o un péptido de múltiple unión (MAP).

En aun otra modalidad, una composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilada C-terminal unida a uno o más enlazadores flexibles y un péptido portador donde los enlazadores flexibles intervienen entre el antígeno de SNAP-25 y el péptido portador. En aspectos de esta modalidad, un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilada de extremo carboxilotemrinal comprende SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39. En otra modalidad, un antígeno de SNAP-25 comprende la SEQ ID NO: 46. En aspectos de esta modalidad, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovalbúmina (OVA), uan tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de tripsina de soja (STI) o un péptido de múltiple unión (MAP). En aspectos de esta modalidad, el enlazador flexible es un espaciador G o un espaciador A.

En aun otra modalidad, una composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una lisina carboxilada C-terminal unida a un enlazador flexible y un péptido portador donde el enlazador flexible interviene entre el antígeno de SNAP-25 y el péptido portador. En aspectos de esta modalidad, un antígeno de SNAP-25 que tienen una lisina carboxilada de extremo

carboxilotemrinal comprende las SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 46. En otro aspecto de esta modalidad, un antígeno de SNAP-25 comprende la SEQ ID NO: 47. En aspectos de esta modalidad, el péptido portador es una hemocianina de lapa californiana (KLH), una ovalbúmina (OVA), uan tiroglobulina (THY), una albúmina de suero bovino (BSA), un inhibidor de tripsina de soja (STI) o un péptido de múltiple unión (MAP). En aspectos de esta modalidad, el enlazador flexible es un espaciador G o un espaciador A.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, un método para producir anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A se puede producir por una gran variedad de métodos conocidos en la técnica. En la técnica se conocen los protocolos específicos para realizar y usar anticuerpos así como para detectar y medir la especificidad de unión al anticuerpo, la afinidad de unión y la avidez de unión. Véase, por ej., Antibodies: A Laboratory Manual (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 2ª ed. 1998a) y Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001; y Current Protocols in Molecular Biology, 2004; David Anderson et al., *Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use*, patente estadounidense 7,034,132 (25 de abril, 2005) y Beatriz M. Carreno et al., *Antibodies Against CTLA4*, patente estadounidense 7,034,121 (25 de abril, 2006).

A modo de ejemplo no taxativo, los anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A se pueden producir inyectándole a un animal, tal como, por ej., un conejo, una cabra, un ratón u otro mamífero, una o más inyecciones de una composición que induce una respuesta inmune descrita en la presente memoria descriptiva. Como otro ejemplo no taxativo, los anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A se pueden producir inyectándole a un huevo, tal como, por ej., un huevo de gallina, una o más inyecciones de una composición que induce una respuesta inmune descrita en la presente memoria descriptiva. La titulación de

anticuerpo en el animal inmunizado se puede controlar en el tiempo por medio de técnicas estándar tales como con un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) que usa un antígeno inmovilizado o un ensayo de actividad basado en células. En caso de que se desee, los anticuerpos policlonales de una anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A se pueden aislar del mamífero (por ej., de la sangre) y purificar adicionalmente por técnicas conocidas tales como cromatografía de afinidad de proteína A para obtener la fracción IgG o por purificación de afinidad contra el péptido usado para producir los anticuerpos.

Como otro ejemplo no taxativo, un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A se puede producir usando un método de hibridoma. Véase por ej., Capítulo 6 *Monoclonal Antibodies*, pp. 196-244, Harlow & Lane, *anteriormente*, 1998a; y Capítulo 7 *Growing Hybridomas*, pp. 245-282, Harlow & Lane, *anteriormente*, 1998a; y Goding, pp. 59-103, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986). En este método, un animal hospedador tal como, por ej., un ratón, un hámster u otro animal

hospedador adecuado se expone típicamente a una o más inyecciones de un antígeno de SNAP-25 descrito en la presente memoria descriptiva para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos α-SNAP-25 que se unirán específicamente a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. La titulación de anticuerpo en el animal inmunizado se puede controlar en el tiempo por medio de técnicas estándar tales como con un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) que usa un antígeno inmovilizado o un ensayo de actividad basado en células. De manera alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro usando una línea de cultivo celular adecuada. En un momento apropiado luego de la inmunización, por ej., cuando las titulaciones del anticuerpo son más altas, las células que producen anticuerpo se aíslan del animal. Generalmente, si se desean células de origen humano, se usan linfocitos de sangre periférica o, si se desean fuentes mamíferas que no sean de humanos, se usan células del bazo o células del nódulo linfático. Las células que producen anticuerpo aisladas se fusionan con una línea celular inmortal usando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma. Las líneas celulares inmortalizadas son generalmente células de mamíferos transformadas, particularmente células de mieloma que provienen de un roedor, bovino o humano. Típicamente, una

línea celular de mieloma murina se fusiona con esplenocitos recogidos de un ratón adecuadamente inmunizado para producir el hibridoma. Las líneas celulares inmortales preferidas son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Cualquiera de un número de líneas celulares de mieloma se puede usar como un compañero de fusión de acuerdo con técnicas estándar por ej., las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Las células de hibridoma que son el resultado de la fusión luego se seleccionan usando medio HAT que mata las células de mieloma no fusionadas y fusionadas de forma no productiva (los esplenocitos no fusionados se mueren luego de varios días en cultivo ya que no se transforman). El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma se cultivan puede entonces ser analizado para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A . Por ejemplo, los sobrenadantes de hibridoma se pueden analizar usando un medio positivo para α-SNAP-25 en un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de unión in vitro tal como, por ej., un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente unido a una enzima (ELISA) o en un ensayo de actividad basado en células. Tales técnicas y ensayos son conocidos en la técnica.

Véase, por ej., Capítulo 11 *Immunoprecipitation*, pp. 421-470, Harlow & Lane, *anteriormente*, 1998a; Capítulo 12 *Immunoblotting*, pp. 471-510, Harlow & Lane, *anteriormente*, 1998a; Capítulo 14 *Immunoassays*, pp. 553-612, Harlow & Lane, *anteriormente*, 1998a. Luego se pueden realizar estudios adicionales para determinar si el anticuerpo también reacciona a una SNAP-25 que no tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 también se puede determinar por ej., por un análisis Scatchard. Véase, por ej., Peter J. Munson and David Rodbard, *Ligand: A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand-Binding Systems*, 107(1) Anal. Biochem. 220-239 (1980). Luego de que las células de hibridoma deseadas se identifican, se usan procedimientos de dilución limitante para aislar clones que se originan de una única célula hasta obtenerse una línea celular clonal que expresa el anticuerpo monoclonal deseado. Se eligen aquellos anticuerpos suficientemente selectivos para una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A y que se unen con una avidez lo suficientemente alta para caracterizarlos y estudiarlos adicionalmente.

Otra alternativa para preparar un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 que se una de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A es por medio del análisis de una biblioteca de inmunoglobulinas de combinación recombinantes, tales como, por ej., una biblioteca de expresión en fagos de anticuerpos con un péptido de SNAP-25 y miembros de una biblioteca de inmunoglobulina aislada que se une a una SNAP-25 que tiene extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Los kits para generar y analizar bibliotecas de expresión en fagos están comercialmente disponibles tales como, por ej., el sistema de anticuerpo de fago recombinantes Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ) y el kit de expresión en fagos SurfZAP™ (Stratagene, La Jolla, CA). Además, los ejemplos de métodos y reactivos útiles para generar y analizar bibliotecas de expresión de anticuerpos se pueden encontrar, por ejemplo, en Ladner et al. patente estadounidense 5,223,409; Borrebaeck et al. patente estadounidense 5,712,089; Griffiths et al. patente estadounidense 5,885,793; Griffiths et al. patente estadounidense 5,962,255; McCafferty et al. patente estadounidense 5,969,108; Griffiths et al. patente estadounidense 6,010,884; Jespers et al. patente estadounidense 6,017,732; Borrebaeck et al. patente estadounidense 6,027,930; Johnson et al. patente

estadounidense 6,140,471; McCafferty et al. patente estadounidense 6,172,197, cada una de las cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva comprenden, en parte, recoger una muestra que contiene un anticuerpo α-SNAP-25 o células que producen un anticuerpo α-SNAP-25. Tal como se usa en la presente, el término "muestra que contiene un anticuerpo α-SNAP-25 o una célula que produce un anticuerpo α-SNAP-25" se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene al menos un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Se prevé que cualesquiera y todas las muestras que pueden contener un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A se puedan usar en este método incluyendo, a modo no taxativo, sangre, plasma, suero y fluido linfático. También se prevé que cualquier célula capaz de producir un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A se pueda usar en este método incluyendo, a modo no

taxativo, células CD8, células CTL, células B y células T ayudantes. Se puede usar una variedad de métodos conocidos para recoger una muestra que contiene el anticuerpo α-SNAP-25 o una célula que produce un anticuerpo α-SNAP-25 de un individuo, véase, por ej., Harlow & Lane, *anteriormente*, 1998a; and Harlow & Lane, *anteriormente*, 1998b. De manera similar, se puede usar una variedad de métodos bien conocidos para procesar una muestra para aislar un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Se puede seleccionar un procedimiento para recoger una muestra con base en el tipo de anticuerpo a ser aislado. Como un ejemplo no taxativo, cuando se aíslan anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, una muestra adecuada puede ser una muestra de sangre que contiene tales anticuerpos α-SNAP-25, mientras que al aislar anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, una muestra adecuada puede ser una célula que produce anticuerpos α-SNAP-25 tal como una célula de bazo o hibridoma.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, aislar un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de la muestra. Los métodos para aislar tales anticuerpos α-SNAP-25, tales como, por ej., anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A o anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A son bien conocidos para los expertos en la técnica. Véase, por ej., Harlow y Lane, anteriormente, 1998a y Harlow and Lane, anteriormente, 1998b. Por ejemplo, tales anticuerpos policlonales α-SNAP-25 se pueden aislar de la muestra por técnicas conocidas, tales como, por ej., cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G que proporcionan principalmente la fracción IgG de suero inmune. Posteriormente, o alternativamente, un antígeno de SNAP-25 específico se puede inmovilizar en una columna o perlas magnéticas para purificar los anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A por cromatografía de

inmunoafinidad. Un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A se puede aislar del medio de cultivo o fluido de ascitis por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ej., proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforésis en gel, diálisis o cromatografía por afinidad.

Por lo tanto, en una modalidad, un método para producir un anticuerpo α-SNAP-25 que se puede unir de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A que comprende las etapas (a) administrarle a un animal una composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 que comprende un antígeno de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilada C-terminal unida a un péptido portador; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo α-SNAP-25 o una célula que produce un anticuerpo α-SNAP-25 y (c) aislar el componente del anticuerpo α-SNAP-25 de la muestra. En un aspecto de esta modalidad, el anticuerpo α-SNAP-25 que se puede unir de forma selectiva a una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A es un anticuerpo policlonal. En otro aspecto de esta modalidad, el anticuerpo α-SNAP-25 que se

puede unir de forma selectiva a una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto adicional de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 producido que se puede unir de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A es un subtipo de IgG. En otros aspectos de esta modalidad, la composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 también comprende un adyuvante tal como, por ej., polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol (mPEG) o alcohol polivinílico (PVA).

En otra modalidad, un método para producir anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A comprende las etapas (a) administrarle a un animal una composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 que comprende un péptido de SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilada C-terminal unida a un enlazador flexible y un péptido portador donde el enlazador flexible interviene entre el péptido de SNAP-25 y el péptido portador; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo α-SNAP-25 o una célula que produce un anticuerpo α-SNAP-25 y (c) aislar el anticuerpo α-SNAP-25 de

la muestra. En un aspecto de esta modalidad, los anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A es un anticuerpo policlonal. En otro aspecto de esta modalidad, los anticuerpos α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto adicional de esta modalidad, un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido que se puede unir de forma selectiva a una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A en un subtipo de IgG. En otros aspectos de esta modalidad, la composición que induce una respuesta inmune a SNAP-25 también comprende un adyuvante tal como, por ej., polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol (mPEG) o alcohol polivinílico (PVA).

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, un anticuerpo α-SNAP-25 aislado que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula

generada por un sistema inmune que se hizo en respuesta a un antígeno particular que se une específicamente a ese antígeno e incluye anticuerpos de origen natural y anticuerpos de origen no natural. Tal como se usa en la presente, el término "aislado" se refiere a separar una molécula de su ambiente natural por el uso de intervención humana. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un dímero, un multímero, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo bifuncional, un anticuerpo asociado a una célula como un receptor de Ig, un anticuerpo lineal, un diacuerpo o un minicuerpo, siempre que el fragmento presente la actividad biológica deseada y derivados de cadena simple del mismo. Un anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina de longitud completa que comprende los dominios V_H y V_L, así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}, o un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa tales como, por ej., un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fc, un fragmento Fd, un fragmento Fv. Un anticuerpo se puede derivar de cualesquiera especies vertebradas (por ej., humano, de cabra, de caballo, de burro, murino, de ratón, de conejo o de gallina) y puede ser de cualquier tipo (por ej., IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA), clase (*por ej.*, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) o

subclase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). Para una descripción general de la estructura de anticuerpos de origen natural, los anticuerpos de origen no natural y fragmentos de unión a compuesto antigénico del mismo, véase, por ej., Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); Borrabeck, Antibody Engineering, 2ª ed. (Oxford University Press 1995), cada una de las cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Los anticuerpos de origen natural son generalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 daltones, compuestos por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de uniones de disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes de disulfuro intracatenarios espaciados a intervalos regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por una cantidad de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El domino constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el domino variable de la cadena ligera está

alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos particulares de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

El sitio de reconocimiento de antígeno y unión de antígeno completo está contenido dentro de los dominios variables del anticuerpo, es decir, el fragmento Fv. Este fragmento incluye un dímero de un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) en asociación fuerte, no covalente. Cada dominio comprende cuatro regiones flanqueantes (FR), que adoptan principalmente una configuración de lámina β, conectado por tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina β. Cada región hipervariable comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a una región determinante de complementariedad (CDR). De forma colectiva, en la configuración tridimensional de las seis regiones CDR que definen un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L que otorga especificidad de unión al antígeno. Véase, por ej., Cyrus Chothia, et al., *Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions*, Nature 342(6252): 877-883 (1989); Elvin A. Kabat, et al *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, MD. (1991), cada uno de los cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. Los dominios constantes del anticuerpo no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan varias funciones efectoras, tal como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Un antígeno diana generalmente tiene uno o más sitios de unión, también llamados epítopos, que se reconocen mediante el sitio de unión al antígeno formado por CDR. Tal como se usa en la presente, un "epítopo" es sinónimo de "determinante antigénico" y se refiere al sitio en un antígeno diana tal como, por ej., un péptido, polisacárido o molécula que contiene lípido, capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina o receptor de célula T o interactuar de otra forma con una molécula. Cada anticuerpo que se une de forma específica a un epítopo diferente tiene una estructura diferente. Por lo tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

Los anticuerpos policlonales se refieren a una población heterogénea de moléculas de anticuerpo que contienen al menos dos especies de anticuerpo capaces de unirse a un antígeno particular. Por definición, un anticuerpo policlonal incluye dos anticuerpos diferentes que se unen a al menos dos epítopos

diferentes. Tal como se usa en la presente, los términos "anticuerpo monoclonal" o "anticuerpos monoclonales" se refieren a una población sustancialmente homogénea de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie de anticuerpo capaz de unirse a un antígeno particular, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos con la excepción de mutaciones posibles de origen natural que pueden estar presenten en cantidades menores. Por definición, un anticuerpo monoclonal se une a un único epítopo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con anticuerpos policlonales, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminarse por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo según se obtuvo de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que se necesita producción del anticuerpo a través de ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden realizarse por medio del método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) o pueden realizarse por medio de métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente

estadounidense No. 4,816,567, patente estadounidense 5,807,715). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpo de fago utilizando las técnicas descritas en Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597, por ejemplo.

Por lo tanto, en una modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que se une de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. En un aspecto de esta modalidad, el dominio variable de cadena pesada (V_H) es SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 133. En otro aspecto de esta modalidad, el dominio variable de cadena ligera (V_L) es SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 92.

En otra modalidad, una secuencia de ácido nucleico codifica un anticuerpo α-SNAP-25 que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que se une de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. En un aspecto de

esta modalidad, el dominio variable de cadena pesada (V_H) está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81 o SEQ ID NO: 132. En otro aspecto de esta modalidad, el dominio variable de cadena pesada (V_H) está codificado por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 70% idéntica a, al menos 75% idéntica a, al menos 80% idéntica a, al menos 85% idéntica a, al menos 90% idéntica a, al menos 95% idéntica a, al menos 96% idéntico a, al menos 97% idéntica a, al menos 98% idéntica a o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, o SEQ ID NO: 132. En aun otro aspecto de esta modalidad, el dominio variable de cadena ligera (V_L) está codificado por SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 91. En aun otro aspecto de esta modalidad, el dominio variable de cadena ligera (V_L) está codificado por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 70% idéntica a, al menos 75% idéntica a, al menos 80% idéntica a, al menos 85% idéntica a, al menos 90% idéntica a, al menos 95% idéntica a, al menos 96% idéntica a, al menos 97% idéntica a, al menos 98% idéntica a o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: o SEQ ID NO: 91.

En otra modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 comprende una región CDR1, región CDR2, región CDR3 de un dominio variable de cadena pesada (V_H) o cualquier combinación de los mismos que se une de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. En un aspecto de esta modalidad, la región CDR1 del dominio variable de cadena pesada (V_H) es SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 120. En otro aspecto de esta modalidad, la región CDR2 del dominio variable de cadena pesada (V_H) es la SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 o SEQ ID NO: 123. En aun otro aspecto de esta modalidad, la región CD3 del dominio variable de cadena pesada (V_H) es la SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 134 o SEQ ID NO: 135.

En otra modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 comprende una región CDR1, región CDR2, región CDR3 de un dominio variable de cadena ligera (V_L) o cualquier combinación de los mismos que se une de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. En un aspecto de esta modalidad, la región CDR1 del dominio variable de cadena ligera (V_L) es la SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO:

105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129. En otro aspecto de esta modalidad, la región CDR2 del dominio variable de cadena ligera (V_L) es la SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 o SEQ ID NO: 112. En aun otro aspecto de esta modalidad, la región CDR3 del dominio variable de cadena ligera (V_L) es la SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 o SEQ ID NO: 117.

Aun otra modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que une de forma selectiva un epítopo que comprende una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. En un aspecto de esta modalidad, el epítopo comprende la SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37. En un aspecto de esta modalidad, el epítopo comprende la SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44.

Tal como se expresó anteriormente, la secuencia que rodea un sitio de escisión de BoNT/A presente en una SNAP-25 se denomina P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5', donde P_1-P_1' representa el enlace escísil. Luego de la escisión por BoNT/A, los productos de escisión resultantes producidos comprenden un fragmento que incluye la secuencia P_5-P_4-P_3-P_2-P_1 y un fragmento

que incluye $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$. Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpos α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A" se refiere a anticuerpos α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a cualquier fragmento de producto de la escisión de la SNAP-25 que comprende la secuencia $P_5-P_4-P_3-P_2-P_1$, pero no a ningún fragmento de producto de la escisión de la SNAP-25 que comprende la secuencia $P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'$ o a ninguna SNAP-25 que tiene un enlace escísil P_1-P_1' de un sitio de escisión de BoNT/A. Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpo α-SNAP-25_{197}" se refiere a un anticuerpo que se une de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un residuo P_1 en el extremo carboxiloterminal que corresponde a la glutamina 197 de la SEQ ID NO: 5. Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpo α-SNAP-25_{204}" se refiere a un anticuerpo que se une de forma selectiva a una SNAP-25 que tiene un residuo P_1 en el extremo carboxiloterminal que corresponde a la lisina 204 de la SEQ ID NO: 16.

Tal como se usa en la presente, el término "de forma selectiva" se refiere a que tiene un efecto o influencia única o que reacciona solo de una forma o solo con una cosa. Tal como se usa en la presente, el término "se une de forma selectiva", o "unión selectiva" cuando se usa en referencia a

un anticuerpo, se refiere a la unión discriminatoria del anticuerpo al epítopo diana indicado de forma tal que el anticuerpo no reaccione de forma cruzada sustancialmente con epítopos que no son diana. El tamaño mínimo de un epítopo peptídico, como se define en la presente, es de alrededor de cinco aminoácido y un epítopo peptídico típicamente comprende al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15 o al menos 20 aminoácidos. Un epítopo peptídico puede ser discontinuo, es decir, comprende residuos de aminoácidos que no son adyacentes en la estructura primaria del péptido pero se unen en un epítopo por medio de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria del péptido. Además, también cabe destacar que un epítopo puede comprender una porción de una molécula que no sea una secuencia de aminoácidos, tal como, por ej., un resto de carbohidrato, un resto de lípido tal como lipoproteínas o glucolípicos o un resto de aminoácidos químicamente modificado tal como un aminoácido fosforilado. En aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A se puede unir de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A que comprende al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al

menos 9, al menos 10, al menos 15 o al menos 20 aminoácidos. En otros aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A se puede unir de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A que comprende como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, como máximo 8, como máximo 9, como máximo 10, como máximo 15 o como máximo 20 aminoácidos.

La unión selectiva incluye propiedades de unión tales como, por ej., afinidad de unión, especificidad de unión y avidez de unión. Véase David J. King, *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*, pp. 240 (1998). La afinidad de unión se refiere a la extensión de tiempo que el anticuerpo reside en su sitio de unión al epítopo y se puede ver como la fuerza con la cual un anticuerpo se une a su epítopo. La afinidad de unión se puede describir como la constante de disociación (KD) de equilibrio de un anticuerpo que se define como la proporción Kd/Ka en equilibrio. En los casos en que Ka es la constante de velocidad de asociación del anticuerpo y el kd es la constante de velocidad de disociación del anticuerpo. La afinidad de unión se determina tanto por la asociación y disociación y ni la asociación alta o la

disociación baja por sí mismas pueden asegurar la alta afinidad. La constante de velocidad de asociación (Ka) o constante de asociación (Kon) mide el número de eventos de unión por tiempo de unidad o la propensión del anticuerpo y el antígeno a asociarse de forma inversa en su complejo de anticuerpo-antígeno. La constante de velocidad de asociación se expresa en M^{-1} s^{-1} y se simboliza de la siguiente forma: [Ab] x [Ag] x Kon. Cuanto más grande sea la constante de velocidad de asociación, más rápido se unirá el anticuerpo a su antígeno o mayor será la afinidad de unión entre el anticuerpo y el antígeno. La constante de velocidad de disociación (Kd) o constante de disociación (Koff) mide el número de eventos de disociación por tiempo de unidad o la propensión de un complejo de anticuerpo-antígeno para separarse (disociarse) de forma inversa en sus moléculas componentes, a saber, el anticuerpo y el antígeno. La constante de velocidad de disociación se expresa en s^{-1} y se simboliza de la siguiente forma: [Ab + Ag] x Koff. Cuanto menor es la constante de velocidad de disociación, más fuertemente estará unido el anticuerpo a su antígeno o mayor será la afinidad de unión entre el anticuerpo y el antígeno. La constante de disociación (KD) de equilibrio mide la velocidad a la cual los nuevos complejos anticuerpo-antígeno formados igualan la velocidad en la cual los complejos de anticuerpo-antígeno se disocian en equilibrio. La constante de

disociación de equilibrio se expresa en M y se define como Koff/Kon=[Ab] x [Ag]/[Ab + Ag], donde [Ab] es la concentración molar del anticuerpo, [Ag] es la concentración molar del antígeno y [Ab + Ag] es la concentración molar del complejo de anticuerpo-antígeno, donde todas las concentraciones son de tales componentes cuando el sistema está en equilibrio. Cuanto menor sea la constante de disociación de equilibrio más fuertemente estará unido el anticuerpo a su antígeno o mayor será la afinidad de unión entre el anticuerpo y el antígeno.

Por lo tanto, en una modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación de, por ej., menos que 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1}, menos que 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1}, menos que 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1} o menos que 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1}. En otra modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación de, por ej., más que 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1}, más que 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1}, más que 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1} o más que 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1}. En otros aspectos, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un

epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación entre 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1} y 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1}, 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1} y 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1}, 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1} y 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1} o 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1} y 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1}.

En otra modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de velocidad de disociación de menos que 1 x 10^{-3} s^{-1}, menos que 1 x 10^{-4} s^{-1} o menos que 1 x 10^{-5} s^{-1}. En otros aspectos de esta modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de velocidad de disociación de, por ej., menos que 1.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos que 2.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos que 3.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos que 4.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos que 5.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos que 6.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos que 7.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos que 8.0 x 10^{-4} s^{-1} o menos que 9.0 x 10^{-4} s^{-1}. En otra modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil

del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de velocidad de disociación de, por ejemplo, más que 1 x 10^{-3} s^{-1}, más que 1 x 10^{-4} s^{-1} o más que 1 x 10^{-5} s^{-1}. En otros aspectos de esta modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de velocidad de disociación de, por ej., más de 1.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 2.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 3.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 4.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 5.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 6.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 7.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 8.0 x 10^{-4} s^{-1} o más de 9.0 x 10^{-4} s^{-1}.

En otra modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de disociación de equilibrio menor a 0.500 nM. En aspectos de esta modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de disociación de equilibrio, por ej., menor a 0.500 nM, menor a 0.450 nM, menor a 0.400 nM, menor a 0.350 nM, menor a 0.300 nM, menor a 0.250 nM, menor a

0.200 nM, menor a 0.150 nM, menor a 0.100 nM o menor a 0.050 nM. En otra modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de disociación de equilibrio mayor a 0.500 nM. En aspectos de esta modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de disociación de equilibrio, por ej., mayor a 0.500 nM, mayor a 0.450 nM, mayor a 0.400 nM, mayor a 0.350 nM, mayor a 0.300 nM, mayor a 0.250 nM, mayor a 0.200 nM, mayor a 0.150 nM, mayor a 0.100 nM o mayor a 0.050 nM.

En aun otra modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación para la SNAP-25 intacta, por ej., menor que 1×10^0 M^{-1} s^{-1}, menor que 1×10^1 M^{-1} s^{-1}, menor que 1×10^2 M^{-1} s^{-1}, menor que 1×10^3 M^{-1} s^{-1} o menor que 1×10^4 M^{-1} s^{-1}. En otra modalidad, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de

forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A puede tener una constante de velocidad de asociación para la SNAP-25 intacta de, por ej., como máximo 1 x 10^0 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1 x 10^1 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1 x 10^2 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1 x 10^3 M^{-1} s^{-1} o como máximo 1 x 10^4 M^{-1} s^{-1}.

La especificidad de unión en la capacidad de un anticuerpo de discriminar entre una molécula que contiene su epítopo y una molécula que no contiene ese epítopo. Una forma de medir la especificidad de unión es comparar la velocidad de asociación Kon del anticuerpo para una molécula que contiene su epítopo con relación a la velocidad de asociación Kon del anticuerpo para una molécula que no contiene ese epítopo. Por ejemplo, al comparar la constante de velocidad de asociación (Ka) de una anticuerpo α-SNAP-25 para un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A con respecto a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo tal como, por ej., un epítopo de SNAP-25 que no tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A o un epítopo de SNAP-25 que tiene un enlace escísil P_1-P_1' intacto de un sitio de unión a la BoNT/A. En aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que se

une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para la SNAP-25 que no comprende su(s) epítopo(s), por ej., menor que 1 x 10^0 M^{-1} s^{-1}, menor que 1 x 10^1 M^{-1} s^{-1}, menor que 1 x 10^2 M^{-1} s^{-1}, menor que 1 x 10^3 M^{-1} s^{-1} o menor que 1 x 10^4 M^{-1} s^{-1}. En otros aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para la SNAP-25 que no comprende su(s) epítopo(s) de, por ej., como máximo 1 x 10^0 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1 x 10^1 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1 x 10^2 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1 x 10^3 M^{-1} s^{-1} ó como máximo 1 x 10^4 M^{-1} s^{-1}.

En aun otros aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para su epítopo con respecto a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo de, por ej., el menos 2 veces más, al menos 3 veces más, al menos 4 veces más, al menos 5 veces más, al menos 6 veces más, al menos 7 veces más, al menos 8 veces más o al menos 9 veces

más. En aspectos adicionales de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para su epítopo con respecto a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo de, por ej., al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, al menos 1,000 veces más o al menos 10,000 veces más. En aun otros aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para su epítopo con respecto a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo de, por ej., como máximo 1 vez más, como máximo 2 veces más, como máximo 3 veces más, como máximo 4 veces más, como máximo 5 veces más, como máximo 6 veces más, como máximo 7 veces más, como máximo 8 veces más o como máximo 9 veces más. En aun otros aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para su epítopo con respecto a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo de, por ej., como

máximo 10 veces más, como máximo 100 veces más, como máximo 1,000 veces más o como máximo 10,000 veces más.

La especificidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A también se puede caracterizar como la proporción que tal anticuerpo α-SNAP-25 puede discriminar su epítopo de SNAP-25 con respecto a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo tal como, por ej., un epítopo de SNAP-25 que no tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A o un epítopo de SNAP-25 que tiene un enlace escísil P_1-P_1' intacto de un sitio de escisión de la BoNT/A. En aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A tiene una proporción de especificidad de unión por su epítopo de SNAP-25 con respecto a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo de, por ej., al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 64:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1 o al menos 40:1. En aun otros aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un

epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A tiene una proporción de especificidad de unión por su epítopo de SNAP-25 con respecto a una SNAP-25 que no tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de, por ej., al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1 o al menos 40:1. En aun otros aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A tiene una proporción de especificidad de unión por su epítopo de SNAP-25 con respecto a una SNAP-25 que tiene un enlace escísil P_1-P_1' de absorción de un sitio de escisión de la BoNT/A de, por ej., al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 64:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1 o al menos 40:1.

La avidez de unión, también llamada afinidad funcional, se refiere a la suma total de la fuerza de unión funcional entre un anticuerpo multivalente y su antígeno. Las moléculas de anticuerpo pueden tener más de un sitio de unión (por ej.,

2 para IgG, 10 para IgM) y muchos antígenos contienen más de un sitio antigénico. Mientras que la avidez de unión de un anticuerpo depende de las afinidades de unión de los sitios de unión al anticuerpo individuales, la avidez de unión es mayor que la afinidad de unión ya que todas las interacciones anticuerpo-antígeno deben romperse simultáneamente para que el anticuerpo se disocie completamente. Se prevé que un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A se pueda unir de forma selectiva a todos y cualesquiera epítopos para ese anticuerpo.

Por lo tanto, en una modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 es un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. En aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 es un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene una glutamina de extremo carboxiloterminal o un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene una lisina de extremo carboxiloterminal. En otros aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 es un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que

tiene un residuo P_1 en el extremo carboxiloterminal que corresponde a una glutamina 197 de la SEQ ID NO: 5 o un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene residuo P_1 en el extremo carboxiloterminal que corresponde a la lisina 204 de la SEQ ID NO: 16. En aun otros aspectos de esta modalidad, un anticuerpo α-SNAP-25 es un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene una secuencia de aminoácidos de extremo carboxiloterminal de la SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 46.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, un método basado en inmunoensayos para detectar la actividad de endopeptidasa redirigida. Los métodos basados en inmunoensayos descritos en la presente memoria descriptiva se pueden evaluar por diversos parámetros incluyendo, por ej, exactitud, precisión, límite de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), intervalo, especificidad, selectividad, linealidad, resistencia y aptitud del sistema. La exactitud de un método es la medida de exactitud de un método analítico o la cercanía de concordancia entre el valor medido y el valor que es aceptado como un valor verdadero convencional o un

valor de referencia aceptado. La precisión de un método es la medida de concordancia entre los resultados de pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. Como tal, la precisión evalúa 1) variabilidad entre ensayos; 2) variabilidad en días (repetición) y 3) variabilidad entre días (precisión intermedia) y 4) variabilidad entre laboratorios (capacidad de reproducción). El coeficiente de variación (CV%) es una medida cuantitativa de precisión expresada con respecto al valor medio observado o teórico.

Un método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva debe ser capaz de detectar, sobre el fondo, la presencia de un complejo anticuerpo α-SNAP-25-antígeno que comprende una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. El límite de detección (LOD) de un método se refiere a la concentración de analito que da lugar a una señal que es significativamente diferente del control negativo o blanco y representa la menor concentración de analito que se puede distinguir de la referencia.

Por lo tanto, en una modalidad, el método basado en inmunoensayos en la presente memoria descriptiva puede detectar el LOD de endopeptidasa redirigida en una cantidad

que es significativamente diferente de un control negativo o blanco. En un aspecto de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ej., 10 ng o menos, 9 ng o menos, 8 ng o menos, 7 ng o menos, 6 ng o menos, 5 ng o menos, 4 ng o menos, 3 ng o menos, 2 ng o menos, 1 ng o menos de una endopeptidasa redirigida. En aun otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ej., 900 pg o menos, 800 pg o menos, 700 pg o menos, 600 pg o menos, 500 pg o menos, 400 pg o menos, 300 pg o menos, 200 pg o menos, 100 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En aspectos adicionales de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ej., 90 pg o menos, 80 pg o menos, 70 pg o menos, 60 pg o menos, 50 pg o menos, 40 pg o menos, 30 pg o menos, 20 pg o menos, 10 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ej., 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En aun otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ej., 0.9 pg o menos, 0.8 pg o menos, 0.7 pg o menos, 0.6 pg o menos, 0.5

pg o menos, 0.4 pg o menos, 0.3 pg o menos, 0.2 pg o menos, 0.1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida.

En otro aspecto de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ej., 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos , 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos, 10 nM o menos, 9 nM o menos, 8 nM o menos, 7 nM o menos, 6 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos o 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ej., 900 pM o menos, 800 pM o menos, 700 pM o menos, 600 pM o menos, 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos, 200 pM o menos o 100 pM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ej., 100 pM o menos, 90 pM o menos, 80 pM o menos, 70 pM o menos, 60 pM o menos, 50 pM o menos, 40 pM o menos, 30 pM o menos, 20 pM o menos o 10 pM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOD de, por ej., 10 pM o menos de una endopeptidasa redirigida, 9 pM o menos, 8 pM o menos, 7 pM o menos, 6 pM o

menos, 5 pM o menos, 4 pM o menos, 3 pM o menos, 2 pM o menos o 1 pM o menos de una endopeptidasa redirigida.

El límite de cuantificación (LOQ) son las menores y las mayores concentraciones de analito en una muestra o espécimen que se puede medir con un nivel aceptable de exactitud y precisión. El límite inferior de cuantificación se refiere a la menor dosis que un método de detección puede medir de forma consistente desde el fondo. El límite superior de cuantificación es la dosis más alta que un método de detección puede medir de forma consistente antes de que ocurra la saturación de la señal. El intervalo lineal del método es el área entre los límites inferior y superior de cuantificación. El intervalo lineal se calcula restando el límite de inferior de cuantificación del límite superior de cuantificación. Tal como se usa en la presente, el término "proporción de señal a ruido para la asíntota inferior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite inferior de detección dividida por la señal de fondo. Tal como se usa en la presente, el término "proporción de señal a ruido para la asíntota superior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite superior de detección dividida por la señal de fondo.

Por lo tanto, en una modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva puede detectar el LOQ de endopeptidasa redirigida en una cantidad que es significativamente diferente de un control negativo o blanco. En un aspecto de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ej., 10 ng o menos, 9 ng o menos, 8 ng o menos, 7 ng o menos, 6 ng o menos, 5 ng o menos, 4 ng o menos, 3 ng o menos, 2 ng o menos, 1 ng o menos de una endopeptidasa redirigida. En aun otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ej., 900 pg o menos, 800 pg o menos, 700 pg o menos, 600 pg o menos, 500 pg o menos, 400 pg o menos, 300 pg o menos, 200 pg o menos, 100 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En aspectos adicionales de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ej., 90 pg o menos, 80 pg o menos, 70 pg o menos, 60 pg o menos, 50 pg o menos, 40 pg o menos, 30 pg o menos, 20 pg o menos, 10 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ej., 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una endopeptidasa

redirigida. En aun otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ej., 0.9 pg o menos, 0.8 pg o menos, 0.7 pg o menos, 0.6 pg o menos, 0.5 pg o menos, 0.4 pg o menos, 0.3 pg o menos, 0.2 pg o menos, 0.1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida.

En otro aspecto de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ej., 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos, 10 nM o menos, 9 nM o menos, 8 nM o menos, 7 nM o menos, 6 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos o 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ej., 900 pM o menos, 800 pM o menos, 700 pM o menos, 600 pM o menos, 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos, 200 pM o menos o 100 pM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ej., 100 pM o menos, 90 pM o menos, 80 pM o menos, 70 pM o menos, 60 pM o menos, 50 pM o menos, 40 pM o menos, 30 pM o menos, 20 pM o menos o 10 pM o menos de una endopeptidasa redirigida. En aun

otros aspectos de esta modalidad, el método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene un LOQ de, por ej., 10 pM o menos de una endopeptidasa redirigida, 9 pM o menos, 8 pM o menos, 7 pM o menos, 6 pM o menos, 5 pM o menos, 4 pM o menos, 3 pM o menos, 2 pM o menos o 1 pM o menos de una endopeptidasa redirigida.

Un ensayo basado en inmunoensayos útil para poner en práctica los aspectos de los métodos descritos debe tener una precisión de no más del 50%. En aspectos de esta modalidad, un ensayo basado en inmunoensayos tiene una precisión de no más del 50%, no más del 40%, no más del 30% o no más del 20%. En otros aspectos de esta modalidad, un ensayo basado en inmunoensayos tiene una precisión de no más del 15%, no más del 10% o no más del 5%. En otros aspectos de esta modalidad, un ensayo basado en inmunoensayos tiene una precisión de no más del 4%, no más del 3%, no más del 2% o no más del 1%.

Un ensayo basado en inmunoensayos útil para poner en práctica un aspecto de los métodos descritos debe tener una exactitud de al menos 50%. En aspectos de esta modalidad, un ensayo basado en inmunoensayos tiene una exactitud de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70% o al menos 80%. En otros aspectos de esta modalidad, un ensayo basado en inmunoensayos tiene una exactitud de al menos 85%, al menos 90% o al menos

95%. En otros aspectos de esta modalidad, un ensayo basado en inmunoensayos tiene una exactitud de al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%.

Un método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva debe tener una proporción de señal a ruido para la asíntota inferior que es estadísticamente significativa y una proporción de señal a ruido para la asíntota superior que es estadísticamente significativa. En aspectos de esta modalidad, un método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva tiene una proporción de señal a ruido para la asíntota inferior de, por ej., al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1 o al menos 20:1. En otros aspectos de esta modalidad, un método basado en inmunoensayos tiene una proporción de señal a ruido para la asíntota superior de, por ej., al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1, al menos 40:1, al menos 45:1, al menos 50:1, al menos 60:1, al menos 70:1, al menos 80:1, al menos 90:1 o al menos 100:1, al menos 150:1, al menos 200:1, al menos 250:1, al menos 300:1, al menos 350:1, al menos 400:1, al menos 450:1, al menos 500:1, al menos 550:1 o al menos 600:1.

La especificidad de un método define la capacidad del método de medir el analito de interés para la exclusión de otros componentes relevantes, tal como, por ej., analito parcialmente activo o inactivo. La selectividad de un método describe la capacidad de un método analítico de diferenciar diversas sustancias en una muestra. La linealidad de un método es su capacidad de provocar resultados que son directamente, o por una transformación matemática bien definida, proporcional a la concentración de analito en la muestra. Por lo tanto, en una modalidad, un método basado en inmunoensayos descrito en la presente memoria descriptiva puede distinguir una endopeptidasa redirigida completamente activa de una endopeptidasa redirigida parcialmente activa que tiene, por ej., 70% o menos, 60% o menos, 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos o 10% o menos de la actividad de una endopeptidasa redirigida completamente activa.

La resistencia del método es la capacidad de reproducción de los resultados de prueba obtenidos para las muestras idénticas en condiciones de prueba normales (pero variables). La solidez de un procedimiento es una medida de su capacidad de permanecer no afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su fiabilidad en uso normal. Por lo tanto, mientras que la resistencia evalúa cambios inevitables, la

solidez evalúa los cambios deliberados. Los parámetros típicos evaluados para determinar la resistencia y la solidez incluyen los efectos de congelamiento/descongelamiento, tiempos de incubación, temperatura de incubación, longevidad del reactivo, preparación de la muestra, almacenamiento de la muestra, número de pasajes celulares, lotes de endopeptidasa redirigida, variabilidad entre purificaciones y variabilidad entre reacciones de corte. Los parámetros de solidez para los ensayos basados en células incluyen el banco celular (comienzo, medio y final del congelamiento), nivel del pasaje celular, densidad de la siembra celular, densidad de la solución madre celular (cuántos días en cultivo), edad celular en el matraz (tiempo de espera para la siembra), tiempo de incubación, diferentes placas, cantidades excesivas de suero y fuente de reactivos. La aptitud del sistema del método es la determinación del desempeño del ensayo, incluyendo el desempeño de reactivos e instrumentos, en el tiempo, por el análisis de un estándar de referencia o una molécula de referencia. La aptitud del sistema se acentúa en las directrices de la FDA con referencia al hecho de que el equipo, electrónica, desempeño del ensayo y muestras a ser analizadas constituyen un sistema integrado. La aptitud del sistema se puede evaluar analizando el paralelismo, que se produce cuando al graficar la dosis logarítmica en comparación con la respuesta, las diluciones en serie de las diluciones de

referencia y en serie de las muestras debería dar lugar a curvas paralelas.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, una célula de una línea celular establecida. Como se usa en la presente, el término "célula" se refiere a cualquier célula eucariota susceptible a la actividad de la endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida o cualquier célula eucariota que puede absorber una endopeptidasa redirigida. El término "célula" abarca células de una variedad de organismos, tales como, por ej., células murinas, de ratas, porcinos, bovinos, equinos, primates y humanas; de una variedad de tipos celulares tales como, por ej., neuronales y no neuronales y se pueden aislar de una población, tejido u organismo de célula heterogénea, o ser parte de los mismos. Tal como se usa en la presente, el término "línea celular establecida" es sinónimo de "línea celular inmortal" o "línea celular transformada" y se refiere a un cultivo celular de células seleccionadas para la propagación indefinida de una población celular que proviene de una fuente de organismo, tejido u órgano. Por definición, una línea celular establecida excluye un cultivo celular de células principales. Tal como se usa en la presente, el término "células principales" se refiere a células recolectadas directamente de tejidos u órganos recién

extraídos y no tienen el potencial de propagarse indefinidamente. Una línea celular establecida puede comprender una población heterogénea de células o una población uniforme de células. Una línea celular establecida que proviene de una única célula se denomina línea celular clonal. Una línea celular establecida puede ser una cuyas células expresen de forma endógena todos los componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo celular global por el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 y abarca la unión de una endopeptidasa redirigida desde su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, el desplazamiento de la cadena ligera de endopeptidasa redirigida desde una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de una SNAP-25. De manera alternativa, una línea celular establecida puede ser una a cuyas células se les ha introducido desde una fuente exógena al menos un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 y abarca la unión de una endopeptidasa redirigida desde su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, el desplazamiento de la cadena ligera de endopeptidasa redirigida desde una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de una SNAP-25. También denominada línea celular

genéticamente modificada, las células de una línea celular establecida pueden, por ej., expresar una endopeptidasa redirigida exógena tal como, por ej., una ORL1 exógena, una DOR exógena, una KOR exógena, una MOR exógena, un receptor de Galanina 1 exógeno, un receptor de Galanina 2 exógeno, un receptor de Galanina 3 exógeno o cualquier combinación de los mismos.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, una célula de una línea celular establecida susceptible a la actividad de endopeptidasa dirigida. Tal como se usa en la presente, los términos "célula(s) susceptibles a actividad de endopeptidasa redirigida", "célula(s) susceptibles a la actividad de endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida" o "célula(s) de una línea celular clonal establecida susceptible a la actividad de endopeptidasa redirigida por endopeptidasa redirigida" se refieren a célula(s) que puede(n) experimentar el mecanismo celular global por el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 inhibiendo así la exocitosis y abarca la unión de una endopeptidasa redirigida desde su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, el desplazamiento de la cadena de actividad de endopeptidasa redirigida desde una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de una

SNAP-25. Por definición, las células(s) susceptible(s) a la actividad de endopeptidasa redirigida debe(n) expresar o estar diseñada(s) para expresar, al menos un receptor de endopeptidasa redirigida y al menos un sustrato de SNAP-25. Tal como se usan en la presente, los términos "célula(s) que pueden absorber una endopeptidasa redirigida" o "célula(s) que comprenden una línea celular clonal establecida que puede absorber endopeptidasa redirigida" se refieren a células que pueden someterse al mecanismo celular global por el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25 inhibiendo así la exocitosis y abarca la unión de una endopeptidasa redirigida desde su receptor, la internalización del complejo endopeptidasa/receptor, el desplazamiento de la cadena ligera de endopeptidasa redirigida desde una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de una SNAP-25. Por definición, las células(s) que puede(n) absorber endopeptidasa redirigida debe(n) expresar o estar diseñada(s) para expresar, al menos un receptor de endopeptidasa redirigida y al menos un sustrato de SNAP-25.

Por lo tanto, en una modalidad, las células de una línea celular clonal establecida son susceptibles a la actividad de endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida son susceptibles a

actividad de endopeptidasa redirigida en, por ej., alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 90 nM o menos, alrededor de 80 nM o menos, alrededor de 70 nM o menos, alrededor de 60 nM o menos, alrededor de 50 nM o menos, alrededor de 40 nM o menos, alrededor de 30 nM o menos, alrededor de 20 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos, las células de una línea celular establecida son susceptibles a la actividad de endopeptidasa redirigida en, por ej., alrededor de 9 nM o menos, alrededor de 8 nM o menos, alrededor de 7 nM o menos, alrededor de 6 nM o menos, alrededor de 5 nM o menos, alrededor de 4 nM o menos, alrededor de 3 nM o menos, alrededor de 2 nM o menos o alrededor de 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En aun otros aspectos, las células de una línea celular establecida son susceptibles a la actividad de endopeptidasa redirigida en, por ej., alrededor de 0.9 nM o menos, alrededor de 0.8 nM o menos, alrededor de 0.7 nM o menos, alrededor de 0.6 nM o menos, alrededor de 0.5 nM o menos, alrededor de 0.4 nM o menos, alrededor de 0.3 nM o menos, alrededor de 0.2 nM o menos o alrededor de 0.1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. Tal como se usa en la presente, el término "alrededor" cuando califica un valor de un objeto, número, porcentaje o término establecido se refiere a un intervalo de más o menos diez por ciento del valor del objeto, porcentaje, parámetro o término establecido.

En otra modalidad, las células que comprenden una línea celular establecida pueden absorber una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta modalidad, las células que comprenden una línea celular establecida pueden absorber, por ej., alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 90 nM o menos, alrededor de 80 nM o menos, alrededor de 70 nM o menos, alrededor de 60 nM o menos, alrededor de 50 nM o menos, alrededor de 40 nM o menos, alrededor de 30 nM o menos, alrededor de 20 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos, las células que comprenden una línea celular establecida poseen la capacidad de absorber alrededor de 9 nM o menos, alrededor de 8 nM o menos, alrededor de 7 nM o menos, alrededor de 6 nM o menos, alrededor de 5 nM o menos, alrededor de 4 nM o menos, alrededor de 3 nM o menos, alrededor de 2 nM o menos o alrededor de 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En aun otros aspectos, las células que comprenden una línea celular establecida poseen la capacidad de absorber alrededor de 0.9 nM o menos, alrededor de 0.8 nM o menos, alrededor de 0.7 nM o menos, alrededor de 0.6 nM o menos, alrededor de 0.5 nM o menos, alrededor de 0.4 nM o menos, alrededor de 0.3 nM o menos, alrededor de 0.2 nM o menos o alrededor de 0.1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.

Aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, células de una línea celular establecida que presentan una unión selectiva para una endopeptidasa redirigida descrita en la presente memoria descriptiva. Tal como se usan en la presente, los términos "se une de forma selectiva" o "unión selectiva" cuando se usan en referencia a una endopeptidasa redirigida, se refieren a la unión discriminatoria de una endopeptidasa redirigida desdel receptor diana indicado de forma tal que la endopeptidasa redirigida no se una sustancialmente a un receptor que no es diana. El grado hasta el que las células de una línea celular establecida presentan unión selectiva por una endopeptidasa redirigida se puede medir por la medida en que estas células presentan absorción no selectiva para una molécula que no tiene el dominio de direccionamiento de la endopeptidasa redirigida. Una forma de evaluar la absorción no selectiva de una molécula que no tiene el dominio de direccionamiento de la endopeptidasa redirigida es medir la absorción no selectiva de un fragmento LH_N. Un fragmento LH_N es uno que comprende un dominio de desplazamiento de toxina clostridio y un dominio enzimático de toxina clostridio pero que no tiene ningún dominio de direccionamiento. Los ejemplos no taxativos de fragmentos LH_N incluyen un fragmento LH_N/A, un fragmento LH_N/B, un fragmento LH_N/C, un fragmento LH_N/D, un fragmento LH_N/E, un fragmento LH_N/F y un fragmento LH_N/G. Un ejemplo de fragmento LH_N/A es la

SEQ ID NO: 146 que se codifica por la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 147.

Por lo tanto, en una modalidad, las células de una línea celular establecida presentan unión selectiva para una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida presentan unión selectiva para una endopeptidasa redirigida que representa, por ej., al menos 75% de la actividad total analizada, al menos 80% de la actividad total analizada, al menos 85% de la actividad total analizada, al menos 90% de la actividad total analizado al menos 95% de la actividad total analizada. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida presentan unión selectiva para una endopeptidasa redirigida que representa, por ej., alrededor de 75% a alrededor de 100% de la actividad total ensayada, alrededor de 80% a alrededor de 100% de la actividad total ensayada, alrededor de 85% a alrededor de 100% de la actividad total ensayada, alrededor de 90% a alrededor de 100% de la actividad total ensayada.

En otra modalidad, las células de una línea celular establecida presentan absorción no selectiva mínima para un fragmento LH_N. En aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida presentan absorción no selectiva

de un fragmento LH_N que es, por ej., como máximo 25% de la absorción total medida, como máximo 20% de la absorción total medida, como máximo 15% de la absorción total medida, como máximo 10% de la absorción total medida o como máximo 5% de la absorción total medida. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida presentan absorción no selectiva de un fragmento LH_N que es de, por ej., alrededor de 0% a alrededor de 25% de la absorción total medida, alrededor de 0% a alrededor de 20% de la absorción total medida, alrededor de 0% a alrededor de 15% de la absorción total medida, alrededor de 0% a alrededor de 10% de la absorción total medida o alrededor de 0% a alrededor de 5% de la absorción total medida.

En aún otra modalidad, las células de una línea celular establecida presentan absorción mínima no selectiva de un fragmento LH_N/A. En aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida presentan absorción no selectiva de un fragmento LH_N/A que es, por ej., como máximo 25% de la absorción total medida, como máximo 20% de la absorción total medida, como máximo 15% de la absorción total medida, como máximo 10% de la absorción total medida o como máximo 5% de la absorción total medida. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida presentan absorción no selectiva de un fragmento LH_N/A que es de, por

ej., alrededor de 0% a alrededor de 25% de la absorción total medida, alrededor de 0% a alrededor de 20% de la absorción total medida, alrededor de 0% a alrededor de 15% de la absorción total medida, alrededor de 0% a alrededor de 10% de la absorción total medida o alrededor de 0% a alrededor de 5% de la absorción total medida.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, células de una línea celular establecida que presentan un número suficiente de sitios de unión al receptor en la membrana plasmática para otorgar sensibilidad y unión selectiva para una endopeptidasa redirigida.

Un ensayo de unión de saturación de equilibrio mide la unión total y no específica de un ligando en diversas concentraciones. La constante de disociación de equilibrio (K_d) para el ligando y el número máximo de sitios de unión al receptor, Bmáx, se pueden calcular a partir de la unión específica usando análisis de regresión no lineal. La unión específica se calcula restando la unión no específica de un ligando de la unión total observada. K_d es la concentración de ligando necesaria para alcanzar la unión media máxima y se mide en términos de molaridad. Bmáx es el número máximo de sitios de unión presentes en la membrana plasmática y se mide

en términos de pmol/mg, pmol/célula, fmol/célula o sitios/célula.

Por lo tanto, en una modalidad, las células de una línea celular establecida presentan un número suficiente de sitios de unión al receptor en la membrana plasmática para otorgar sensibilidad y unión selectiva para una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida presentan un valor Bmáx de, por ej., al menos 0.1 fmol/célula, al menos 0.2 fmol/célula, al menos 0.3 fmol/célula, al menos 0.4 fmol/célula, al menos 0.5 fmol/célula, al menos 0.6 fmol/célula, al menos 0.7 fmol/célula, al menos 0.8 fmol/célula, al menos 0.9 fmol/célula o al menos 1.0 fmol/célula para el ligando de direccionamiento de una endopeptidasa redirigida.

En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida presentan un valor Bmáx de, por ej., al menos 1 fmol/célula, al menos 2 fmol/célula, al menos 3 fmol/célula, al menos 4 fmol/célula, al menos 5 fmol/célula, al menos 6 fmol/célula, al menos 7 fmol/célula, al menos 8 fmol/célula, al menos 9 fmol/célula o al menos 10 fmol/célula para el ligando de direccionamiento de una endopeptidasa redirigida.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, células de una línea celular clonal establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida que son más estables que las células de la línea celular original a partir de la cual se derivó la línea celular clonal. Tal como se usa en la presente, el término "estable" se refiere a células de una línea celular clonal establecida para un número particular de pasajes que presentan una EC_{50} relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida y/o curva de respuesta a la dosis bien definida para la actividad de endopeptidasa redirigida que es similar a los valores de EC_{50} relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida y/o curva de respuesta a la dosis bien definida que presentan las células de la línea celular original de la cual se derivó la línea celular, en el mismo número de pasajes, o un número similar, donde se usan las mismas condiciones de ensayo y la misma endopeptidasa redirigida en ambos ensayos.

Por lo tanto, en una modalidad, las células de una línea celular clonal establecida son más estables en comparación con la línea celular original de la cual se derivó la línea celular. En un aspecto de esta modalidad, las células de una línea celular clonal establecida son más estables en comparación con la línea celular original SK-N-DZ. En otro aspecto de esta modalidad, las células de una línea celular

clonal establecida son más estables en comparación con la línea celular original SK-N-DZ ATCC CRL-2149. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular clonal establecida son más estables en, por ej., al menos 5 pasajes más, al menos 10 pasajes más, al menos 15 pasajes más, al menos 20 pasajes más, al menos 25 pasajes más o al menos 30 pasajes más, en comparación con la línea celular original de la cual se derivó la línea celular clonal. En aun otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular clonal establecida son más estables en, por ej., al menos 5 pasajes más, al menos 10 pasajes más, al menos 15 pasajes más, al menos 20 pasajes más, al menos 25 pasajes más o al menos 30 pasajes más, en comparación con la línea celular original de la cual se derivó la línea celular clonal.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, células de una línea celular clonal establecida susceptibles a la actividad de endopeptidasa redirigida que son estables en una pluralidad de pasajes celulares. Tal como se usa en la presente, el término "estable" se refiere a células de una línea celular clonal establecida para un número particular de pasajes que presentan una EC_{50} relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida y/o curva de respuesta a la dosis bien definida para la actividad de una endopeptidasa redirigida que es similar a los valores

de EC_{50} relativa, sensibilidad, eficacia, asíntota superior bien definida y/o curva de respuesta a la dosis bien definida que presentan las células de la misma línea celular clonal establecida pero de un pasaje o pasajes anteriores, donde se usan las mismas condiciones de ensayo y la misma endopeptidasa redirigida en ambos ensayos.

Las células de una línea celular establecida descrita en la presente memoria descriptiva pueden presentar una sensibilidad consistente a la actividad de endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pasajes celulares. Tal como se usa en la presente, el término "sensibilidad a la actividad de endopeptidasa redirigida" se refiere a la dosis más baja que un ensayo puede medir consistentemente por encima de la señal detectada por una señal de referencia o de fondo que no es de tratamiento.

Por lo tanto, en una modalidad, las células de la línea celular clonal establecida presentan una sensibilidad para la actividad de endopeptidasa redirigida para cualquier número de pasajes dados que tengan por ej., 100 nM o menos, alrededor de 80 nM o menos, alrededor de 70 nM o menos, alrededor de 60 nM o menos, alrededor de 50 nM o menos, alrededor de 40 nM o menos, alrededor de 30 nM o menos, alrededor de 20 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos, alrededor de 1 nM o menos,

alrededor de 0.9 nM o menos, alrededor de 0.8 nM o menos, alrededor de 0.7 nM o menos, alrededor de 0.6 nM o menos, alrededor de 0.5 nM o menos, alrededor de 0.4 nM o menos, alrededor de 0.3 nM o menos, alrededor de 0.2 pM o menos o alrededor de 0.1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta modalidad, las células de la línea celular clonal establecida presentan una sensibilidad a la actividad de endopeptidasa redirigida para cualquier número de pasajes dados de, por ejemplo, alrededor de 0.01 nM a alrededor de 100 nM, alrededor de 0.01 nM a alrededor de 75 nM, alrededor de 0.01 nM alrededor de 50 nM, alrededor de 0.01 nM a alrededor de 25 nM, alrededor de 0.01 nM a alrededor de 20 nM, alrededor de 0.01 nM a alrededor de 15 nM, alrededor de 0.01 nM a alrededor de 10 nM, alrededor de 0.01 nM a alrededor de 5 nM, alrededor de 0.001 nM a alrededor de 100 nM, alrededor de 0.001 nM a alrededor de 75 nM, alrededor de 0.001 nM a alrededor de 50 nM, alrededor de 0.001 nM a alrededor de 25 nM, alrededor de 0.001 nM a alrededor de 20 nM, alrededor de 0.001 nM a alrededor de 15 nM, alrededor de 0.001 nM a alrededor de 10 nM o alrededor de 0.001 nM a alrededor de 5 nM de una endopeptidasa redirigida.

En otra modalidad, las células de la línea celular clonal establecida presentan una sensibilidad para la actividad de endopeptidasa redirigida que es de alrededor de

100 nM o menos, alrededor de 75 nM o menos, alrededor de 50 nM o menos, alrededor de 25 nM o menos, alrededor de 20 nM o menos, alrededor de 15 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos o alrededor de 1 nM o menos para , por ej., 5 o más pasajes celulares, 10 o más pasajes celulares, 15 o más pasajes celulares, 20 o más pasajes celulares, 25 o más pasajes celulares, 30 o más pasajes celulares, 35 o más pasajes celulares, 40 o más pasajes celulares, 45 o más pasajes celulares o 50 o más pasajes celulares. En otros aspectos de esta modalidad, las células de la línea celular clonal establecida presentan una sensibilidad para la actividad de endopeptidasa redirigida que es de alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 75 nM o menos, alrededor de 50 nM o menos, alrededor de 25 nM o menos, alrededor de 20 nM o menos, alrededor de 15 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos o alrededor de 1 nM o menos para, por ej., alrededor de 15 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 20 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 25 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 30 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 35 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 40 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 45 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 50 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 15 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 20 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 25 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 30 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 35 a alrededor de 50 pasajes,

alrededor de 40 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 15 a alrededor de 40 pasajes, alrededor de 20 a alrededor de 40 pasajes, alrededor de 25 a alrededor de 40 pasajes o alrededor de 30 a alrededor de 40 pasajes.

Las células de una línea celular establecida descritas en la presente memoria descriptiva pueden presentar una eficacia relativa consistente de absorción de endopeptidasa redirigida o actividad de endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pasajes celulares. Tal como se usa en la presente, el término "eficacia relativa" se refiere a cuán bien se compara la asíntota superior para la actividad de endopeptidasa redirigida detectada en el presente ensayo realizado con la asíntota superior para la actividad de endopeptidasa redirigida detectada en un estándar de referencia, una molécula de referencia o un número de pasajes de referencia usados en ese ensayo. Tal como se usa en la presente, el término "proporción de señal a ruido para la asíntota superior" se refiere a la señal detectada en un ensayo en el límite superior de detección dividida por la señal detectada por una señal de referencia o de fondo que no es de tratamiento. El límite superior de detección es la dosis más alta que un ensayo puede medir de forma consistente antes de que ocurra la saturación de la señal.

Por lo tanto, en una modalidad, las células de una línea celular establecida descrita en la presente memoria descriptiva pueden presentar una asíntota superior bien definida en una pluralidad de pasajes celulares y mantener una proporción de señal a ruido consistente y adecuada para el ensayo. En aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida descritas en la presente memoria descriptiva deben tener una proporción de señal a ruido bien definida para la asíntota superior para la actividad de endopeptidasa redirigida de, por ej., al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1, al menos 40:1, al menos 45:1, al menos 50:1, al menos 60:1, al menos 70:1, al menos 80:1, al menos 90:1 o al menos 100:1, al menos 150:1, al menos 200:1, al menos 250:1, al menos 300:1, al menos 350:1, al menos 400:1, al menos 450:1, al menos 500:1, al menos 550:1 o al menos 600:1, en, por ej., 5 o más pasajes celulares, 10 o más pasajes celulares, 15 o más pasajes celulares, 20 o más pasajes celulares, 25 o más pasajes celulares, 30 o más pasajes celulares, 35 o más pasajes celulares, 40 o más pasajes celulares, 45 o más pasajes celulares o 50 o más pasajes celulares. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida descritas en la presente memoria descriptiva deben tener una proporción de

señal a ruido para la asíntota superior para la actividad de endopeptidasa redirigida de, por ej., al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, al menos 35:1, al menos 40:1, al menos 45:1, al menos 50:1, al menos 60:1, al menos 70:1, al menos 80:1, al menos 90:1 o al menos 100:1, al menos 150:1, al menos 200:1, al menos 250:1, al menos 300:1, al menos 350:1, al menos 400:1, al menos 450:1, al menos 500:1, al menos 550:1 o al menos 600:1, en, por ej., alrededor de 15 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 20 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 25 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 30 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 35 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 40 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 45 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 50 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 15 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 20 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 25 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 30 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 35 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 40 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 15 a alrededor de 40 pasajes, alrededor de 20 a alrededor de 40 pasajes, alrededor de 25 a alrededor de 40 pasajes o alrededor de 30 a alrededor de 40 pasajes.

Las células de una línea celular establecida descrita en la presente memoria descriptiva pueden presentar una curva de respuesta a la dosis bien definida para la actividad de endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pasajes celulares. Tal como se usa en la presente, el término "curva de respuesta a la dosis" se refiere a cuán bien los datos sin procesar se ajustan al modelo estadístico de elección para ese ensayo. Como un ejemplo no taxativo, una curva sigmoidal con un ajuste logístico de parámetro cuatro es una curva de respuesta a la dosis para un ensayo de actividad enzimática tal como, por ej., un ensayo de potencia. Como otro ejemplo no taxativo, un ligando que se une con un ajuste de saturación de sitio es una curva de respuesta a la dosis para un ensayo de unión ligando/anticuerpo.

Por lo tanto, en una modalidad, las células de una línea celular establecida descritas en la presente memoria descriptiva presentan una curva de respuesta a la dosis bien definida para la actividad de endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pasajes celulares. En aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida descrita en la presente memoria descriptiva presentan una curva de respuesta a la dosis bien definida para la actividad de endopeptidasa redirigida en, por ej., 5 o más pasajes celulares, 10 o más pasajes celulares, 15 o más pasajes

celulares, 20 o más pasajes celulares, 25 o más pasajes celular, 30 o más pasajes celulares, 35 o más pasajes celulares, 40 o más pasajes celulares, 45 o más pasajes celulares o 50 o más pasajes celulares. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida descrita en la presente memoria descriptiva presentan una curva de respuesta a la dosis bien definida para la actividad de endopeptidasa redirigida en, por ej., alrededor de 15 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 20 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 25 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 30 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 35 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 40 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 45 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 50 a alrededor de 60 pasajes, alrededor de 15 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 20 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 25 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 30 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 35 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 40 a alrededor de 50 pasajes, alrededor de 15 a alrededor de 40 pasajes, alrededor de 20 a alrededor de 40 pasajes, alrededor de 25 a alrededor de 40 pasajes o alrededor de 30 a alrededor de 40 pasajes.

Las células de una línea celular establecida descrita en la presente memoria descriptiva pueden presentar un valor de EC_{50} relativa consistente para la actividad de endopeptidasa

redirigida en una pluralidad de pasajes celulares. Tal como se usa en la presente, el término "EC_{50} relativa" o "valor de EC_{50} relativa" se refiere a un valor de EC_{50} de actividad de endopeptidasa redirigida que se normaliza en comparación con la EC_{50} calculada para un estándar de referencia, una molécula de referencia o un número de pasajes de referencia usados en ese ensayo.

Por lo tanto, en una modalidad, las células de una línea celular clonal establecida presentan una EC_{50} relativa para la actividad de endopeptidasa redirigida en una pluralidad de pasajes celulares. En aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular clonal establecida presentan una EC_{50} relativa consistente para la actividad de endopeptidasa redirigida que es, por ej., alrededor de ± 10%, alrededor de ± 20%, alrededor de ± 30%, alrededor de ± 40%, alrededor de ± 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70% o alrededor de ± 75% de la EC_{50} relativa para la actividad de BoNT/A en, por ej., 5 o más pasajes celulares, 10 o más pasajes celulares, 15 o más pasajes celulares, 20 o más pasajes celulares, 25 o más pasajes celulares, 30 o más pasajes celulares, 35 o más pasajes celulares, 40 o más pasajes celulares, 45 o más pasajes celulares o 50 o más pasajes celulares. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular clonal establecida presentan una EC_{50} relativa para la

actividad de endopeptidasa redirigida que es, por ej., de alrededor de ± 10% a alrededor de 75%, de alrededor de ± 10% a alrededor de 70%, de alrededor de ± 10% a alrededor de 60%, de alrededor de ± 10% a alrededor de 50%, de alrededor de ± 10% a alrededor de 40%, de alrededor de ± 10% a alrededor de 30% o de alrededor de ± 10% a alrededor de 20% de la EC_{50} relativa para la actividad de endopeptidasa redirigida en, por ej., 5 o más pasajes celulares, 10 o más pasajes celulares, 15 o más pasajes celulares, 20 o más pasajes celulares, 25 o más pasajes celulares, 30 o más pasajes celulares, 35 o más pasajes celulares, 40 o más pasajes celulares, 45 o más pasajes celulares o 50 o más pasajes celulares.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, una endopeptidasa redirigida. Tal como se usa en la presente, el término "endopeptidasa redirigida" es sinónimo de "proteína moduladora de la exocitosis vesicular redirigida" o "TVEMP". Los ejemplos no taxativos de endopeptidasa redirigida se describen en, por ej., Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, patente estadounidense 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, patente estadounidense 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, patente estadounidense 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions*

For The Treatment Of Pancreatitis, patente estadounidense 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente estadounidense 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente estadounidense 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, publicación de patente internacional WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, solicitud de patente estadounidense No. 11/376,696; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente estadounidense No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, solicitud de patente estadounidense No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, publicación de patente internacional WO 2006/059093 y Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, publicación de patente internacional WO 2006/059105, cada una de las cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. Los ejemplos no taxativos de endopeptidasas redirigidas incluyen la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 y SEQ ID NO: 131.

Por lo tanto, en una modalidad, la actividad de endopeptidasa redirigida que se detecta es de una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta modalidad, la actividad de endopeptidasa redirigida que se detecta es de una endopeptidasa redirigida descrita en Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, patente estadounidense 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, patente estadounidense 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, patente estadounidense 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, patente estadounidense 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente estadounidense 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente estadounidense 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, publicación internacional de patente WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, solicitud de patente estadounidense No. 11/376,696; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de

patente estadounidense No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, solicitud de patente estadounidense No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, publicación de patente internacional WO 2006/059093 y Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, publicación de patente internacional WO 2006/059105, cada uno de los cuales se incorpora a modo de referencia en su totalidad. En aspectos de esta modalidad, una endopeptidasa redirigida es la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 o SEQ ID NO: 131.

En otra modalidad, la actividad de endopeptidasa redirigida que se detecta es de una endopeptidasa redirigida que tiene, por ej., al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con una endopeptidasa redirigida descrita en Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, patente estadounidense 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, patente estadounidense 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, patente estadounidense 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, patente estadounidense 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For*

Treating Pain, publicación de patente estadounidense 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente estadounidense 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, publicación de patente internacional WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, solicitud de patente estadounidense No. 11/376,696; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente estadounidense No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, solicitud de patente estadounidense No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, publicación de patente internacional WO 2006/059093 y Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, publicación de patente internacional WO 2006/059105, cada uno de los cuales se incorpora a modo de referencia en su totalidad. En otra modalidad, la actividad de la endopeptidasa redirigida que se detecta proviene de una endopeptidasa redirigida que tiene, por ej., al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con una endopeptidasa redirigida de

la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 o SEQ ID NO: 131.

En otros aspectos de esta modalidad, la actividad de endopeptidasa redirigida que se detecta es de una endopeptidasa redirigida que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con respecto a una endopeptidasa redirigida descrita en Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, patente estadounidense 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, patente estadounidense 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, patente estadounidense 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, patente estadounidense 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente estadounidense 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente estadounidense 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, publicación de

patente internacional WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, solicitud de patente estadounidense No. 11/376,696; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente estadounidense No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, solicitud de patente estadounidense No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, publicación de patente internacional WO 2006/059093 y Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, publicación de patente internacional WO 2006/059105, cada uno de los cuales se incorpora a modo de referencia en su totalidad. En otros aspectos de esta modalidad, la actividad de la endopeptidasa redirigida que se detecta proviene de una endopeptidasa redirigida que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con relación a una endopeptidasa redirigida de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 o SEQ ID NO: 131.

En aún otros aspectos de esta modalidad, la actividad de endopeptidasa redirigida que se detecta es de una variante de

endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos contiguos con respecto a una endopeptidasa redirigida descrita en Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, patente estadounidense 5,989,545; Clifford C. Shone et al., *Recombinant Toxin Fragments*, patente estadounidense 6,461,617; Conrad P. Quinn et al., *Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion*, patente estadounidense 6,632,440; Lance E. Steward et al., *Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis*, patente estadounidense 6,843,998; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, publicación de patente estadounidense 2002/0037833; Keith A. Foster et al., *Inhibition of Secretion from Non-neural Cells*, publicación de patente estadounidense 2003/0180289; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, WO 2001/014570; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, publicación de patente internacional WO 2005/023309; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, solicitud de patente estadounidense No. 11/376,696; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting*

Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, solicitud de patente estadounidense No. 11/776,075; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, solicitud de patente estadounidense No. 11/829,475; Foster, K.A. et al., *Fusion Proteins*, publicación de patente internacional WO 2006/059093; and Foster, K.A. et al., *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, publicación de patente internacional WO 2006/059105, cada uno de los cuales se incorpora a modo de referencia en su totalidad. En aun otros aspectos de esta modalidad, la actividad de la endopeptidasa redirigida que se detecta proviene de una variante de una endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos contiguos con relación a una endopeptidasa redirigida de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 130 o SEQ ID NO: 131.

En aun una modalidad, la actividad de endopeptidasa redirigida que se detecta es de una endopeptidasa redirigida desde opioide. Los ejemplos no taxativos de endopeptidasas redirigidas desde opioides o TVEMP opioides se describen en, por ej., Keith A. Foster et al., *Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions*, patente

estadounidense 5,989,545; J. Oliver Dolly et al., *Activatable Recombinant Neurotoxins*, patente estadounidense 7,132,259; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, patente estadounidense 7,244,437; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, patente estadounidense 7,413,742; Stephan Donovan, *Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain*, patente estadounidense 7,415,338; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, patente estadounidense 7,514,088; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, publicación de patente estadounidense 2008/0064092; Keith A. Foster, *Fusion Proteins*, publicación de patente estadounidense 2009/0035822; Lance E. Steward et al., *Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use*, publicación de patente estadounidense 2009/0048431; Keith A. Foster, *Non-Cytotoxic Protein Conjugates*, publicación de patente estadounidense 2009/0162341; Keith A. Foster et al., *Re-targeted Toxin Conjugates*, publicación de patente internacional WO 2005/023309 y Lance E. Steward, *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells*, solicitud de patente internacional WO 2008/008805; cada una de las cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

En aun otra modalidad, la actividad de endopeptidasa redirigida que se detecta es de una endopeptidasa redirigida desde galanina. Los ejemplos no taxativos de endopeptidasa redirigida desde galanina, o TVEMP de galanina, se describen en, por ej., Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capability and Enhanced Targeting Activity, solicitud de patente estadounidense No. 11/776,043 (11 de julio, 2007); Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells, solicitud de patente estadounidense No. 11/776,052 (11 de julio de 2007) y Steward, L.E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells, solicitud de patente estadounidense No. 11/776,075 (11 de julio de 2007), cada uno de los cuales se incorpora a modo de referencia en su totalidad.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, una SNAP-25. Tal como se usa en la presente, el término "SNAP-25" se refiere a una SNAP-25 de origen natural o SNAP-25 de origen no natural que se escinde preferencialmente mediante una endopeptidasa redirigida. Tal como se usa en la presente, el término "preferencialmente escindido" se refiere a que la proporción de escisión de una SNAP-25 mediante una

endopeptidasa redirigida es al menos un orden de magnitud mayor a la proporción de escisión de cualquier otro sustrato mediante una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta modalidad, la proporción de escisión de SNAP-25 mediante una endopeptidasa redirigida es al menos dos órdenes de magnitud mayor, al menos tres órdenes de magnitud mayor, al menos cuatro órdenes de magnitud mayor o al menos cinco órdenes de magnitud mayor que la proporción de escisión de cualquier otro sustrato mediante endopeptidasa redirigida.

Como se utiliza en la presente, el término "SNAP-25 de origen natural" se refiere a cualquier SNAP-25 producida mediante un proceso de origen natural, incluyendo, a modo no taxativo, isoformas de la SNAP-25 producidas a partir de una modificación postraduccional, una transcripción alternativamente empalmada o una mutación espontánea y subtipos de la SNAP-25. Una SNAP-25 de origen natural incluye, a modo no taxativo, la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24 o una que sustituya, elimine o agregue, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o

más o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 ó SEQ ID NO: 24.

Como se utiliza en la presente, el término "SNAP-25 de origen no natural" se refiere a cualquier SNAP-25 cuya estructura se modificó con la ayuda de la manipulación humana, incluyendo, a modo no taxativo, una SNAP-25 producida mediante modificación genética usando mutagénesis aleatoria o diseño racional y una SNAP-25 producida mediante síntesis química in vitro. Los ejemplos no taxativos de SNAP-25 de origen no natural se describen, por ej., en Steward, L.E. et al., *FRET Protease Assays for Clostridial Toxins*, patente estadounidense 7,332,567; Fernandez-Salas et al., *Lipohilic Dye-based FRET Assays for Clostridial Toxin Activity*, publicación de patente estadounidense 2008/0160561, cada uno de los cuales se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia. Una SNAP-25 de origen no natural puede sustituir, eliminar o agregar, por ej., 1 ó más, 2 ó más, 3 ó más, 4 ó más, 5 ó más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9,

SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

Por conseguiente, en una modalidad, una SNAP-25 es una SNAP-25 de origen natural. En aspectos de la presente modalidad, la SNAP-25 es una isoforma de la SNAP-25 o un subtipo de la SNAP-25. En aspectos de la presente modalidad, la SNAP-25 de origen natural es la SNAP-25 de origen natural de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 ó SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de la presente modalidad, la SNAP-25 es una SNAP-25 de origen natural que tiene, por ej., al menos 70% de identidad de aminoácidos, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 ó SEQ ID NO: 24.

En otra modalidad, una SNAP-25 es una SNAP-25 de origen no natural. En otros aspectos de la presente modalidad, la SNAP-25 es una SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ej., al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos de la presente modalidad, la SNAP-25 es una SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con relación a la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. En aun otros aspectos de la presente modalidad, la SNAP-25 es una SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos contiguos con relación a la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:

16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

Una SNAP-25 puede ser una SNAP-25 endógena o una SNAP-25 exógena. Como se utiliza en la presente, el término "SNAP-25 endógena" se refiere a una SNAP-25 que se encuentra naturalmente presente en la célula debido a que se codifica naturalmente en el genoma de la célula, de forma que la célula expresa inherentemente la SNAP-25 sin necesidad de una fuente externa de la SNAP-25 o una fuente externa de material genético que codifique una SNAP-25. La expresión de una SNAP-25 endógena puede producirse con o sin estimulación ambiental como, por ej., diferenciación celular. Por definición, una SNAP-25 endógena solo puede ser una SNAP-25 de origen natural o variantes de la misma. Por ejemplo, las siguientes líneas celulares establecidas expresan una SNAP-25 endógena: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa, SK-N-DZ y SK-N-BE(2)-C.

Como se utiliza en la presente, el término "SNAP-25 exógena" se refiere a una SNAP-25 expresada en una célula a través de la introducción de una fuente externa de la SNAP-25 o una fuente externa de material genético que codifica una

SNAP-25 mediante manipulación humana. La expresión de una SNAP-25 exógena se puede producir con o sin estimulación ambiental como, por ej., diferenciación celular. Como un ejemplo no taxativo, las células de una línea celular establecida pueden expresar una SNAP-25 exógena mediante transfección transitoria o estable de una SNAP-25. Como otro ejemplo no taxativo, las células de una línea celular establecida pueden expresar una SNAP-25 exógena mediante la transfección de proteínas de una SNAP-25. Una SNAP-25 exógena puede ser una SNAP-25 de origen natural o variantes de la misma o una SNAP-25 de origen no natural o variantes de la misma.

Por consiguiente, en una modalidad, las células de una línea celular establecida expresan una SNAP-25 endógena. En aspectos de la presente modalidad, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es una SNAP-25 de origen natural. En otros aspectos de la presente modalidad, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. En aun otros aspectos de la presente

modalidad, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es una SNAP-25 de origen natural, como, por ej., una isoforma de la SNAP-25 o un subtipo de la SNAP-25. En otros aspectos de la presente modalidad, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es una SNAP-25 de origen natural que tiene, por ej., al menos 70% de identidad de aminoácidos, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

En otra modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar una SNAP-25 exógena. En un aspecto de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar una SNAP-25 de origen natural. En otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar la SNAP-25 de origen natural de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ

ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. En aun otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar una SNAP-25 de origen natural, como, por ej., una isoforma de la SNAP-25 o un subtipo de la SNAP-25. En aun otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar una SNAP-25 de origen natural que tiene, por ej., al menos 70% de identidad de aminoácidos, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

En otro aspecto de la modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar una SNAP-25 de origen no natural. En otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o

estable para expresar una SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ej., al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar una SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con relación a la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. En aún otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar una SNAP-25 de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20

o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos contiguos con relación a la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

Se pueden usar los ensayos que detectan la escisión de una SNAP-25 luego de la exposición a una endopeptidasa redirigida para evaluar si una célula expresa una SNAP-25 endógena o exógena. En estos ensayos, se detectaría la generación de un producto de la escisión de la SNAP-25 en células que expresan una SNAP-25 luego del tratamiento con una endopeptidasa redirigida. Los ejemplos no taxativos de un análisis de transferencia Western específico, así como reactivos, condiciones y protocolos bien caracterizados se encuentran fácilmente disponibles en vendedores comerciales que incluyen, a modo no taxativo, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI y Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Se comprende que estos ensayos y ensayos similares para la escisión de la SNAP-

25 pueden ser útiles para identificar células que expresen una SNAP-25 endógena o exógena.

Como ejemplos no taxativos, se puede usar el análisis de transferencia Western utilizando un anticuerpo que reconoce un producto de la escisión de la SNAP-25 o las formas escindida y no escindida de la SNAP-25 para analizar la absorción de endopeptidasa redirigida. Los ejemplos de anticuerpos α-SNAP-25 útiles para estos ensayos incluyen, a modo no taxativo, anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 de ratón CI 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 CI 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 SP12 (Abcam, Cambridge, MA), antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 (Abcam, Cambridge, MA) y antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 S9684 (Sigma, San Luis, MO).

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, un receptor de endopeptidasa redirigida. Como se utiliza en la presente, el término "receptor de endopeptidasa redirigida" se refiere a un receptor de endopeptidasa redirigidade origen natural o un receptor de endopeptidasa

redirigida de origen no natural que interactúa preferentemente con una endopeptidasa redirigida de forma tal que provoca una respuesta a la actividad de la endopeptidasa redirigida. Como se utiliza en la presente, el término "interactúa preferentemente" se refiere a que la constante de disociación de equilibrio (KD) de la endopeptidasa redirigida con respecto a cualquier otro receptor en la superficie celular. La constante de disociación de equilibrio, es un tipo específico de constante de equilibrio que mide la propensión de un complejo de endopeptidasa redirigida-receptor de endopeptidasa redirigida desde separarse (disociarse) de forma invertible en las moléculas que lo componen, a saber, la endopeptidasa redirigida y el receptor de endopeptidasa redirigida, se define como KD=Ka/Kd en equilibrio. La constante de asociación (Ka) se define como Ka=[C]/[L][R] y la constante de disociación (Kd) se define como Kd=[L][R]/[C], donde [L] es igual a la concentración molar de la endopeptidasa redirigida, [R] es la concentración molar de un receptor de endopeptidasa redirigida y [C] es la concentración molar del complejo endopeptidasa-receptor y donde todas las concentraciones se refieren a tales componentes cuando el sistema se encuentra en equilibrio. Cuanto menor es la constante de disociación, más estrecha es la unión de la

endopeptidasa redirigida con su receptor o mayor es la afinidad de unión entre la endopeptidasa redirigida y el receptor de endopeptidasa redirigida. En aspectos de la presente modalidad, la constante de disociación de la endopeptidasa redirigida con respecto a su receptor es al menos dos órdenes de magnitud menor, al menos tres órdenes de magnitud menor, al menos cuatro órdenes de magnitud menor o al menos cinco órdenes de magnitud menor que la de la endopeptidasa redirigida con respecto a cualquier otro receptor. En otros aspectos de la presente modalidad, la afinidad de unión de una endopeptidasa redirigida que interactúa preferentemente con su receptor puede tener una constante de disociación de equilibrio (KD), por ej., de 500 nM o menor, 400 nM o menor, 300 nM o menor, 200 o menor o 100 nM o menor. En otros aspectos de la presente modalidad, la afinidad de unión de una endopeptidasa redirigida que interactúa preferentemente con su receptor puede tener una constante de disociación de equilibrio (KD), por ej., de 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos o 10 nM o menos. Como se utiliza en la presente, el término "provoca una respuesta a la actividad de endopeptidasa redirigida" se refiere a la capacidad de un receptor de endopeptidasa redirigida de interactuar con una endopeptidasa redirigida para formar un complejo de endopeptidasa/receptor y la

posterior internalización de ese complejo en el citoplasma celular.

Como se utiliza en la presente, el término "receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural" se refiere a cualquier receptor de endopeptidasa redirigida producido mediante un proceso de origen natural, incluyendo, a modo no taxativo, isoformas del receptor de endopeptidasa redirigida producidas a partir de una modificación postraduccional, una transcripción alternativamente empalmada o una mutación espontánea y subtipos del receptor de endopeptidasa redirigida. Un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural incluye, a modo no taxativo, receptores opioides de origen natural como un receptor tipo opioide 1 (ORL1), un receptor opioide δ (DOR), un receptor opioide κ (KOR) y un receptor opioide μ (MOR) tales como los descritos en Christopher Evans et al., *Opioid Receptor Genes*, patente estadounidense 6,265,563; Christopher Evans et al., *Methods of Screening Modulators of Opiod Receptor Activity*, patente estadounidense 6,432,652; Christopher Evans et al., *Opioid Receptors and Methods of Use*, patente estadounidense 7,282,563 y Christopher Evans et al., *Delta Opioid Receptor Proteins*, publicación de patente estadounidense 2008/0219925, cada uno de los cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. Otros ejemplos de un receptor de

endopeptidasa redirigida de origen natural incluyen, a modo no taxativo, el receptor de galanina 1, el receptor de galanina 2 y el receptor de galanina 3. Los receptores opioides de origen natural de otras especies vertebradas se conocen en la técnica, tal como, por ej., primates, vacas, perros, ratones, ratas, gallinas y pescado, y se pueden usar en aspectos de la presente memoria descriptiva.

Un ORL1 de origen natural incluye, a modo no taxativo, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 o una que sustituya, elimine o agregue, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 26. Un DOR de origen natural incluye, a modo no taxativo, la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28 o una que sustituya, elimine o agregue, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28. Un KOR de origen natural incluye, a modo no taxativo, la SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 o una que sustituya, elimine o agregue, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 30. Un MOR de origen natural incluye, a modo no taxativo, la

SEQ ID NO: 31 o una que sustituya, elimine o agregue, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 31.

Un receptor de galanina 1 de origen natural incluye, a modo no taxativo, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 y SEQ ID NO: 138, o una que sustituya, elimine o agregue, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 138. Un receptor de galanina 2 de origen natural incluye, a modo no taxativo, SEQ ID NO: 139, o una que sustituya, elimine o agregue, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 139. Un receptor de galanina 3 de origen natural incluye, a modo no taxativo, SEQ ID NO: 140, o una que sustituya, elimine o agregue, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 140.

Como se utiliza en la presente, el término "variante del receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural" se

refiere a cualquier receptor de endopeptidasa redirigida producido con la ayuda del diseño o la manipulación humana, incluyendo, a modo no taxativo, un receptor de endopeptidasa redirigida producido mediante modificación genética usando mutagénesis aleatoria o diseño racional y un receptor de endopeptidasa redirigida producido mediante síntesis química. Los ejemplos no taxativos de variantes de receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural incluyen, por ej., variantes conservadoras del receptor de endopeptidasa redirigida, variantes no conservadoras del receptor de endopeptidasa redirigida, variantes quiméricas del receptor de endopeptidasa redirigida y fragmentos activos del receptor de endopeptidasa redirigida.

Como se utiliza en la presente, el término "receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural" se refiere a cualquier receptor de endopeptidasa redirigida cuya estructura ha sido modificada con la ayuda de la manipulación humana, incluyendo, a modo no taxativo, un receptor de endopeptidasa redirigida producido mediante modificación genética usando mutagénesis aleatoria o diseño racional y un receptor de endopeptidasa redirigida producido mediante síntesis química in vitro. Un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural puede sustituir, eliminar o agregar, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más,

9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140.

Por consiguiente, en una modalidad, un receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural como, por ej., ORL1, DOR, KOR o MOR. En aspectos de la presente modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida es una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo del receptor de endopeptidasa redirigida. En aspectos de la presente modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural es el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural de la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31. En otros aspectos de la presente modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ej., al menos 70% de identidad de aminoácidos, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31.

En otra modalidad, un receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural, como, por ej., un ORL1 modificado genéticamente, un DOR modificado genéticamente, un KOR modificado genéticamente o un MOR modificado genéticamente. En otros aspectos de la presente modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ej., al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31. En otros aspectos de la presente modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con relación a la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31. En aun otros aspectos de la presente modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100

o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos contiguos con relación a la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 ó SEQ ID NO: 31.

En otra modalidad, un receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural tal como, por ej., receptor de galanina 1, receptor de galanina 2 o receptor de galanina 3. En aspectos de la presente modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida es una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo del receptor de endopeptidasa redirigida. En aspectos de la presente modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural es el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural de la SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de la presente modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ej., al menos 70% de identidad de aminoácidos, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140.

En otra modalidad, un receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural tal como, por ej., receptor de galanina 1 modificado genéticamente, receptor de galanina 2 modificado genéticamente o receptor de galanina 3 modificado genéticamente. En otros aspectos de la presente modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ej., al menos 70% de identidad de aminoácidos, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140. En aun otros aspectos de esta modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de una endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con relación a la SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140. En aun otros aspectos de esta modalidad, el receptor de endopeptidasa redirigida es un receptor de una endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más

sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos contiguos con relación a la SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140.

Un receptor de endopeptidasa redirigida puede ser un receptor endógeno de endopeptidasa redirigidao un receptor exógeno de endopeptidasa redirigida. Como se utiliza en la presente, el término "receptor endógeno de endopeptidasa redirigida" se refiere a un receptor de endopeptidasa redirigida que se encuentra naturalmente presente en la célula debido a que está naturalmente codificado en el genoma celular, de forma que la célula exprese inherentemente el receptor de endopeptidasa redirigida sin necesidad de una fuente externa de receptor de endopeptidasa redirigida o una fuente externa de material genético que codifique un receptor de endopeptidasa redirigida. La expresión de un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida puede producirse con o sin estimulación ambiental, como, por ej., diferenciación celular o activación de promotores. Por ejemplo, las siguientes líneas celulares establecidas expresan al menos un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida: AGN P33, Neuro-2a, SiMa y SK-N-DZ. Un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida puede ser solamente un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural o variantes de origen natural del mismo.

Como se utiliza en la presente, el término "receptor exógeno de endopeptidasa redirigida" se refiere a un receptor de endopeptidasa redirigida expresado en una célula a través de la introducción de una fuente externa de receptor de endopeptidasa redirigida o una fuente externa de material genético que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida mediante manipulación humana. La expresión de un receptor exógeno de endopeptidasa redirigida puede producirse con o sin estimulación ambiental como, por ej., diferenciación celular o activación de promotores. Como ejemplo no taxativo, las células de una línea celular establecida pueden expresar uno o más receptores exógenos de endopeptidasa redirigida mediante la transfección transitoria o estable de una molécula de polinucleótidos que codifique un receptor de endopeptidasa redirigida como, por ej., un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de galanina 1, un receptor de galanina 2 o un receptor de galanina 3. Como otro ejemplo no taxativo, las células de una línea celular establecida pueden expresar uno o más receptores exógenos de endopeptidasa redirigida mediante la transfección proteica de receptores de endopeptidasa redirigida como, por ej., un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de galanina 1, un receptor de galanina 2 o un receptor de galanina 3. Un receptor exógeno de endopeptidasa redirigida puede ser un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural o variantes de origen natural del mismo o un

receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural o variantes de origen no natural del mismo.

Por consiguiente, en una modalidad, las células de una línea celular establecida expresan un receptor endógeno de endopeptidasa redirigida. En aspectos de la presente modalidad, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por células de una línea celular establecida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural. En otros aspectos de la presente modalidad, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por células de una línea celular establecida es la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140. En aun otros aspectos de la presente modalidad, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por células de una línea celular establecida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural como, por ej., una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo del receptor de endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de la presente modalidad, el receptor endógeno de endopeptidasa redirigida expresado por células de una línea celular establecida es un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ej., al menos 70% de identidad de aminoácidos, al menos 75%, al menos 80%, al menos

85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140.

En otra modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un receptor exógeno de endopeptidasa redirigida. En un aspecto de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural. En otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar el receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural de la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140. En aun otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural como, por ej., una isoforma del receptor de endopeptidasa redirigida o un subtipo del receptor de endopeptidasa redirigida. En aun otros aspectos de la presente

modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen natural que tiene, por ej., al menos 70% de identidad de aminoácidos, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 13 ó SEQ ID NO: 140.

En otro aspecto de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural. En otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ej., al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 140. En otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para

expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguos con relación a la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 140. En aún otras aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un receptor de endopeptidasa redirigida de origen no natural que tiene, por ej., 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos contiguos con relación a la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 140.

En otra modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un ORL1 exógeno, un DOR exógeno, un KOR exógeno, un MOR exógeno o cualquier combinación de los mismos. En aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular

establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un ORL1 de origen natural, un DOR de origen natural, un KOR de origen natural, un MOR de origen natural o cualquier combinación de los mismos. En aun otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un ORL1 de origen no natural, un DOR de origen no natural, un KOR de origen no natural, un MOR de origen no natural o cualquier combinación de los mismos. En aun otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un ORL1 de origen natural o un ORL1 de origen no natural, un DOR de origen natural o un DOR de origen no natural, un KOR de origen natural o un KOR de origen no natural, un MOR de origen natural o un MOR de origen no natural o cualquier combinación de los mismos.

En aun otra modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 exógeno, un receptor de galanina 2 exógeno, un receptor de galanina 3 exógeno o cualquier combinación de los mismos. En aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 de origen natural, un

receptor de galanina 2 de origen natural, un receptor de galanina 3 de origen natural o cualquier combinación de los mismos. En aun otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 de origen no natural, un receptor de galanina 2 de origen no natural, un receptor de galanina 3 de origen no natural o cualquier combinación de los mismos. En aun otros aspectos de la presente modalidad, las células de una línea celular establecida se modifican de forma transitoria o estable para expresar un receptor de galanina 1 de origen natural o un receptor de galanina 1 de origen no natural, un receptor de galanina 2 de origen natural o un receptor de galanina 2 de origen no natural, un receptor de galanina 3 de origen natural o un receptor de galanina 3 de origen no natural o cualquier combinación de los mismos.

Las células que expresan uno o más receptores endógenos o exógenos de endopeptidasa redirigida se pueden identificar a través de métodos de rutina que incluyen ensayos directos e indirectos para analizar la absorción de endopeptidasa redirigida. Los ensayos que determinan las propiedades de absorción o unión de la endopeptidasa redirigida se pueden usar para evaluar si una célula expresa un receptor de endopeptidasa redirigida. Tales ensayos incluyen, a modo no

taxativo, ensayos de reticulación usando endopeptidasa redirigida etiquetada, como, por ej., [125I] endopeptidasa redirigida, véase, por ej., Noriko Yokosawa et al., *Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines*, 57(1) Infect. Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa et al., *Binding of Botulinum type Cl, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes*, 29(2) Toxicon 261-264 (1991) y Tei-ichi Nishiki et al., *Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes*, 269(14) J. Biol. Chem. 10498-10503 (1994). Otros ensayos no taxativos incluyen ensayos inmunohistoquímicos que detectan la unión a la endopeptidasa redirigida usando anticuerpos etiquetados o no etiquetados, véase, por ej., Atsushi Nishikawa et al., *The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells*, 319(2) Biochem. Biophys. Res. Commun. 327-333 (2004) y ensayos de inmunoprecipitación, véase, por ej., Yukako Fujinaga et al., *Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes*, 150(Pt 5) Microbiology 1529-1538 (2004), que detectan la endopeptidasa redirigida unida usando anticuerpos etiquetados o no etiquetados. Los anticuerpos útiles para estos ensayos incluyen, a modo no taxativo, anticuerpos seleccionados en comparación con la

endopeptidasa redirigida y/o anticuerpos seleccionados en comparación con un receptor de endopeptidasa redirigida como, por ej., ORL1, DOR, KOR, MOR, receptor de galanina 1, receptor de galanina 2 o receptor de galanina 3. Si el anticuerpo está etiquetado, la unión de la molécula se puede detectar mediante diversos medios, incluyendo análisis de transferencia Western, observación microscópica directa de la ubicación celular del anticuerpo, medición del anticuerpo unido a células o sustratos luego de una etapa de lavado, citometría de flujo, electroforesis o electroforesis capilar, utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Si el anticuerpo no está etiquetado, se puede emplear un anticuerpo secundario etiquetado para la detección indirecta de la molécula unida y la detección puede realizarse de la misma forma que para un anticuerpo etiquetado. Se comprende que estos ensayos y ensayos similares que determinan las características o propiedades de absorción de la endopeptidasa redirigida pueden ser útiles para identificar células que expresen receptores endógenos o exógenos de endopeptidasa redirigida.

También se pueden usar los ensayos que controlan la liberación de una molécula luego de la exposición a una endopeptidasa redirigida para evaluar si una célula expresa uno o más receptores endógenos o exógenos de endopeptidasa

redirigida. En estos ensayos, la inhibición de la liberación de molécula tendría lugar en células que expresan un receptor de endopeptidasa redirigida, luego del tratamiento con endopeptidasa redirigida. Los ensayos bien conocidos incluyen métodos que miden la inhibición de liberación de catecolamina radioactiva desde las neuronas como, por ej., liberación de [3H] noradrenalina o [3H] dopamina, véase, por ej., A Fassio et al., *Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F*, 90(3) Neuroscience 893-902 (1999) y Sara Stigliani et al., *The sensitivity of catecholamine release to botulinum toxin C1 and E suggests selective targeting of vesicles set into the readily releasable pool*, 85(2) J. Neurochem. 409-421 (2003) o mide la liberación de catecolamina usando un procedimiento fluorométrico, véase, por ej., Antón de Paiva et al., *A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly*, 268(28) J. Biol. Chem. 20838-20844 (1993); Gary W. Lawrence et al., *Distinct exocytotic responses of intact and permeabilised chromaffin cells after cleavage of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) or synaptobrevin by botulinum toxin A or B*, 236(3) Eur. J. Biochem. 877-886 (1996) y Patrick Foran et al., *Botulinum*

neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release, 35(8) Biochemistry 2630-2636 (1996). Otros ejemplos no taxativos incluyen ensayos que miden la inhibición de liberación de hormonas desde células endócrinas, como, por ej., células pituitarias anterior o células de ovario. Se comprende que estos ensayos y ensayos similares para la liberación de moléculas pueden ser útiles para identificar células que expresan receptores endógenos o exógenos o de endopeptidasa redirigida.

También se pueden usar los ensayos que detectan la escisión de un sustrato de SNAP-25 luego de la exposición a una endopeptidasa redirigida para evaluar si una célula expresa uno o más receptores endógenos o exógenos de endopeptidasa redirigida. En estos ensayos, se detectaría la generación de un producto de la escisión de la SNAP-25 o la desaparición de la SNAP-25 intacta en células que expresan un receptor de endopeptidasa redirigida luego de un tratamiento con endopeptidasa redirigida. Los ejemplos no taxativos de un análisis de transferencia Western específico, así como reactivos, condiciones y protocolos bien caracterizados se encuentra fácilmente disponible en vendedores comerciales que incluyen, a modo no taxativo, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce

Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI y Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Se comprende que éšťôš éñšâÿôš ÿ éñšâÿôš šïmïlâŕëš qüé dëťëŕmïñân lâ éšcïšïóñ de SNAP-25 pueden ser útiles para identificar células que expresen receptores endógenos o exógenos de endopeptidasa ŕëdïŕïġïdà.

Como ejemplo no taxativo, se puede usar el análisis de transferencia Western utilizando un anticuerpo que reconoce el pŕòdùctò éšcïńdïdò dé lá SNAP-25 y láś fòŕmàś éšcïńdïdá y ńò escindida de la SNAP-25 para analizar la absorción de una endopeptidasa redirigida. Los ejemplos de anticuerpos α-SNAP-25 útïlëš pâŕà éšťôš éñšâÿôš ïñclüÿëñ, à mòdò ñò ťâẍâťïvò, él anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 dé ŕátóń CI 71.1 (Syńáptïc Syśtémś, Gòéttińġén, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 CI 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 SP12 (Abcàm, Càmbŕidġè, MA), antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 S9684 (Siġmà, Sáń Luiś, MO) y áńtiśuéŕò pólïclóńàl dè conejo α-SNAP-25 (Abcam, Cambridge, MA).

Aspectos de la presente descripción proporcionan células que se realizan a través de manipulación genética o modificación recombinante para expresar una SNAP-25 exógena y/o uno o más receptores exógenos de endopeptidasa redirigida. Las células útiles para expresar una SNAP-25 exógena y/o uno o más receptores exógenos de endopeptidasa redirigida desde través de manipulación genética o modificación recombinante incluyen células neuronales y células no neuronales que pueden o no expresar una SNAP-25 endógena y/o uno o más receptores endógenos de endopeptidasa redirigida. Se comprende adicionalmente que tales células manipuladas genéticamente o modificadas de forma recombinante pueden expresar una SNAP-25 exógena y uno o más receptores exógenos de endopeptidasa redirigida bajo el control de un elemento promotor o elemento potenciador constitutivo, específico para el tejido, específico para la célula o inducible o ambos. Se comprende que toda célula es útil, siempre que la célula se pueda manipular genéticamente o modificar de forma recombinante para expresar una SNAP-25 exógena y/o uno o más receptores exógenos de endopeptidasa redirigida y pueda experimentar la actividad de la endopeptidasa redirigida.

Los métodos útiles para introducir en una célula una molécula exógena de polinucleótido que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo

celular global mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde de forma proteolítica un sustrato de la SNAP-25, como, por ej., una SNAP-25, un ORL1, un DOR, un KOR o un MOR incluyen, a modo no taxativo, métodos de suministro mediados químicamente, como, por ej., mediados por fosfato de calcio, mediados por dietil-aminoetilo (DEAE) dextrano, mediados por lípidos, mediados por polietilenimina (PEI), mediados por polilisina y mediados por polibreno; métodos de suministro mediados físicamente, como, por ej., suministro biolístico de partículas, microinyección, electroporación y fusión de protoplastos y métodos de suministro mediados por virus, como, por ej., transfección mediada por retrovirus, véase, por ej., *Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells*, pp. 16.1-16.62 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Tomo 3, 3° ed. 2001); Alessia Colosimo et al., *Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells*, 29(2) Biotechniques 314-318, 320-322, 324 (2000); Philip Washbourne & A. Kimberley McAllister, *Techniques for Gene Transfer into Neurons*, 12(5) Curr. Opin. Neurobiol. 566-573 (2002) y Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, pp 9.16.4-9.16.11 (2000), cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad a modo de referencia. Un experto en la técnica comprende que la selección de un método específico para introducir una molécula de polinucleótido en una célula dependerá, en parte, de si la célula contendrá de

forma transitoria o estable un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde de forma proteolítica un sustrato de la SNAP-25. Ejemplos no taxativos de moléculas de polinucleótidos que codifican un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde de forma proteolítica un sustrato de la SNAP-25 como sobre a continuación: una molécula de polinucleótido del ORL1 de la SEQ ID NO: 61 o o SEQ ID NO: 62; una molécula de polinucleótido del DOR de la SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64; una molécula de polinucleótido del KOR de la SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66, una molécula de polinucleótido del MOR de la SEQ ID NO: 67; una molécula de polinucleótido del receptor de galanina 1 de la SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 143; una molécula de polinucleótido del receptor de galanina 2 de la SEQ ID NO: 144 o una molécula de polinucleótido del receptor de galanina 3 de la SEQ ID NO: 145 y una molécula de polinucleótido de la SNAP-25 de la SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69.

Los métodos de suministro mediados químicamente son bien conocidos por un experto en la técnica y se describen, por ej., en Martin Jordan & Florian Worm, *Transfection of Adherent and Suspended Cells by Calcium Phosphate*, 33(2) Métodos 136-

143 (2004); Chun Zhang et al., *Polyethylenimine Strategies for Plasmid Delivery to Brain-Derived Cells*, 33(2) Métodos 144-150 (2004), cada una de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia. Tales métodos de suministro mediados químicamente se pueden preparar mediante procedimientos estándar y se encuentran comercialmente disponibles, véase, por ej., kit de transfección CellPhect (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); kit de transfección en mamíferos, fosfato de calcio y DEAE Dextrano, (Stratagene, Inc., La Jolla, CA); reactivo de transfección Lipofectamine™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); kit de transfección ExGen 500 (Fermentas, Inc., Hanover, MD) y los kits de transfección SuperFect y Effectene (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

Los métodos de suministro mediados físicamente son bien conocidos por un experto en la técnica y se describen, por ej., en Jeike E. Biewenga et al., *Plasmid-Mediated Gene Transfer in Neurons using the Biolistics Technique*, 71(1) J. Neurosci. Métodos 67-75 (1997); John O'Brien & Sarah C. R. Lummis, *Biolistic and Diolistic Transfection: Using the Gene Gun to Deliver DNA and Lipophilic Dyes into Mammalian Cells*, 33(2) Métodos 121-125 (2004); M. Golzio et al., *In Vitro and In Vivo Electric Field-Mediated Permeabilization, Gene Transfer, and Expression*, 33(2) Métodos 126-135 (2004) y Oliver Greschet al., *New Non-Viral Method for Gene Transfer*

into Primary Cells, 33(2) Métodos 151-163 (2004), cada uno de los cuales se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia.

Los métodos de suministro mediados por virus son bien conocidos por un experto en la técnica y se describen, por ej., en Chooi M. Lai et al., *Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors*, 21(12) DNA Cell Biol. 895-913 (2002); Ilya Frolov et al., *Alphavirus-Based Expression Vectors: Strategies and Applications*, 93(21) Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 11371-11377 (1996); Roland Wolkowicz et al., *Lentiviral Vectors for the Delivery of DNA into Mammalian Cells*, 246 Methods Mol. Biol. 391-411 (2004); A. Hüser & C. Hofmann, *Baculovirus Vectors: Novel Mammalian Cell Gene-Delivery Vehicles and Their Applications*, 3(1) Am. J. Pharmacogenomics 53-63 (2003); Tiziana Tonini et al., *Transient Production of Retroviral- and Lentiviral-Based Vectors for the Transduction of Mammalian Cells*, 285 Methods Mol. Biol. 141-148 (2004); Manfred Gossen & Hermann Bujard, *Tight Control of Gene Expression in Eukaryotic Cells by Tetracycline-Responsive Promoters*, patente estadounidense No. 5,464,758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, *Methods for Regulating Gene Expression*, patente estadounidense No. 5,814,618; David S. Hogness, *Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same*, patente estadounidense No. 5,514,578;

David S. Hogness, *Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor*, patente estadounidense 6,245,531; Elisabetta Vegeto et al., *Progesterone Receptor Having C. Terminal Hormone Binding Domain Truncations*, patente estadounidense No. 5,364,791; Elisabetta Vegeto et al., *Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy*, patente estadounidense No. 5,874,534, cada una de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia. Tales métodos de suministro mediados por virus se pueden preparar mediante procedimientos estándar y se encuentran comercialmente disponibles, véase, por ej., el sistema de expresión adenoviral VIRAPOWER™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y el manual de instrucción del sistema de expresión adenoviral VIRAPOWER™ 25-0543 versión A, Invitrogen, Inc., (15 de julio, 2002); el sistema de vector adenoviral ADEASY™ (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) y el manual de instrucción del sistema de vector adenoviral ADEASY™ 064004f, Stratagene, Inc. Adicionalmente, tales sistemas de suministro virales se pueden preparar a través de métodos estándar y se encuentran comercialmente disponibles, véase, por ej., el sistema de expresión genética BD™ Tet-Off y Tet-On (BD Biosciences-Clonetech, Palo Alto, CA) y el manual del usuario del sistema de expresión genética BD™ Tet-Off y Tet-On, PT3001-1, BD Biosciences Clontech, (14 de marzo, 2003), Sistema GeneSwitch™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); el

sistema GENESWITCH™, un sistema de expresión regulado por mifepristona para células de mamíferos, versión D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (4 de noviembre, 2002); el sistema de expresión lentiviral VIRAPOWER™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y el manual de instrucción del sistema de expresión lentivirual VIRAPOWER™ 25-0501 versión E, Invitrogen, Inc., (8 de diciembre, 2003); el sistema de expresión inducible retroviral en mamíferos COMPLETE CONTROL® (Stratagene, La Jolla, CA) y el manual de instrucción del sistema de expresión inducible retroviral en mamíferos COMPLETE CONTROL®, 064005e.

Por lo tanto, en una modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma transitoria, una molécula de polinucleótido que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25. En otra modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma transitoria, una molécula de polinucleótido que codifica una pluralidad de componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo celular global por el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de SNAP-25. En aspectos

de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma transitoria, una molécula de polinucleótido que codifica ORL1, DOR, KOR, MOR o SNAP-25. En aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma transitoria, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 62 que codifica ORL1. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma transitoria, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64 que codifica DOR. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma transitoria, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66 que codifica KOR. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma transitoria, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 67 que codifica MOR.

En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma transitoria, la

molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 143 que codifica el receptor de Galanina 1. En aun otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma transitoria, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 144 que codifica el receptor de Galanina 2. En aun otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma transitoria, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 145 que codifica el receptor de Galanina 3. En aspectos adicionales de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma transitoria, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69 que codifica SNAP-25.

En otra modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma estable, una molécula de polinucleótido que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global por el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de la SNAP-25. En otra modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la

endopeptidasa redirigida contienen, de forma estable, una molécula de polinucleótido que codifica una pluralidad de componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo celular global por el cual una endopeptidasa redirigida escinde proteolíticamente un sustrato de la SNAP-25. En aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma estable, una molécula de polinucleótido que codifica ORL1, DOR, KOR, MOR o SNAP-25. En aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma estable, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 62 que codifica ORL1. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma estable, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64 que codifica DOR. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma estable, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66 que codifica KOR. En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa

redirigida contienen, de forma estable, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 67 que codifica MOR.

En otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma estable, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 134 que codifica el receptor de Galanina 1. En aun otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma estable, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 144 que codifica el receptor de Galanina 2. En aun otros aspectos de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma estable, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 145 que codifica el receptor de Galanina 3. En aspectos adicionales de esta modalidad, las células de una línea celular establecida susceptibles a la actividad de la endopeptidasa redirigida contienen, de forma estable, la molécula de polinucleótido de la SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69 que codifica SNAP-25.

Como se mencionó anteriormente, se puede introducir en una célula un componente exógeno necesario para que las

células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde de forma proteolítica un sustrato de la SNAP-25, como, por ej., una SNAP-25, un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de Galanina 1, un receptor de Galanina 2 o un receptor de Galanina 3 descritos en la presente memoria descriptiva. Todo y cualquier método útil para la introducción de tal componente exógeno con un agente de suministro en una población celular puede ser útil con la condición de que este método introduzca, de forma transitoria, el componente exógeno descrito en la presente memoria descriptiva en al menos el 50% de las células en una población celular dada. Por consiguiente, los aspectos de la presente modalidad pueden incluir una población celular donde, por ej., al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de la población celular dada contiene, de forma transitoria, un componente exógeno necesario para que las células experimenten el mecanismo celular global mediante el cual una endopeptidasa redirigida escinde de forma proteolítica un sustrato de la SNAP-25, como, por ej., una SNAP-25, un ORL1, un DOR, un KOR, un MOR, un receptor de Galanina 1, un receptor de Galanina 2 o un receptor de Galanina 3 descritos en la presente memoria descriptiva. Como se utiliza en la presente, el término "agente de suministro" se refiere a cualquier molécula que permita o potencie la internalización de un enlazado de forma

covalente, no enlazado de forma covalente o asociado de cualquier otra forma con un polipéptido en una célula [sic]. Por consiguiente, el término "agente de suministro" comprende, a modo no taxativo, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas, moléculas de polinucleótidos, liposomas, lípidos, virus, retrovirus y células que, a modo no taxativo, transportan una molécula unida de forma covalente o no covalente a la membrana celular, citoplasma celular o núcleo. Se comprende adicionalmente que el término "agente de suministro" comprende moléculas que se internalizan mediante cualquier mecanismo, incluyendo agentes de suministro que funcionan a través de endocitosis mediada por receptores y los que son independientes de la endocitosis mediada por receptores.

Un agente de suministro también puede ser un agente que permita o potencie la absorción celular de un componente enlazado de forma covalente, como SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, receptor de Galanina 1, receptor de Galanina 2 o receptor de Galanina 3 tales como, por ej., mediante conjugación química o mediante proteínas de fusión producidas genéticamente. Los métodos que enlazan de forma covalente los agentes de suministro y los métodos de uso de tales agentes se describen, por ej., en Steven F. Dowdy, *Protein Transduction System and Methods of Use Thereof*, publicación internacional

No WO 00/34308; Gérard Chassaing & Alain Prochiantz, *Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules*, patente estadounidense No. 6,080,724; Alan Frankel et al., *Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiety*, patente estadounidense No. 5,674,980; Alan Frankel et al., *TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates*, patente estadounidense No. 5,747,641; Alan Frankel et al., *TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins*, patente estadounidense No. 5,804,604; Peter F. J. O'Hare et al., *Use of Transport Proteins*, patente estadounidense No. 6,734,167; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, patente estadounidense No. 5,807,746; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, patente estadounidense No. 6,043,339; Yao-Zhong Lin et al., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, patente estadounidense No. 6,248,558; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic *Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, patente estadounidense No. 6,432,680; Jack J. Hawiger et al., *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, patente estadounidense No. 6,495,518; Yao-Zhong Lin et al., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, patente estadounidense No. 6,780,843;

Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, patente estadounidense No. 6,306,993; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, patente estadounidense No. 6,495,663 y Pamela B. Davis et al., *Fusion Proteins for Protein Delivery*, patente estadounidense No. 6,287,817, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad a modo de referencia.

Un agente de suministro también puede ser un agente que permita o potencie la absorción celular de un componente asociado de forma no covalente, como SNAP-25, ORL1, DOR, KOR, MOR, receptor de Galanina 1, receptor de Galanina 2 o receptor de Galanina 3. Los métodos que funcionan en ausencia de enlace covalente y los métodos de uso de tales agentes se describen, por ej., en Gilles Divita et al, *Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use*, patente estadounidense No. 6,841,535; Philip L Felgner and Olivier Zelphati, *Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use*, publicación de patente estadounidense No. 2003/0008813 y Michael Karas, *Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids*, publicación de patente estadounidense 2004/0209797, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad a modo de referencia. Tales agentes de suministro de péptidos se pueden preparar y utilizar a

través de métodos estándar y se encuentran comercialmente disponibles, véase, por ej., el reactivo CHARIOT™ (Active Motif, Carlsbad, CA); reactivo BIO-PORTER® (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA), reactivo de suministro de proteínas BIO TREK™ (Stratagene, La Jolla, CA) y reactivo de transfección de proteínas PRO-JECT™ (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida. Como se usa en la presente, el término "muestra que comprende una endopeptidasa redirigida" se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene una endopeptidasa redirigida desdectiva. Se puede analizar una variedad de muestras de acuerdo con un método descrito en la presente memoria descriptiva incluyendo, a modo no taxativo, endopeptidasa redirigida purificada, parcialmente purificada o no purificada; endopeptidasa redirigida recombinante de cadena simple o cadena doble con una secuencia de origen natural o no natural; endopeptidasa redirigida recombinante con una especificidad de proteasa modificada; endopeptidasa redirigida recombinante con una especificidad celular alterada; endopeptidasa redirigida desde granel; un producto de endopeptidasa redirigida formulado y células o lisados celulares crudos, fraccionados o parcialmente purificados de,

por ej., fuentes de mamíferos, bacterias, levadura o insectos; sangre, plasma o suero; alimentos crudos, parcialmente cocidos, cocidos o procesados; bebidas; alimentos animales; muestras de tierra; muestras de agua; sedimentos de estanques; lociones; cosméticos y formulaciones clínicas. Se comprende que el término "muestra" abarca muestras de tejidos incluyendo, a modo no taxativo, muestras de tejidos de mamíferos, muestras de tejidos de ganado tal como muestras de tejidos de ovejas, vacas y cerdos; muestras de tejidos de primates y muestras de tejidos humanos. Tales muestras abarcan, a modo no taxativo, muestras intestinales tales como muestras intestinales de niños y muestras de tejido obtenidas de una herida. A modo de ejemplos no taxativos, un método para detectar cantidades picomolares de la actividad de endopeptidasa redirigida pueden ser útiles para determinar la presencia o actividad de una endopeptidasa redirigida en una muestra de alimento o bebida; para analizar una muestra de un humano o un animal, por ejemplo, expuesta a una endopeptidasa redirigida o que tiene uno o más síntomas de botulismo; para seguir la actividad durante la producción y purificación de endopeptidasa redirigida desde granel; para analizar un producto de endopeptidasa redirigida formulado usado en aplicaciones farmacéuticas o cosméticas o para analizar el suero sanguíneo de un sujeto para determinar la presencia o

ausencia de anticuerpos α-endopeptidasa redirigida neutralizantes.

Por lo tanto, en una modalidad, una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida es una muestra que comprende cualquier cantidad de una endopeptidasa redirigida. En aspectos de esta modalidad, una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida comprende alrededor de 100 ng o menos, alrededor de 10 ng o menos, alrededor de 1 ng o menos, alrededor de 100 pg o menos, alrededor de 10 pg o menos o alrededor de 1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida. En otros aspectos de esta modalidad, una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida comprende alrededor de 1 µM o menos, alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos, alrededor de 1 nM o menos, alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos, alrededor de 1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Tal como se usa en la presente, el término "componente de SNAP-25 que comprende una SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil" se refiere a un componente celular que

contiene el producto de la escisión de la SNAP-25. Se prevé que cualquier método adecuado para enriquecer o aislar un componente de la SNAP-25 puede ser útil, incluyendo, a modo no taxativo, protocolos de lisado celular, protocolos de purificación de columna de centrifugación, inmunoprecipitación, purificación por afinidad y cromatografía de proteínas.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, un anticuerpo α-SNAP-25 unido a un soporte de fase sólida. Como se usa en la presente, el término "soporte de fase sólida" es sinónimo de "fase sólida" y se refiere a cualquier matriz que se puede usar para inmovilizar un anticuerpo α-SNAP-25 descrito en la presente memoria descriptiva. Los ejemplos no taxativos de soportes de fase sólida incluyen, por ej., un tubo, una placa, una columna, pins o "tiras reactivas", una partícula magnética, una perla u otro medio cromatográfico esférico o fibroso, tal como, por ej., agarosa, sefarosa, sílice y plástico y láminas o membranas tales como, por ej., nitrocelulosa y fluoruro de polivinilideno (PVDF). El soporte de fase sólida se puede construir usando una amplia variedad de materiales tales como, por ej., vidrio, carbono, poliestireno, polivinilcloruro, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, diazocelulosa o almidón. El soporte de fase sólida seleccionado puede tener

una propiedad física que lo haga fácilmente separable de un material soluble o no unido y generalmente permite que los materiales no unidos, tales como, por ej., reactivos, subproductos de reacción o solventes en exceso se separen o retiren de otra forma (por ej., por lavado, filtración, centrifugación, etc.) del componente de ensayo unido al soporte de fase sólida. Los ejemplos no taxativos de cómo hacer y usar soportes de fase sólida se describen en, por ej., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, *anteriormente*, (2001) y Current Protocols in Molecular Biology, *anteriormente*, (2004), cada uno de los cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Los aspectos de la presente descripción comprenden, en parte, detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A y un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Se prevé que cualquier sistema de detección se pueda usar para poner en práctica los aspectos de este método basado en inmunoensayos descrito con la condición de que la proporción de señal a ruido puede distinguir, en una medida

estadísticamente significativa, la señal del complejo de anticuerpo-antígeno de la señal de fondo. Los ejemplos no taxativos de sistemas de detección basados en inmunoensayos incluyen análisis de inmunotransferencia, tal como transferencia Western y transferencia en mancha, análisis de inmunoprecipitación, análisis inmunosorbente unido a enzimas (ELISA) y ELISA tipo sándwich. La detección de la señal se puede lograr usando autorradiografía con obtención de imágenes o obtención de imágenes de fósforo (AU), quimioluminiscencia (CL), electroquimioluminiscencia (ECL), bioluminiscencia (BL), fluorescencia, transferencia de energía de resonancia, polarización plana, o citometría de flujo (FC) o Colotrimétrica. Las descripciones de sistemas de detección basados en inmunoensayos se describen en, por ej., Michael M.Rauhut, Chemiluminescence, In Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3ª ed, John Wiley and Sons, 1985); A. W. Knight, *A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenerated Chemiluminescence*, Trends Anal. Chem. 18(1): 47-62 (1999); K. A. Fahnrich, et al., *Recent Applications of Electrogenerated Chemiluminescence in Chemical Analysis*, Talanta 54(4): 531-559 (2001); *Commonly Used Techniques in Molecular Cloning*, pp. A8.1-A8-55 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Tomo 3, 3ª ed. 2001); *Detection Systems*, pp. A9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A

Laboratory Manual, Tomo 3, 3° ed. 2001); Electrogenerated Chemiluminescence, (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004), cada uno de los cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Un ELISA tipo sándwich (o inmunoensayo tipo sándwich) es un método basado en dos anticuerpos que se unen a epítopos diferentes en el antígeno. Un anticuerpo de captura que tiene una alta especificidad de unión para el antígeno de interés está unido a una superficie sólida. Luego se agrega el antígeno seguido por la adición de un segundo anticuerpo al que se llama anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección une al antígeno a un epítopo diferente al anticuerpo de captura. Por lo tanto el antígeno está intercalado entre los dos anticuerpos. La afinidad de unión al anticuerpo del anticuerpo es generalmente el principal determinante de la sensibilidad del inmunoensayo. A medida que la concentración de antígeno aumenta, la cantidad de anticuerpo de detección aumenta llevando a una mayor respuesta medida. Para cuantificar la medida de unión se pueden usar diferentes sistemas indicadores tales como, por ej., una enzima unida al anticuerpo secundario y un sustrato indicador donde la reacción enzimática forma una lectura como señal de detección. La señal generada es proporcional a la cantidad de antígeno diana presente en la muestra. El sustrato indicador usado para

medir el evento de unión determina el modo de detección. Se usa un lector de placa espectrofotométrico para la detección colorimétrica. Se han desarrollado sustratos quimioluminiscentes y electroquimioluminiscentes que amplifican adicionalmente la señal y se pueden leer en un lector luminiscente. El indicador también puede ser una lectura fluorescente donde la etapa enzimática del ensayo se reemplaza con un fluoróforo y la lectura se mide entonces usando un lector fluorescente. Los reactivos y protocolos necesarios para llevar a cabo un ELISA tipo sándwich ECL están comercialmente disponibles, incluyendo, sin excepción, plataforma de detección de ELISA-ECL tipo sándwich MSD (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

Por lo tanto, en una modalidad, se puede llevar a cabo la detección de la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α-SNAP-25 que se une de forma selectiva a un epítopo de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A y un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, usando un análisis de inmunotransferencia, un análisis de inmunoprecipitación, un ELISA o un ELISA tipo sándwich. En aspectos de esta modalidad, la detección se lleva a cabo

usando un análisis de inmunotransferencia AU, CL, ECL o BL, un análisis de inmunoprecipitación AU, CL, ECL, BL o FC, un ELISA AU, CL, ECL, BL o FC o un ELISA tipo sándwich AU, CL, ECL, BL o FC.

Los aspectos de la presente descripción se pueden poner en práctica de forma simple o múltiple. Un método basado en inmunoensayos para detectar la actividad de endopeptidasa redirigida puesto en práctica de forma simple es uno que solo detecta la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α-SNAP-25 y un producto de escisión SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Un método basado en imunoensayos de detectar la actividad de endopeptidasa redirigida puesto en práctica en una forma múltiple es uno que detecta simultáneamente la presencia de dos o más complejos anticuerpo-antígeno; uno de los cuales es el complejo de anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α-SNAP-25 y un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A y otro(s) del cual es el complejo de anticuerpo-antígeno a una segunda, tercer, cuarta, etc. proteína diferente. Se puede usar una segunda proteína, por ej., como un control interno para minimizar la variabilidad muestra a muestra normalizando la cantidad de

complejo de anticuerpo-antígeno α-SNAP-25/SNAP-25 detectado a la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectado por la segunda proteína. Como tal, la segunda proteína es generalmente una que se expresa consistentemente en la célula, tal como una proteína doméstica. Los ejemplos no taxativos de una segunda proteína útil incluyen, por ej., una deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH), sintaxina, citocinas. Los métodos de realizar un ensayo basado en inmunoensayos en una forma múltiple se describen en, por ej., U. B. Nielsen and B. H. Geierstanger, *Multiplexed Sandwich Assays in Microarray Format*, J. Immunol. Methods. 290(1-2): 107-120 2004); R. Barry and M, Soloviev, *Quantitative Protein Profiling using Antibody Arrays*, Proteomics, 4(12): 3717-3726 (2004); M. M. Ling et al., *Multiplexing Molecular Diagnostics and Immunoassays using Emerging Microarray Technologies*, Expert Rev Mol Diagn. 7(1): 87-98 (2007); S. X. Leng et al., *ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research*, J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63(8): 879-884 (2008), cada uno de los cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Por lo tanto, en una modalidad, un método basado en inmunoensayos de detectar la actividad de endopeptidasa redirigida puesto en práctica de forma simple sólo detecta la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende

un anticuerpo α-SNAP-25 y un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A. En otra modalidad, el método basado en inmunoensayos de detectar la actividad de endopeptidasa redirigida puesto en práctica en forma múltiple detecta simultáneamente la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α-SNAP-25 y un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A y al menos otro complejo de anticuerpo-antígeno a una proteína que no es SNAP-25, tal como, por ej., GAPDH o Sintaxina.

Los aspectos de la presente descripción proporcionan, en parte, un método para determinar inmunorresistencia a endopeptidasa redirigida. Tal como se usa en la presente, el término "inmunorresistencia a la endopeptidasa redirigida" significa un mamífero que no responde totalmente a una terapia de endopeptidasa redirigida o muestra un efecto beneficioso reducido de una terapia de endopeptidasa redirigida debido a que la respuesta inmune a ese mamífero, ya sea directa o indirectamente, reduce la eficacia de la terapia. Un ejemplo no taxativo de eficacia reducida sería la presencia en un mamífero de al menos un anticuerpo de α-endopeptidasa redirigida neutralizante que se une a una endopeptidasa

redirigida en una forma que reduce o previene la especificidad o actividad de la endopeptidasa redirigida. Tal como se usa en la presente, el término "terapia con endopeptidasa redirigida" que significa el tratamiento, remedio, cura, curación, rehabilitación o cualquier otro medio de contrarrestar algo no deseable en un mamífero que requiere neuromodulación usando una endopeptidasa redirigida o administrar a un mamífero una o más dosis controladas de medicación, preparación o mezcla de una endopeptidasa redirigida que tiene efecto medicinal, terapéutico, curativo, cosmético, reparador o cualquier otro efecto beneficioso. La terapia de endopeptidasa redirigida desdebarca, a modo no taxativo, el uso de cualquier de origen natural o fragmento del mismo [sic], en cualquier formulación, combinado con cualquier portador o ingrediente activo y administrado por cualquier vía de administración.

Los aspectos de la presente descripción proporcionan, en parte, una muestra de prueba obtenida de un mamífero al que se le realizan pruebas para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes de α-endopeptidasa redirigida. Tal como se usa en la presente, el término "muestra de prueba" se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene al menos un anticuerpo de endopeptidasa α-redirigida. Un anticuerpo de endopeptidasa α-redirigida puede ser un anticuerpo de endopeptidasa α-

redirigida neutralizante o un anticuerpo de endopeptidasa α-redirigida no neutralizante. Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpos de endopeptidasa α-redirigida neutralizante" significa cualquier anticuerpo de endopeptidasa α-redirigida que se unirá, en condiciones fisiológicas, a una región de una endopeptidasa redirigida como para reducir o prevenir que la endopeptidasa redirigida ejerza su efecto en una terapia con endopeptidasa redirigida. Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpos de endopeptidasa α-redirigida no neutralizante" significa cualquier anticuerpo de endopeptidasa α-redirigida que se unirá, en condiciones fisiológicas, a una región de una endopeptidasa redirigida pero no prevendrá que la endopeptidasa redirigida ejerza su efecto en una terapia con endopeptidasa redirigida. Se prevé que cualesquiera y todas las muestras que pueden contener anticuerpos de endopeptidasa α-redirigida se pueden usar en este método, incluyendo, a modo no taxativo, sangre, plasma, suero y fluido linfático. Además, cualquiera y todos los organismos capaces de elevar anticuerpos de endopeptidasa α-redirigida contra una endopeptidasa redirigida pueden servir como una fuente para una muestra que incluye, a modo no taxativo, pájaros y mamíferos, incluyendo ratones, ratas, cabras, ovejas, caballos, burros, vacas, primates y humanos. Los ejemplos no taxativos de protocolos específicos para la recolección de sangre y preparación de suero se describen en,

por ej., Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, Blood Collection in Healthcare (F.A. Davis Company, 2001) y Diana Garza & Kathleen Becan-McBride, Phlebotomy Handbook: Blood Collection Essentials (Prentice Hall, 6° ed., 2002). Estos protocolos son procedimientos de rutina dentro del alcance de un experto en la técnica y de la descripción en la presente. Una muestra de prueba se puede obtener de un organismo antes de la exposición a la endopeptidasa redirigida, luego de un único tratamiento con endopeptidasa redirigida, luego de tratamientos múltiples con endopeptidasas redirigidas, antes del inicio de resistencia a una terapia de endopeptidasa redirigida o luego del comienzo de resistencia a una terapia de endopeptidasa redirigida.

Los aspectos de la presente descripción proporcionan, en parte, una muestra de control. Tal como se usa en la presente, el término "muestra de control" significa cualquier muestra donde la presencia o ausencia de la muestra de prueba sea conocida e incluya muestras de control tanto negativas como positivas. Con respecto a anticuerpos de endopeptidasa α-redirigida neutralizantes, una muestra de control negativo se puede obtener de un individuo que nunca haya estado expuesto a endopeptidasa redirigida y puede incluir, a modo no taxativo, una muestra del mismo individuo que proporciona la muestra de prueba, pero tomada luego de experimentar una terapia de

endopeptidasa redirigida; una muestra tomada de un individuo diferente que nunca estuvo expuesto a endopeptidasa redirigida; una muestra agrupada tomada de una pluralidad de diferentes individuos que nunca estuvieron expuestos a BoNT/A. Con respecto a anticuerpos de endopeptidasa α-redirigida neutralizantes, una muestra de control positivo se pueden obtener de un individuo que manifiesta inmunorresistencia a la endopeptidasa redirigida e incluye, a modo no taxativo, una prueba positiva individual en ensayos de prueba basados en pacientes; prueba individual positiva en un bioensayo in vivo y un individuo que muestra hiperinmunidad, por ej., un individuo vacunado con endopeptidasa redirigida.

También se prevé que los anticuerpos de endopeptidasa α-redirigidos se pueden purificar a partir de una muestra. Los anticuerpos de endopeptidasa α-redirigidos se pueden purificar a partir de una muestra, usando una variedad de procedimientos incluyendo, a modo no taxativo, cromatografía de proteína A/G y cromatografía de afinidad. Los ejemplos no taxativos de protocolos específicos para purificar anticuerpos desde una mezcla se describen en, por ej., Antibodies: A Laboratory Manual (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2° ed. 1998); Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998) y Molecular

Cloning, A Laboratory Manual, *anteriormente,* (2001), que se incorporan a la presente a modo de referencia. Además, los ejemplos no taxativos de métodos de purificación de anticuerpos así como reactivos, condiciones y protocolos bien caracterizados están fácilmente disponibles de los vendedores comerciales e incluyen, a modo no taxativo, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL y Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA. Estos protocolos son procedimientos de rutina dentro del alcance de un experto en la técnica.

Por lo tanto, en una modalidad, una muestra comprende sangre. En un aspecto de esta modalidad, la muestra comprende sangre de ratón, sangre de rata, sangre de cabra, sangre de oveja, sangre de caballo, sangre de burro, sangre de vaca, sangre de primate o sangre de humano. En otra modalidad, una muestra comprende plasma. En un aspecto de esta modalidad, una muestra de prueba comprende plasma de ratón, plasma de rata, plasma de cabra, plasma de oveja, plasma de caballo, plasma de burro, plasma de vaca, plasma de primate o plasma de humano. En otra modalidad, una muestra comprende suero. En un aspecto de esta modalidad, la muestra comprende suero de ratón, suero de rata, suero de cabra, suero de oveja, suero de caballo, suero de burro, suero de vaca, suero de primate y suero de humano. En otra modalidad, una muestra comprende fluido linfático. Un aspecto de esta modalidad, una muestra comprende

fluido linfático de ratón, fluido linfático de cabra, fluido linfático de oveja, fluido linfático de caballo, fluido linfático de burro, fluido linfático de vaca, fluido linfático de primate o fluido linfático de humano. En aun otra modalidad, una muestra es una muestra de prueba. En aun otra modalidad, una muestra es una muestra de control. En aspectos de esta modalidad, una muestra de control es una muestra de control negativo o una muestra de control positivo.

Los aspectos de la presente descripción proporcionan, en parte, comparar la cantidad de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A detectada en la etapa (d) con la cantidad de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A detectada en la etapa (e). En una modalidad, la cantidad de producto de la escisión de la SNAP-25 en la muestra de prueba es mayor en comparación con la cantidad de producto de la escisión de la SNAP-25 en la muestra de control. En un aspecto de esta modalidad, una cantidad mayor de producto de la escisión de la SNAP-25 en la muestra de prueba en comparación con una muestra de control positivo indica una reducción en o falta de inmunorresistencia a la endopeptidasa redirigida en el mamífero. En otro aspecto de esta modalidad, una cantidad equivalente de producto de la

escisión de la SNAP-25 en la muestra de prueba en comparación con una muestra de control negativo indica una reducción en o falta de inmunorresistencia a la endopeptidasa redirigida en el mamífero. En otra modalidad, la cantidad de producto de la escisión de la SNAP-25 en la muestra de prueba es menor en comparación con la cantidad de producto de la escisión de la SNAP-25 en la muestra de control. En un aspecto de esta modalidad, una cantidad menor o equivalente de producto de la escisión de la SNAP-25 en la muestra de prueba en comparación con una muestra de control positivo indica un aumento en, o presencia de, inmunorresistencia a la endopeptidasa redirigida en el mamífero. En otro aspecto de esta modalidad, una cantidad menor de producto de la escisión de la SNAP-25 en la muestra de prueba en comparación con una muestra de control negativo indica un aumento en, o presencia de, inmunorresistencia a la endopeptidasa redirigida en el mamífero.

Se prevé que cualesquiera y todas las condiciones de ensayo adecuadas para detectar la presencia de un anticuerpo de endopeptidasa α-redirigida neutralizante en una muestra son útiles en los métodos descritos en la presente memoria descriptiva, tales como, por ej., condiciones de ensayo lineales y condiciones de ensayo no lineales. En una modalidad, las condiciones de ensayo son lineales. En un

aspecto de esta modalidad, la cantidad de la endopeptidasa redirigida en el ensayo está en exceso. En otro aspecto de esta modalidad, la cantidad de la endopeptidasa redirigida en el ensayo es limitante de la velocidad. En otro aspecto de esta modalidad, la cantidad de una muestra de prueba en el ensayo es limitante de la velocidad.

Los aspectos de la presente descripción también se pueden describir de la siguiente manera:

1. Un método para detectar la actividad de endopeptidasa redirigida que comprende las etapas de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una enopeptidasa redirigida donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a actividad de endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (c) poner en contacto el componente de SNAP-25 con una anticuerpo α-SNAP-25, donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25 y (d) detectar la presencia de un complejo de

anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25 donde la detección por el complejo de anticuerpo-antígeno indica la actividad de endopeptidasa redirigida.

2. Un método para detectar la actividad de endopeptidasa redirigida que comprende las etapas de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una enopeptidasa redirigida donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a actividad de endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (c) poner en contacto el componente de SNAP-25 con una anticuerpo α-SNAP-25 unido a un soporte de fase sólida, donde el anticuerpo α-SNAP-25 se une a un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25 y (d) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25 donde la detección mediante el complejo de anticuerpo-antígeno indica la actividad de endopeptidasa redirigida.

3. Un método para detectar la actividad de endopeptidasa redirigida que comprende las etapas de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una enopeptidasa redirigida donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a la actividad de endopeptidasa redirigida por una endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A; (c) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; (d) poner en contacto el componente de la SNAP-25 con una anticuerpo α-SNAP-25, donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25 y (e) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25 donde la detección mediante el complejo de anticuerpo-antígeno indica la actividad de endopeptidasa redirigida.

4. Un método para detectar la actividad de endopeptidasa redirigida que comprende las etapas de: (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende

una enopeptidasa redirigida donde la célula de una línea celular establecida puede absorber la endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (c) poner en contacto el componente de SNAP-25 con una anticuerpo α-SNAP-25, donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25 y (d) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25 donde la detección mediante el complejo de anticuerpo-antígeno indica la actividad de endopeptidasa redirigida.

5. Un método para detectar la actividad de endopeptidasa redirigida que comprende las etapas de: (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida donde la célula de una línea celular establecida puede absorber la endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (c) poner

en contacto el componente de SNAP-25 con una anticuerpo α-SNAP-25 unido a un soporte de fase sólida, donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25 y (d) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25 donde la detección mediante el complejo de anticuerpo-antígeno indica la actividad de endopeptidasa redirigida.

6. Un método para detectar la actividad de endopeptidasa redirigida que comprende las etapas de: (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida donde la célula de una línea celular establecida puede absorber una endopeptidasa redirigida; (b) aislar de la célula tratada un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (c) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; (d) poner en contacto el componente de la SNAP-25 con una anticuerpo α-SNAP-25, donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la

BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25 y (e) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25 donde la detección mediante el complejo de anticuerpo-antígeno indica la actividad de endopeptidasa redirigida.

7. Un método para determinar la inmunorresistencia de endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: (a) agregar una endopeptidasa redirigida desde una muestra de prueba obtenida de un mamífero al que se le están realizando pruebas para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes de endopeptidasa α-redirigida; (b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, donde la célula de la línea celular establecida es susceptible a la actividad de endopeptidasa redirigida; (c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de SNAP-25 que tiene extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A; (d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25; (e) detectar la presencia de un

complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25 (f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba; la muestra de control negativo comprende una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida y (g) comparar la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa e con la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f, donde la detección de una cantidad menor de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa e con relación a la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectado en la etapa f indica la presencia de anticuerpos de neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida.

8. Un método para determinar la inmunorresistencia de endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: (a) agregar una endopeptidasa redirigida desde una muestra de prueba obtenida de un mamífero al que se le están realizando pruebas para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes de endopeptidasa α-redirigida; (b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a la actividad de endopeptidasa redirigida; (c) aislar de las células tratadas un componente

de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de SNAP-25 que tiene un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 unido a un soporte de fase sólida, donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25; (e) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo de endopeptidasa α-redirigida y el producto de la escisión de la SNAP-25 (f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba; la muestra de control negativo comprende una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida y (g) comparar la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa e con la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f, donde la detección de una cantidad menor de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa e con relación a la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f indica la presencia de anticuerpos de neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida.

9. Un método para determinar la inmunorresistencia de endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: (a) agregar una endopeptidasa redirigida desde una muestra de prueba obtenida de un mamífero que al que se le están realizando pruebas para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes de endopeptidasa α-redirigida; (b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a la actividad de endopeptidasa redirigida; (c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de SNAP-25 que tiene extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A; (d) fijar el componente de SNAP-25 con un soporte de fase sólida; (e) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25; (f) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de SNAP-25; (g) repetir las etapas b-f con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba; la muestra de control negativo comprende una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes

de la endopeptidasa α-redirigida y (h) comparar la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f con la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa g, donde la detección de una cantidad menor de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f con relación a la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa g indica la presencia de anticuerpos de neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida.

10. Un método para determinar la inmunorresistencia de endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: (a) agregar una endopeptidasa redirigida desde una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está probando para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes de endopeptidasa α-redirigida; (b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, donde la célula de la línea celular establecida puede absorber la endopeptidasa redirigida; (c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de SNAP-25 que tiene extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del

sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25; (e) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25, (f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba; la muestra de control negativo comprende una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida y (g) comparar la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa e con la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f, donde la detección de una cantidad menor de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa e con relación a la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f indica la presencia de anticuerpos de neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida.

11. Un método para determinar la inmunorresistencia de endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: (a) agregar una endopeptidasa redirigida desde una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está analizando para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes de endopeptidasa α-redirigida; (b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, donde la célula de la línea celular

establecida puede absorber la endopeptidasa redirigida; (c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de SNAP-25 que tiene extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A; (d) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 unido a un soporte de fase sólida, donde el anticuerpo α-SNAP-25 que une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25; (e) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25 (f) repetir las etapas b-e con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba; la muestra de control negativo comprende una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no contiene anticuerpos neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida y (g) comparar la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa e con la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f, donde la detección de una cantidad menor de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa e con relación a la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f indica la presencia de anticuerpos de neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida.

12. Un método para determinar la inmunorresistencia de endopeptidasa redirigida en un mamífero que comprende las etapas de: (a) agregar una endopeptidasa redirigida desde una muestra de prueba obtenida de un mamífero que al que se le están realizando pruebas para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes de endopeptidasa α-redirigida; (b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, donde la célula de una línea celular establecida puede absorber la endopeptidasa redirigida; (c) aislar de las células tratadas un componente de SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de SNAP-25 que tiene extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A; (d) fijar el componente de SNAP-25 a un soporte de fase sólida; (e) poner en contacto el componente de SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25; (f) detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de SNAP-25; (g) repetir las etapas b-f con una muestra de control negativo en vez de una muestra de prueba; la muestra de control negativo comprende una endopeptidasa redirigida y un suero que se sabe que no

contiene anticuerpos neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida y (h) comparar la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f con la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa g, donde la detección de una cantidad menor de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa f con relación a la cantidad de complejo de anticuerpo-antígeno detectada en la etapa g indica la presencia de anticuerpos de neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida.

13. El método de 1-3 y 7-9 donde la célula es susceptible a la actividad de endopeptidasa redirigida en alrededor de 500 nM o menos, en alrededor de 400 nM o menos, en alrededor de 300 nM o menos, en alrededor de 200 nM o menos, en alrededor de 100 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.

14. El método de 4-6 y 10-12 donde la célula puede absorber alrededor de 500 nM o menos, alrededor de 400 nM o menos, alrededor de 300 nM o menos, alrededor de 200 nM o menos, alrededor de 100 nM o menos de endopeptidasa redirigida.

15. El método de 1-6 donde la muestra comprende alrededor de 100 ng o menos, alrededor de 10 ng o menos,

alrededor de 1 ng o menos, 100 fg o menos, 10 fg o menos o 1 fg o menos de una endopeptidasa redirigida.

16. El método de 1-6, donde la muestra comprende alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos, alrededor de 1 nM o menos, alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos, alrededor de 1 nM o menos, alrededor de 0.5 nM o menos o alrededor de 0.1 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.

17. El método de 1-12 donde la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno se detecta mediante un análisis de inmunotransferencia, un análisis de inmunoprecipitación, un ELISA o un ELISA tipo sándwich.

18. El método de 1-12, donde el método tiene una proporción de señal a ruido para la asíntota inferior de al menos 3:1, al menos 5:1, al menos 10:1, al menos 20:1, al menos 50:1 o al menos 100:1

19. El método de 1-12, donde el método tiene una proporción de señal a ruido para la asíntota superior de al menos 10:1, al menos 20:1, al menos 50:1, al menos 100:1, al menos 200:1, al menos 300:1, al menos 400:1, al menos 500:1 o al menos 600:1.

20. El método de 1-12 donde el método puede detectar la actividad de EC_{50} de, por ej., al menos 100 ng, al menos 50 ng, al menos 10 ng, al menos 5 ng, al menos 100 pg, al menos 50 pg, al menos 10 pg, al menos 5 pg, al menos 100 fg, al menos 50 fg, al menos 10 fg o al menos 5 fg de una endopeptidasa redirigida.

21. El método de 1-12 donde el método puede detectar la actividad de EC_{50} de, por ej., al menos 10 nM, al menos 5 nM, al menos 100 nM, al menos 50 nM, al menos 10 nM, al menos 5 nM, al menos 1 nM, al menos 0.5 nM o al menos 0.1 nM de una endopeptidasa redirigida.

22. El método de 1-12 donde el método tiene un LOD de, por ej., 10 pg o menos, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida.

23. El método de 1-12 donde el método tiene un LOD de, por ej., 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos o 10 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.

24. El método de 1-12 donde el método tiene un LOQ de, por ej., 10 pg o menos, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una endopeptidasa redirigida.

25. El método de 1-12 donde el método tiene un LOQ de, por ej., 100 nM o menos, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos o 10 nM o menos de una endopeptidasa redirigida.

26. El método de 1-12 donde el método puede distinguir una endopeptidasa redirigida completamente activa de una endopeptidasa redirigida parcialmente activa que tiene, por ej., 70% o menos, 60% o menos, 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos o 10% o menos de la actividad de una endopeptidasa redirigida completamente activa.

27. El método de 1-12, donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escindil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25.

28. El método de 27, donde el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítopo que

no comprende una glutamina del extremo carboxiloterminal del enlace escisil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25 menor a 1×10^1 M^{-1} s^{-1} y donde el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio para el epítopo menor a 0.450 nM.

29. El método de 27, donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 82 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 92.

30. El método de 27 donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR1 V_H de la SEQ ID NO: 93, la CDR1 V_H de la SEQ ID NO: 94, la CDR1 V_H de la SEQ ID NO: 95, la CDR1 V_H de la SEQ ID NO: 118, la CDR1 V_H de la SEQ ID NO: 119 o la CDR1 V_H de la SEQ ID NO: 120.

32. El método de 27 donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR2 V_H de la SEQ ID NO: 96, la CDR2 V_H de la SEQ ID NO: 97, la CDR2 V_H de la SEQ ID NO: 98, la

CDR2 V_H de la SEQ ID NO: 99, la CDR2 V_H de la SEQ ID NO: 121 o la CDR2 V_H de la SEQ ID NO: 122.

33. El método de 27 donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR3 V_H de la SEQ ID NO: 100, la CDR3 V_H de la SEQ ID NO: 101, la CDR3 V_H de la SEQ ID NO: 102 o la CDR3 V_H de la SEQ ID NO: 124.

34. El método de 27 donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR1 V_H de la SEQ ID NO: 103, la CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 104, la CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 105, la CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 106, la CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 107, la CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 125, la CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 126, la CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 127, la CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 128 o la CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 129.

35. El método de 27 donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR2 V_L de la SEQ ID NO: 108, la CDR2 V_L de la SEQ ID NO: 109, la CDR2 V_L de la SEQ ID NO: 110, la CDR2 V_L de la SEQ ID NO: 111 o la CDR2 V_L de la SEQ ID NO: 112.

36. El método de 27 donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende al menos la CDR3 V_L de la SEQ ID NO: 113, la CDR3 V_L de la SEQ ID NO: 114, la CDR3 V_L de la SEQ ID NO: 115, la CDR3 V_L de la SEQ ID NO: 116 o la CDR3 V_L de la SEQ ID NO: 117.

37. El método de 27, donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 121 y SEQ ID NO: 100 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110 y SEQ ID NO: 115.

38. El método de 27, donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado se une de forma selectiva al epítopo de la SNAP-25 de la SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 148.

39. El método de 27, donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado se une de forma selectiva al epítopo de SNAP-25 de la SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44.

EJEMPLOS

Ejemplo I

Análisis de líneas de célula candidatas para expresión del receptor endógeno de endopeptidasa redirigida

El siguiente ejemplo demuestra cómo identificar líneas celulares establecidas que poseen la capacidad de absorción de

endopeptidasa redirigida necesaria para desarrollar un ensayo de potencia basado en células.

1. Crecimiento de cultivo madre de líneas celulares candidatas

Para el crecimiento de líneas celulares, una densidad adecuada de células de la línea celular que se está analizando se colocaron en placas en un matraz de cultivo de tejido de 162 cm^2 que contenía 30 mL de un medio de cultivo adecuado (véase Tabla 1) y se cultivaron en un incubador a 37°C con 5% o 10% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaran la densidad deseada.

Tabla 1. Medio usado en el análisis de líneas celulares

Línea celular	Composición de medio de cultivo en suero
SiMa y clones de SiMa	RPMI 1640, 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina-estreptomicina, 2 mM de L-Glutamina
PC12	RPMI 1640, 5% de suero bovino fetal inactivado con calor, 10% de suero equino, 2 mM de GlutaMAX™, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sodio, 1% de penicilina-estreptomicina

Tabla 1. Medio usado en el análisis de líneas celulares	
Línea celular	Composición de medio de cultivo en suero
N18 ND8/34 NG108-15	90% de DMEM, 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 2 mM de glutamina, 2 mM de glucosa
SK-N-DZ SK-N-F1 SK-N-SH	90% de DMEM, 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 4 mM de glutamina, 4 mM de glucosa, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1.5 g/L de $NaHCO_3$
BE(2)-C SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM(11090-081, Gibco), F12 de Ham(11765-054, Gibco), 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 2 mM de glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales,
ND3, ND7, ND15	medio DMEM con 2 mM de glutamina (Invitrogen, Cat #. 11885), 10 % de suero bovino fetal (Invitrogen, Cat #. 16140) y 1x de antibiótico / antimicótico
Neuro-2a	EMEM, 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 2 mM de glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1.5 g/L de $NaHCO_3$, 1 mM de piruvato de sodio

2. Análisis de células que expresan un receptor diana en la superficie celular

5

Las líneas celulares se analizaron para detectar la presencia del receptor diana deseado usando citometría de flujo y/o ensayos de unión al ligando. Pese a que los ejemplos a continuación usaron reactivos para identificar un receptor opioide o tipo opioide en la membrana plasmática, los enfoques descritos a continuación se pueden usar para identificar el receptor afín a cualquiera de las endopeptidasas redirigidas.

a. Identificación de líneas celulares usando citometría de flujo

Para identificar células que comprenden líneas celulares establecidas que expresan receptores diana para una endopeptidasa redirigida en la superficie celular, se llevó a cabo análisis de citometría de flujo. Las células de cada línea celular candidata se cultivaron como se describió en la Sección 1, se trataron con tripsón, se lavaron en amortiguador de tinción que comprendía 1 x de PBS, 0.5% de BSA y se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 minutos. Las células sedimentadas se volvieron a suspender en amortiguador de tinción y alrededor de 2.0 x 10^6 células se transfirieron a nuevos tubos, dos para cada receptor analizado. Para analizar la presencia de un receptor opioide o tipo opioide, alrededor de 2.0-5.0 µL de α-ORL-1 RA14133 (Neuromics, Edina, MN), anticuerpo policlonal de conejo α-DOR RA10101 (Neuromics,

Edina, MN), anticuerpo policlonal de conejo α-KOR RA10103 (Neuromics, Edina, MN) o anticuerpo policlonal de conejo α-MOR RA10104 (Neuromics, Edina, MN) se agregaron a un tubo y la mezcla se incubó a 4°C durante 1 hora. El segundo tubo se incubó a 4°C durante 1 hora sin ningún anticuerpo y sirvió como control negativo. Luego de la incubación del anticuerpo, se agregó 1.0 mL del amortiguador de tinción a cada tubo y se centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos. El sedimento celular se lavó una vez más con 1.0 mL de amortiguador de tinción. El sedimento celular se volvió a suspender en 200 µL de amortiguador de tinción y se agregaron 2.0 µL de anticuerpo de cabra anti-conejo IgG FITC a cada tubo y se incubó a 4°C durante 1 hora en la oscuridad. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, se agregó 1.0 mL del amortiguador de tinción a cada tubo y se centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos. El sedimento celular se lavó una vez más con 1.0 mL de amortiguador de tinción y el sedimento se volvió a suspender en 500 µL de amortiguador de tinción. La muestra se analizó usando un citómetro de flujo y los datos se mostraron como un recubrimiento de la tinción de anticuerpo anti-receptor sobre la tinción de IgG FITC de conejo.

Los resultados indicaron que, de las líneas celulares analizadas, ORL-1 se expresó en la superficie celular de alrededor del 50% de las células que comprenden SiMa, SiMa

P>33, clon H10, ND7 y la línea celular establecida SK-N-DZ, se expresó en la superficie celular de entre 25% a alrededor de 50% de las células que comprenden líneas celulares establecidas SH-SY5Y y ND15 y se expresó en la superficie celular de menos de alrededor de 25% de las células comprendían líneas celulares establecidas ND3, ND8, N18 y Neuro-2a (Tabla 2). Los resultados también indican que KOR se expresó en la superficie celular de alrededor del 50% de las células que comprenden las líneas celulares establecidas SH-SY5Y y ND7, se expresó en la superficie celular de entre alrededor de 25% a alrededor de 50% de las células que comprenden líneas celulares establecidas H10, SiMa P>33, ND15 y Neuro-2a del clon de SiMa y se expresó en la superficie celular de menos de alrededor de 25% de las células que comprenden líneas celulares establecidas ND3, ND8 y N18 (Tabla 2). Los resultados también revelaron que MOR se expresó en la superficie celular de alrededor del50% de las células que comprenden las líneas celulares establecidas ND7, ND15 y SiMa P>33, se expresó en la superficie celular de entre alrededor de 25% a alrededor de 50% de las células que comprenden SH-SY5Y, líneas celulares establecidas H10, ND8 y Neuro-2a del clon de SiMa y se expresó en la superficie celular de menos de alrededor de 25% de las células que comprenden líneas celulares establecidas ND3 y N18 (Tabla 2). El anticuerpo

policlonal de conejo α-DOR RA10101 no logró funcionar adecuadamente y no se generaron datos utilizables.

b. Identificación de líneas celulares usando unión al ligando

Para identificar células que comprenden líneas celulares establecidas que expresan receptores diana para una endopeptidasa redirigida en la superficie celular, se llevó a cabo el análisis de unión al ligando. Las células de las líneas celulares candidatas a ser analizadas se sembraron en una placa negra de fondo claro de 96 pocillos durante alrededor de 4 horas para promover la unión. Para analizar la presencia de un receptor opioide o tipo opioide, luego se aspiró el medio de cada pocillo y se reemplazó con 50 µL de solución de ligando que contenía 0 (control sin tratar), 0.001 nM, 0.01 nM, 0.1 nM o 1 nM de FAM-nociceptina (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA) o 0 (control sin tratar), 0.001 nM, 0.01 nM, 0.1 nM o 1 nM de FAM-dinorfina A (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA). Las células se incubaron con la solución de ligando durante 1 hora en el incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono. Las células se lavaron para retirar el ligando no unido al lavar las células tres veces con 100 µL de 1 x de PBS. La placa se analizó y el Typhoon (Ex 488 y Em 520 nm) y luego se leyó en el lector de placas M5 (Ex 495 y Em 520 nm) para detectar las señales RFU.

Los resultados indican que las células que comprenden las líneas celulares establecidas H10, SH-SY5Y y SK-N-DZ del clon SiMa unen la nociceptina, mientras que las células que comprenden el clon de SiMa H10 también unen la dinorfina (Tabla 2).

Tabla 2. Líneas celulares que expresan los receptores diana en la superficie celular

Receptor diana	Líneas celulares identificadas				
	Citometría de flujo			Unión de ligando	
	Más de 50% de expresión	25% a 50% de expresión	menos de 50% de expresión	Nociceptina	Dinorfina A
ORL-1	AGN P33, SiMa, clon de SiMa H10, ND7, SK-N-DZ	SH-SY5Y, ND15	ND3, ND8, N18, Neuro-2a	clon de SiMa H10, SH-SY5Y, SK-N-DZ	–
DOR	ND	ND	ND	ND	ND
KOR	SH-SY5Y, ND7	clon de SiMa H10, AGN P33, ND15, Neuro-2a	ND3, ND8, N18	–	clon de SiMa H10

Tabla 2. Líneas celulares que expresan los receptores diana en la superficie celular

Receptor diana	Líneas celulares identificadas				
	Citometría de flujo			Unión de ligando	
	Más de 50% de expresión	25% a 50% de expresión	menos de 50% de expresión	Nociceptina	Dinorfina A
MOR	ND7, ND15, AGN P33	SH-SY5Y, clon de SiMa H10, ND8, Neuro-2a	ND3, N18	ND	ND

Usando un enfoque similar, las líneas celulares que comprenden células que tienen receptores afines a otras endopeptidasas redirigidas se pueden identificar por medio del etiquetado con FAM del dominio de direccionamiento para estas endopeptidasas y el análisis de líneas celulares como se describió anteriormente.

3. Análisis de dosis única de líneas celulares candidatas usando molécula de endopeptidasa redirigida

Para determinar si una línea celular era capaz de absorber la molécula de endopeptidasa redirigida desdedecuada, una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular que se está analizando se colocó en los pocillos de placas de cultivo de tejido de 24 pocillos que contenía 1 mL de un medio de cultivo en suero adecuado (Tabla 1). Las células se cultivaron en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaron la densidad apropiada (aproximadamente 18 a 24 horas). Para evaluar la absorción de una endopeptidasa redirigida opioide, el medio de cultivo se aspiró de cada pocillo y se reemplazó con 1) medio de cultivo recién preparado que no contenía endopeptidasa redirigida opioide (línea celular sin tratar) o 2) medio de cultivo recién preparado que contiene 30 nM de la endopeptidasa redirigida de nociceptina (Noc/A) o 100 nM de la endopeptidasa redirigida de dinorfina (Dyn/A) (línea celular tratada). Luego de una incubación durante la noche, las células se lavaron aspirando el medio de cultivo y enjuagando cada pocillo con 200 µL de 1 x de PBS. Para recolectar las células, el 1 x de PBS se aspiró, las células se lisaron agregando 50 µL de 2 x de amortiguador de carga de SDS, el lisado se transfirió a un tubo de ensayo limpio y la muestra se calentó hasta95°C durante 5 minutos.

Para detectar la presencia de sustrato de la SNAP-25 no escindida y productos de la SNAP-25 escindida, se analizó una alícuota de cada muestra recolectada mediante transferencia Western. En este análisis, se separó una alícuota de 12 µL de la muestra recolectada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida MOPS usando geles de poliacrilamida precast Bis-Tris 12% NUPAGE® Novex (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) en condiciones de desnaturalización y reducción. Los péptidos separados se transfirieron del gel a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) por transferencia Western usando un aparato de transferencia celular electroforético semiseco TRANS-BLOT® SD (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA). Las membranas de PVDF se bloquearon mediante incubación a temperatura ambiente durante 2 h en una solución que contenía solución salina amortiguada con tris (TBS) (25 mM de ácido clorhídrico 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (Tris-HCl) (pH 7.4), 137 mM de cloruro de sodio, 2.7 mM de cloruro de potasio), 0.1% de TWEEN-20® (monolaureato de sorbitán polioxietileno (20)), 2% de albúmina de suero bovino (BSA) y 5% de leche en polvo descremada. Las membranas bloqueadas se incubaron a 4 °C durante la noche en TBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaureato de sorbitán polioxietileno (20)), 2% de BSA y 5% de leche en polvo descremada que contenía 1) una dilución 1:5,000 de un anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 como el anticuerpo

principal (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD; o 2) una dilución 1:5,000 de S9684 de antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 como el anticuerpo principal (Sigma, San Luis, MO). Tanto los anticuerpos monoclonales de ratón como los policlonales de conejo α-SNAP-25 pueden detectar tanto el sustrato de la SNAP-25 no escindida como el producto de la escisión de la SNAP-25, lo que permitió la evaluación de la expresión general de la SNAP-25 en cada línea celular y el porcentaje de SNAP-25 escindida luego del tratamiento con endopeptidasa redirigida como parámetro para evaluar la cantidad de absorción de endopeptidasa redirigida. Las bandas sondadas con anticuerpo principal se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en TBS, TWEEN-20® (monolaureato de sorbitán de polioxietileno (20)). Las membranas lavadas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en TBS 0.1% de TWEEN-20® (monolaureato de sorbitán de polioxietileno (20)), 2% de BSA y 5% de leche descremada en polvo que contenía 1) una dilución 1:10,000 de inmunoglobulina G anti-ratón policlonal de cabra, cadenas pesada y ligera (IgG, H+L) de anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano picante (Zymed, San Francisco del Sur, CA) como anticuerpo secundario o 2) una dilución 1:10,000 inmunoglobulina G anti-ratón policlonal de cabra, cadenas pesada y ligera (IgG, H+L) de anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano picante (Zymed, San Francisco del Sur, CA) como anticuerpo secundario. Las bandas sondadas

con anticuerpo secundario se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en TBS y 0.1% de TWEEN-20® (monolaureato de sorbitán de polioxiethieno (20)). La detección de señal de los productos de la SNAP-25 etiquetados se visualizó usando el sistema de detección de transferencia Western ECL Plus™ (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), y se tomaron imágenes de la membrana y se cuantificó el porcentaje de escisión con un software de análisis y generador de imágenes de modo variable Typhoon 9410 (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La elección de tamaño de pixeles (100 a 200 pixeles) y los ajustes de voltaje de PMT (350 a 600, normalmente 400) dependió de la banda individual.

Con base en la detección del producto de la escisión de la SNAP-25, las siguientes líneas celulares presentaron una absorción de 30 nM de Noc/A: BE(2)-C, N18TG2, Neuro-2a, SiMa, SK-N-BE(2)-C y SK-N-DZ (Tabla 3), mientas que las siguientes líneas celulares presentaron una absorción de 100 nM de Dyn/A: N18TG2, Neuro-2a, PC12 y SiMa. Algunas de estas líneas celulares sensibles se analizaron con dosis más bajas de compuestos y/o con respuestas a dosis completas.

Tabla 3. Análisis de dosis única de líneas celulares candidatas usando Noc/A y Dyn/A redirigidas

Línea celular	Descripción	Fuente	Absorción de 30 nM de Noc/A	Absorción de 100 nM de Dyn/A
BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2268	Sí	NT
N18TG2	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 103	Sí	Sí
ND3	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090901	NDA	NDA
ND7/23	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG de rata primario	ECACC 92090903	No	No
ND8	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090904	NDA	NDA
ND15	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090907	No	No

Tabla 3. Análisis de dosis única de líneas celulares candidatas usando Noc/A y Dyn/A redirigidas

Línea celular	Descripción	Fuente	Absorción de 30 nM de Noc/A	Absorción de 100 nM de Dyn/A
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	Sí	Sí
NG108-15	Neuroblastoma de ratón/híbrido de glioma de rata	ECACC 88112302	No	NT
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	NT	Sí
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	No	NT
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	Sí	Sí
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2271	Sí	NT
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2149	Sí	NT
SK-N-F1	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2142	No	NT

Tabla 3. Análisis de dosis única de líneas celulares candidatas usando Noc/A y Dyn/A redirigidas

Línea celular	Descripción	Fuente	Absorción de 30 nM de Noc/A	Absorción de 100 nM de Dyn/A
SK-N-SH	Neuroblastoma humano	ECACC 86012802	No	NT

NT: Sin analizar.

NDA: No se detectó una cantidad detectable de SNAP-25 en esta línea celular.

Usando un enfoque similar, las líneas celulares que comprenden células que tienen receptores afines a otras endopeptidasas redirigidas se pueden evaluar para determinar la evaluación de endopeptidasa redirigida.

Ejemplo II

Análisis de expresión del receptor endógeno de endopeptidasa redirigida de líneas celulares clonales candidatas

1. Análisis de endopeptidasa redirigida de dosis única de líneas celulares clonales candidatas de una línea celular SiMa original

La solicitud de patente acompañante de Zhu Hong et al., *Cell Lines Useful in Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, solicitud de patente estadounidense No. de serie 61/160,199 describe líneas celulares clonales derivadas de una línea celular SiMa original que era útil en un ensayo de potencia de BoNT/A, según se describe en Ester Fernandez-Salas, et al., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, solicitud de patente estadounidense No. de serie 12/403,531, cada uno de los cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. Para determinar si estas líneas celulares clonales podían absorber la endopeptidasa redirigida desdepropiada, cada una se analizó usando un ensayo ELISA tipo sándwich ECL.

Para preparar un lisado tratado con una endopeptidasa redirigida, una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular que se estaba probando se colocó en los pocillos de placas de cultivo celular de 96 pocillos que contenían 100 µL de un medio de cultivo en suero apropiado (Tabla 1) durante la noche. El medio de las células sembradas se aspiró de cada pocillo y se reemplazó con medio recién

preparado que contenía 30 nM o una endopeptidasa redirigida Noc/A o 80 nM de una endopeptidasa redirigida Dyn/A. Luego de una incubación de 24 hrs, las células se lavaron aspirando el medio de crecimiento y enjuagando cada pocillo con 200 µL de 1 x de PBS. Para recolectar las células, se aspiró 1 x de PBS, las células se lisaron mediante la adición de 30 µL de amortiguador de lisis con 20 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1% de Tritón X-100 a cada pocillo y la placa se incubó en un agitador con rotación a 500 rpm durante 30 minutos a 4°C. La placa se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C para sedimentar los residuos celulares y el sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpo de captura para realizar la etapa de detección.

Para preparar una solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25_{197}, se purificó el anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25_{197} contenido en las ascitis de la línea celular de hibridoma 2E2A6 (Ejemplo XI) usando un protocolo de purificación de proteína A estándar.

Para preparar una solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25, el anticuerpo policlonal de conejo α-SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) se conjugó al reactivo de etiquetado del éster NHS Rutenio(II)-tris-bipiridina-(4-metisulfonato)

(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación se llevó a cabo agregando 30 µL de solución madre MSD SULFO-TAG™ reconstituida con agua destilada a 200 µL de 2 mg/mL de anticuerpos policlonales α-SNAP-25 e incubando la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Los anticuerpos etiquetados se purificaron usando un protocolo de columna de centrifugación estándar y la concentración de proteína se determinó usando un ensayo de proteína colorimétrico. La absorbancia del conjugado de anticuerpo α-SNAP-25/MSD SULFO-TAG™ se midió a 455 nm usando un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de anticuerpo de detección se almacenó a 4°C hasta que se necesitara. El almacenaje a largo plazo de alícuotas no usadas se realizó a -20°C.

Para preparar un soporte de fase sólida α-SNAP-25 que comprendía un anticuerpo de captura α-SNAP-25_{197}, se agregaron aproximadamente 5 µL de la solución de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25_{197} apropiada (20 µg/mL en 1 x de PBS) a cada pocillo de una placa MSD de alta unión de 96 pocillos y la solución se dejó secar al aire en un gabinete de seguridad biológica durante 2 a 3 horas para evaporar el líquido de la solución.

Las placas bloqueadas se sellaron y se almacenaron a 4°C hasta que se necesitaron.

Para detectar la presencia de un producto de SNAP-25 escindido por ELISA tipo sándwich ECL, los pocillos unidos a anticuerpo de captura se bloquearon agregando 150 µL de amortiguador de bloqueo que comprendía 2% de reactivo de bloqueo Amersham (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y 10% de suero de cabra (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 2 horas. El amortiguador de bloqueo se aspiró, se agregaron 25 µL de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida desde cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante la noche. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pocillo tres veces con 200 µL de 1 x de PBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego de lavar, se agregaron 25 µl de una solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 de 5 µg/mL que comprende 2% de reactivo de bloqueo Amersham en 1 x de PBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)) a cada pocillo, se sellaron e incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Luego de la incubación del anticuerpo de detección α-SNAP-25, los pocillos se lavaron tres veces con 200 µL de 1 x de PBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego de

lavar se agregaron 150 µL de 1 x amortiguador Read (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y las placas se leyeron usando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Los datos sin procesar se recogieron usando el generador de imágenes ECL.

Los resultados indican que la línea celular SiMa original así como la línea celular clonal H10 mostraron buena absorción de la endopeptidasa redirigida Noc/A (Tabla 4). Además, estos resultados revelan que muchas líneas celulares mostraron absorción de la endopeptidasa redirigida Dyn/A (Tabla 4). Tres líneas celulares clonales (1E11, AF4 y DC4) mostraron buena absorción de la endopeptidasa redirigida Dyn/A; once líneas celulares clonales (1E3, 2D2, 2D6, 3D8, 5C10, 5F3, BB10, BF8, CG8, CG10 y DE7) presentaron absorción moderada de la endopeptidasa redirigida Dyn/A y (3B8, 2B9, CE6, YB8, 4C8, 2F5, AC9, CD6, DD10, YF5) mostraron absorción mínima de la endopeptidasa redirigida Dyn/A. Algunas de estas líneas celulares candidatas se analizaron en un ensayo de dosis completa-respuesta con la endopeptidasa redirigida correspondiente.

Tabla 4. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas usando Noc/A y Dyn/A redirigidas

Línea celular	Absorción de 30 nM de Noc/A	Absorción de 80 nM de Dyn/A
AGN P33	+++	NT
A10	-	NT
D11	-	NT
H1	-	-
H10	+++	-
1D4	NT	-
2E4	NT	-
3D5	NT	-
3G10	NT	-
4D3	NT	-
BB3	NT	-
CC11	NT	-
DF5	NT	-
YB7	NT	-
BE3	NT	-
4B5	NT	-
2B9	NT	+
2F5	NT	+
3B8	NT	+

Tabla 4. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas usando Noc/A y Dyn/A redirigidas

Línea celular	Absorción de 30 nM de Noc/A	Absorción de 80 nM de Dyn/A
4C8	NT	+
AC9	NT	+
CD6	NT	+
CE6	NT	+
DD10	NT	+
YB8	NT	+
YF5	NT	+
1E3	NT	++
2D2	NT	++
2D6	NT	++
3D8	NT	++
5C10	NT	++
5F3	NT	++
BF8	NT	++
BB10	NT	++
CG8	NT	++
CG10	NT	++

Tabla 4. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas usando Noc/A y Dyn/A redirigidas

Línea celular	Absorción de 30 nM de Noc/A	Absorción de 80 nM de Dyn/A
DE7	NT	++
1E11	NT	+++
AF4	NT	+++
DC4	NT	+++

NT: Sin analizar

-: sin absorción; +: absorción mínima; ++: absorción moderada; +++: buena absorción

2. Análisis de respuesta a dosis completa de líneas celulares

Las líneas celulares establecidas identificadas anteriormente se evaluaron posteriormente usando una respuesta a la dosis completa de la endopeptidasa redirigida desdepropiada. Las células de las diferentes líneas celulares se colocaron en placas de 96 pocillos y se expusieron a diversas concentraciones de Noc/A (0, 0.14 nM, 0.4 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM y 100 nM) o de Dyn/A (0.017 nM, 0.05 nM, 0.15 nM, 0.45 nM, 1.4 nM, 4.1 nM, 12 nM, 37 nM, 111 nM, 333 nM y 1000 nM) durante 24 horas. Luego se retiró el medio que contenía endopeptidasa redirigida y se reemplazó con

medio completo recién preparado. Las placas se incubaron durante otras 24 horas a 5% de CO_2 a 37°C para permitir la escisión de la SNAP-25. Las células se lisaron en el amortiguador de lisis (Tabla 5) y las placas se centrifugaron para eliminar los residuos. Los lisados se usaron en un análisis de transferencia Western o en un ELISA tipo sándwich.

Para el análisis de transferencia Western, las muestras se analizaron para detectar la presencia de la SNAP-25 intacta y el producto de la escisión de la SNAP-25 como se describe en el Ejemplo I.

Para el ELISA tipo sándwich, las placas ELISA recubiertas con anticuerpo monoclonal 2E2A6 se bloquearon con 150 µL de amortiguador de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego de que se retiró el amortiguador de bloqueo, se agregaron 25 µL de lisados celulares a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante 2 horas. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se agregaron 25 µL de anticuerpo pAb anti-SNAP-25 de detección etiquetado con NHS-Éster SULFO-TAG a 5 µg/mL en 2% de reactivo de bloqueo en PBS-T en la esquina inferior de los pocillos. Las placas se sellaron y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido por tres lavados con PBS-T. Luego de que se completaron los lavados, se agregaron 150 µL de 1x de

amortiguador Read por pocillo y la placa se leyó en el lector de imágenes SI6000. Para determinar la sensibilidad de cada una de las líneas celulares analizadas y se calculó el valor de EC_{50} para cada línea celular [sic]. Los valores para la endopeptidasa redirigida Noc/A se resumen en la Tabla 5. La respuesta a la dosis completa de la endopeptidasa redirigida Dyn/A solo se realizaron en PC12 y el clon AF4. En ambos casos el ensayo no alcanzó una asíntota superior y no se pudo calcular la EC_{50}. La dosis inferior que produjo una señal para el clon AF4 fue de 12 nM para ambas líneas celulares.

Tabla 5. Análisis de dosis completa de líneas celulares candidatas usando Noc/A y Dyn/A redirigidas

Línea celular	Descripción	Fuente	EC_{50} de absorción de Noc/A	EC_{50} de absorción de Dyn/A
AGN P33	Neuroblastoma humano	–	5-10 nM	NT
BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2268	NT	NT
N18TG2	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 103	NT	NT
N18	Neuroblastoma de ratón	ECACC 88112301	>100 nM	NT

ND3	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090901	NDA	NT
ND7/23	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG de rata primario	ECACC 92090903	>100 nM	NT
ND8	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090904	NDA	NT
ND15	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG de rata neonatal primario	ECACC 92090907	>100 nM	NT
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	30 nM	NT
NG108-15	Neuroblastoma de ratón/híbrido de glioma de rata	ECACC 88112302	NT	NT
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	NT	>1000 nM
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	NT	NT
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	30 nM	NT
clon AF4 de SiMa	Neuroblastoma humano	–	NT	>300 nM

clon H1 de SiMa	Neuroblastoma humano	–	>100 nM	NT
clon H10 de SiMa	Neuroblastoma humano	–	20 nM	NT
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2271	NT	NT
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2149	0,5-2 nM	NT
SK-N-F1	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2142	>100 nM	NT
SK-N-SH	Neuroblastoma humano	ECACC 86012802	>100 nM	NT

NT: Sin analizar.

NDA: No se detectó una cantidad detectable de SNAP-25 en esta línea celular.

Usando un enfoque similar, las líneas celulares clonales que comprenden células que tienen receptores afines con otras endopeptidasas redirigidas se pueden analizar y evaluar para determinar la absorción de la endopeptidasa redirigida.

Ejemplo III

Evaluación de condiciones de cultivo en la absorción de la endopeptidasa redirigida en líneas celulares candidatas

El siguiente ejemplo ilustra cómo determinar las condiciones de cultivo, crecimiento y diferenciación, para líneas celulares establecidas que maximizan la absorción de endopeptidasa redirigida.

1. Efectos de la diferenciación celular y factores tróficos de la absorción de endopeptidasa redirigida en las líneas celulares candidatas.

Para determinar si la diferenciación celular o la presencia de factores tróficos en el medio de cultivo mejoraron la absorción de endopeptidasa redirigida, se examinaron las líneas celulares que presentaban buena absorción de Noc/A con diferentes composiciones de medio. Una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular SiMa P>30 que se estaba probando se colocó en los pocillos de placas de cultivo de tejido de 96 pocillos con 100 µL de un medio libre de suero con RPMI1640, 1% de penicilina-estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, complementado con B27 y N2 o 100 µL de un medio libre de medio con RPMI1640, 1% de penicilina-estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, complementado con B27, N2 y NGF (factor de crecimiento nervioso, 100 ng/mL).

Estas células se incubaron en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, según se evaluó mediante criterios morfológicos estándar y de rutina, tal como la detención del crecimiento y la extensión de neuritas (aproximadamente 1 a 2 días). Como control, una densidad adecuada de células de un cultivo madre de la línea celular que se estaba probando se colocó en los pocillos de placas de cultivo celular de 96 pocillos que contenía 100 µL de un medio de cultivo en suero apropiado (Tabla 1) con o sin NGF (100 ng/mL). Estas células de control no diferenciadas se cultivaron en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaron la densidad deseada (aproximadamente 18 a 24 horas). Se aspiró el medio tanto del cultivo de referencia diferenciado como el no diferenciado de cada pocillo y se reemplazó con medio recién preparado que contenía 0 (muestra sin tratar) o a varias concentraciones de Noc/A (0.14, 0.4, 1.23, 3.7, 11.1, 33.3 y 100 nM). Luego de un tratamiento de 24 horas, las células se lavaron y se incubaron durante 24 horas en medio libre de endopeptidasa redirigida para aumentar la cantidad de $SNAP25_{197}$ producida. Luego las células se lavaron y recolectaron para el ensayo ELISA tipo sándwich ECL como se describió en el Ejemplo II.

Los efectos de los factores tróficos también se analizaron en la línea celular SK-N-DZ. Las células SK-N-DZ se

colocaron en una placa de 96 pocillos recubierta con poli-D-lisina a 25,000 células por pocillo en ocho medios SM diferente (Tabla 6) durante 72 horas. Las células se trataron en los mismos ocho medios con Noc/A en dosis de 0, 0.3 nM, 3 nM y 30 nM. Luego de un tratamiento de 24 horas, las células se lavaron y se incubaron durante 24 horas en medio libre de endopeptidasa redirigida para aumentar la cantidad de producto de escisión de $SNAP25_{197}$ producido. Luego las células se lavaron y recolectaron para el ensayo de transferencia Western como se describió en el Ejemplo I.

La diferenciación no tuvo un efecto en la absorción de Noc/A en la línea celular SiMa >P30 mientras que parecía mejorar la absorción en la línea celular SK-N-DZ. El medio básico tuvo un efecto significativo en la absorción de Noc/A en la línea celular SK-N-DZ donde RPMI1640 que comprende factores tróficos N2 y B27 es la mejor combinación. La presencia de NGF en el medio no pareció mejorar la absorción en las dos líneas celulares analizadas.

Tabla 6. Efectos de factores tróficos y diferenciación celular en la absorción de Noc/A de líneas celulares candidatas.

No diferenciada	Diferenciada	EC_{50} de absorción de Noc/A	
		AGN P33	SK-N-DZ
DMEM, 10% FBS	–	NT	> 30 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27	–	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, NGF	–	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, RA	–	NT	>30 nM
RPMI1640, 10% FBS	–	NT	10 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27	–	7.2 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, NGF	–	9.1 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, RA	–	NT	10 nM
–	RPMI1640, N2, B27	10.2 nM	1 nM
–	RPMI1640, N2, B27, NGF	9.8 nM	0.6 nM

NGF: factor de crecimiento nervioso; RA: Ácido retinoico

NT: Sin analizar

Usando un enfoque similar, se pueden evaluar las condiciones de crecimiento y diferenciación para las líneas celulares clonales que comprenden células que tienen receptores afines a otras endopeptidasas redirigidas.

Ejemplo IV

Desarrollo de líneas celulares establecidas que expresan receptores exógenos de endopeptidasa redirigida

El siguiente ejemplo ilustra cómo realizar una línea celular establecida que expresa un receptor exógeno de una endopeptidasa redirigida.

1. Transfección de receptor diana en células que comprenden una línea celular candidata.

La endopeptidasa redirigida Noc/A comprende el dominio de direccionamiento de nociceptina que es el ligando natural del receptor opioide tipo 1 (ORL-1). Para obtener una construcción de expresión que comprende un marco abierto de lectura para un ORL-1, la construcción de expresión pReceiver-M02/ORL-1 se obtuvo de GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD).

De manera alternativa, un molécula de polinucleótido basada en una secuencia de aminoácidos ORL-1 (por ej., las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 26) se puede sintetizar usando procedimientos estándar (BlueHeron® Biotechnology, Bothell, WA). Los oligonucleótidos de 20 a 50 bases de longitud se sintetizan usando síntesis de fosforamidito estándar. Estos oligonucleótidos se hibridarán en dúplexes de doble cadena que se unen entre sí para armar la molécula de polinucleótido de longitud completa. Esta molécula de polinucleótido se clonará usando métodos de biología molecular estándar en un vector pUCBHB1 en el sitio SmaI para generar pUCBHB1/ORL-1. La molécula de polinucleótido sintetizada se verifica por establecimiento de secuencias usando Big Dye Terminator™ Chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Si se desea, un molécula de polinucleótido con expresión optimizada basada en una secuencia de aminoácidos ORL-1 (por ej., las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 26) se puede sintetizar para mejorar la expresión en una cepa de *Escherichia coli*. La molécula de polinucleótido que codifica ORL-1 se puede modificar para 1) contener codones sinónimos típicamente presentes en moléculas de polinucleótido naturales de una cepa de Escherichia coli; 2) contener un contenido G+C que se empareje más al contenido G+C promedio de moléculas de

polinucleótido naturales encontradas en una cepa de Escherichia coli; 3) reducir las regiones de polimononucleótido encontradas dentro de la molécula de polinucleótido y/o 4) eliminar los sitios estructurales o reguladores internos encontrados dentro de la molécula de polinucleótido, véase, por ej., Lance E. Steward *et al.*, *Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type A*, publicación de patente estadounidense 2008/0057575 (6 de marzo, 2008) y Lance E. Steward *et al.*, *Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type E*, publicación de patente estadounidense 2008/0138893 (12 de junio, 2008). Una vez que la optimización se secuencia se completa, los oligonucleótidos de 20 a 50 bases de longitud se sintetizan usando síntesis de fosforamidito estándar. Estos oligonucleótidos se hibridarán en dúplexes de doble cadena que se unen entre sí para armar la molécula de polinucleótido de longitud completa. Esta molécula de polinucleótido se clona usando métodos de biología molecular estándar en un vector pUCBHB1 en el sitio SmaI para generar pUCBHB1/ORL-1. La molécula de polinucleótido sintetizada se verifica por establecimiento de secuencias de ADN. Si se desea, se puede realizar la optimización de expresión a un organismo diferente tal como, por ej., una cepa de levadura, una línea celular de insecto o una línea celular de mamífero, véase, por ej., Steward, publicación de patente estadounidense 2008/0057575, anteriormente, (2008) y Steward,

publicación de patente estadounidense 2008/0138893, anteriormente, (2008). Los ejemplos de moléculas de polinucleótido que codifican un ORL-1 incluyen SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62.

Para construir una construcción de expresión que codifica un ORL-1, se digerirá una construcción pUCBHB1/ORL-1 con endonucleasas de restricción que 1) excisaron la molécula de polinucleótido que codifica el marco abierto de lectura de ORL-1 y 2) permitieron que esta molécula de polinucleótido se uniera de forma operativa a un vector pcDNA3 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Este inserto se subclonará usando procedimiento de ligasa de ADN T4 en un vector pcDNA3 que se digerirá con endonucleasas de restricción apropiadas para proporcionar pcDNA3/ORL-1. La mezcla de ligación se transformará en células BL21(DE3) de *E. coli* electrocompetentes (Edge Biosystems, Gaitherburg, MD) usando un método de electroporación y las células se colocarán en placas de ágar 1.5% Luria-Bertani (pH 7.0) que contienen 50 µg/mL de ampicilina y se colocarán en un incubador a 37°C para que crezcan durante la noche. Las construcciones de expresión que contienen bacterias se identificarán como colonias resistentes a la ampicilina. Las construcciones candidatas se aislarán usando un procedimiento de mini preparación de plásmido de lisis alcalina y se analizarán por mapeo de

digestión de endonucleasa de restricción para determinar la presencia y orientación del inserto. Esta estrategia de clonación proporcionará una construcción de expresión pcDNA3 que comprende la molécula de polinucleótido que codifica un ORL-1.

La endopeptidasa redirigida Dyn/A comprende el dominio de direccionamiento de dinorfina que es el ligando natural del receptor opioide κ (KOR). Para obtener una construcción de expresión que comprende un marco abierto de lectura para un ORL-1, la construcción de expresión pReceiver-M02/KOR-1 se obtuvo de GeneCopoeia (GeneCopoeia, Germantown, MD). De forma alternativa, las construcciones de expresión que codifican el KOR se pueden sintetizar y subclonar usando un enfoque similar al descrito anteriormente para producir la construcción de expresión pcDNA3.1/KOR. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos KOR incluyen la SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; los ejemplos de moléculas de polinucleótido que codifican un KOR incluyen SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66.

Se pueden usar estrategias de clonación similares para realizar construcciones de expresión que codifican otros receptores de endopeptidasa redirigida tales como, por ej., pcDNA3.1/DOR o pcDNA3.1/MOR, pcDNA3.1/receptor de galanina 1, pcDNA3.1/receptor de galanina 2 o pcDNA3.1/receptor de

galanina 3. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos DOR incluyen la SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28; los ejemplos de secuencias de aminoácidos MOR incluyen la SEQ ID NO: 31, los ejemplos de secuencias de aminoácidos del receptor de galanina 1 incluyen la SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 y SEQ ID NO: 138; los ejemplos de secuencias de aminoácidos del receptor de galanina 2 incluyen SEQ ID NO: 139 y los ejemplos de secuencias de aminoácidos del receptor de galanina 3 incluyen SEQ ID NO: 140. Los ejemplos de moléculas de polinucleótidos que codifican un DOR incluyen la SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64; los ejemplos de moléculas de polinucleótidos que codifican un MOR incluyen la SEQ ID NO: 67, los ejemplos de moléculas de polinucleótidos que codifican el receptor de galanina 1 incluyen la SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 y SEQ ID NO: 143; los ejemplos de moléculas de polinucleótidos que codifican el receptor de galanina 2 incluyen SEQ ID NO: 144 y los ejemplos de moléculas de polinucleótidos que codifican el receptor de galanina 3 incluyen SEQ ID NO: 145.

Para introducir una construcción de expresión que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida, las líneas celulares se transfectaron con una construcción de expresión que codifica un receptor de endopeptidasa redirigida. Para transfectar una línea celular con un receptor opioide o tipo opioide, las células de una línea celular candidata se

sembraron a una densidad de 1 x 10^7 células en un matraz recubierto con colágeno IV T_{175} y se cultivaron en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaran la densidad deseada. Una solución de transfección de 4.2 mL se preparó agregando 4 mL de medio de suero reducido OPTI-MEM que contiene 200 µL of LipofectAmina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 4 mL de medio de suero reducido OPTI-MEM que contiene 20 µg de un pReceiver-M02/ORL-1 o 20 µg de pReceiver-M02/KOR-1. Esta transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. El medio se reemplazó con 8 mL de medio libre de suero y libre de antibióticos recién preparado y la solución de transfección se agregó a las células. Las células luego se incubaron en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono durante aproximadamente 16 a 18 horas. El medio de transfección se reemplazó con medio de cultivo recién preparado y se incubaron las células en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono. Luego de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó con medio de cultivo recién preparado que contenía el antibiótico G418 a 1 mg/mL en el medio de cultivo (medio de selección) y las células se incubaron durante 7 días. El medio de selección se cambió cada semana por un total de 4 semanas (alrededor del 90% de las células murieron y se retiraron durante los cambios semanales de medio).

Las líneas celulares candidatas transfectadas con el receptor ORL-1 incluían las líneas celulares SiMa >P30, ND15, ND7, NG108-T15 y SK-N-DZ. Las líneas celulares candidatas transfectadas con el receptor KOR-1 incluían las líneas celulares SiMa, SiMa >P30, ND15, ND7, NG108-T15 y SK-N-DZ. Las células NG108-T15 transfectadas no sobrevivieron a la selección en G418.

2. Análisis de dosis única y respuesta a la dosis de líneas celulares transfectadas estables usando moléculas de endopeptidasa redirigida

Las células de las líneas celulares candidatas transfectadas y seleccionadas de la sección anterior se colocaron en placas recubiertas con colágeno IV o poli-D-lisina de 96 pocillos a $1x10^5$ células/pocillo en medio RPMI1640 que contiene complementos N2 y B27 y NFG (50-100 ng/ml) durante 20 ±4 horas antes del tratamiento del compuesto. Luego las células transfectadas de forma estable con el receptor ORL-1 se trataron con endopeptidasa redirigida Noc/A a 30 nM en el mismo medio durante 24 ±2 horas, con la excepción de que la línea celular SK-N-DZ se trató a 10 nM. Las células se lisaron en amortiguador de lisis de 120 µL y 20 µL del lisado se mezcló con el amortiguador 2x SDS para el

ensayo de transferencia Western que se llevó a cabo como se detalla en el Ejemplo I. Todas las líneas celulares mostraron una absorción aumentada del compuesto Noc/A redirigido cuando se transfectaron con el receptor ORL-1 (Tabla 7).

Tabla 7. Líneas celulares transfectadas de forma estable con ORL-1 analizadas con la endopeptidasa redirigida Noc/A

Línea celular	Descripción	% de SNAP25 escindida a 30 nM	
		No transfectadas	transfectadas
AGN P33	Neuroblastoma humano	20%	40%
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	25% a 10 nM	40% a 10 nM
ND7	neuroblastoma de ratón e híbrido de células DRG de rata	10%	42%
ND15	neuroblastoma de ratón e híbrido de células DRG de rata	8%	20%

NG108-T15	Neuroblastoma de ratón/híbrido de glioma de rata	No sobrevivió ninguna célula	No sobrevivió ninguna célula

Las células de las líneas celulares candidatas transfectadas y seleccionadas de la sección anterior se colocaron en placas recubiertas con colágeno IV o poli-D-lisina de 96 pocillos a $1x10^5$ células/pocillo en medio RPMI1640 que contiene 10% de FBS y complementos N2 y B27 y durante 20 ±4 horas antes del tratamiento del compuesto. Las células se transfectaron de forma estable con el receptor KOR-1, se trataron con endopeptidasa redirigida Dyn/A a 100 nM en el mismo medio durante 24±2 horas. Las células se lisaron en amortiguador de lisis de 120 µL y 20 µL del lisado se mezcló con el amortiguador 2x SDS para el ensayo de transferencia Western que se llevó a cabo como se detalla en el Ejemplo I. Todas las líneas celulares mostraron una absorción aumentada del compuesto Dyn/A redirigido cuando se transfectaron con el receptor KOR-1 humano.

3. Selección de líneas celulares clonales transfectadas de forma estable que presentan alta sensibilidad por dilución en serie

El siguiente ejemplo demuestra cómo identificar células clonales de una línea celular establecida transfectada de forma estable que son susceptibles a acción de endopeptidasa redirigida o que tienen capacidad de absorción de endopeptidasa redirigida.

Para la clonación de células simples de las células seleccionadas descritas anteriormente, se empleó el método de clonación de línea celular de dilución limitada. Las células se trispinizaron, contaron, diluyeron para lograr 0.5-1 de células por 100 µL y se colocaron sobre el medio de selección en cinco placas recubiertas de poli-D-lisina de 96 pocillos a 100 µL por pocillo. Las células se incubaron durante más de 2 semanas hasta que se formaran colonias en el fondo del pocillo. Se marcaron las colonias positivas que se originaron de células simples. Se tomaron fotos de clones derivados de células simples usando una cámara de microscopio. Las células de los pocillos con clones simples se cultivaron por otra semana más y se transfirieron a placas de 24 pocillos alrededor de 4 semanas luego de que había comenzado la clonación.

Para la selección de clones, el parámetro principal utilizado para analizar clones positivos fue la mayor cantidad de escisión de SNAP-25 obtenida luego del tratamiento de Noc/A

o Dyn/A medido usando análisis de transferencia Western con el anticuerpo que reconoce SNAP-25 intacta o escindida. Los clones que sobreexpresaban ORL-1 se analizaron con 10 nM y 30 nM de endopeptidasa redirigida Noc/A durante la noche apenas hubo suficientes células disponibles (Tabla 8). Los clones que sobreexpresan KOR-1 se analizaron con 100 nM de endopeptidasa redirigida Dyn/A durante la noche (Tabla 9). Además, los clones que sobreexpresaban KOR-1 se analizaron en el ensayo de unión de dinorfina según se describe en el Ejemplo I.

Tabla 8. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con ORL-1 usando endopeptidasa redirigida Noc/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 10 nM de Noc/A	Absorción de 30 nM de Noc/A	Segundo análisis a 1 nM (% escindido)
AGN P33	1	+	+	28%
AGN P33	2	++	+++	50%
AGN P33	3	-	+	NT
AGN P33	4	ND	ND	NT
AGN P33	5	-	+	31%
AGN P33	6	++	+++	60%

Tabla 8. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con ORL-1 usando endopeptidasa redirigida Noc/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 10 nM de Noc/A	Absorción de 30 nM de Noc/A	Segundo análisis a 1 nM (% escindido)
AGN P33	7	+	+	14%
AGN P33	8	+	+	NT
AGN P33	9	+	+	38%
AGN P33	10	+	++	29%
AGN P33	11	+	+	NT
AGN P33	12	+	+	27%
ND7	1C11	NT	++	NT
ND7	2F3	NT	-	NT
ND7	1D10	NT	-	NT
ND7	1F9	NT	-	NT
ND7	1G10	NT	-	NT
ND7	2D8	NT	-	NT
ND7	2E2	NT	-	NT
ND7	4B7	NT	+++	NT
ND7	3C11	NT	-	NT

Tabla 8. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con ORL-1 usando endopeptidasa redirigida Noc/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 10 nM de Noc/A	Absorción de 30 nM de Noc/A	Segundo análisis a 1 nM (% escindido)
ND7	3C3	NT	+	NT
ND7	3E8	NT	–	NT
ND7	3E11	NT	–	NT
ND7	2G3	NT	-	NT
ND7	4D5	NT	+	NT
ND7	4D8	NT	+	NT
ND7	4C8	NT	–	NT
ND7	4C9	NT	+++	NT
ND7	4E8	NT	+	NT
ND7	2E6	NT	++	NT
ND7	4F4	NT	+++	NT
ND7	5D6	NT	–	NT
ND7	5G3	NT	–	NT
ND7	4D5	NT	++	NT
ND15	1C10	NT	+	NT

Tabla 8. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con ORL-1 usando endopeptidasa redirigida Noc/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 10 nM de Noc/A	Absorción de 30 nM de Noc/A	Segundo análisis a 1 nM (% escindido)
ND15	1F10	NT	++	NT
ND15	2D8	NT	++	NT
ND15	2E11	NT	-	NT
ND15	2F4	NT	++	NT
ND15	2F10	NT	++	NT
ND15	2F11	NT	-	NT
ND15	3C4	NT	+	NT
ND15	3C7	NT	++	NT
ND15	3E8	NT	+++	NT
ND15	4C8	NT	+	NT
ND15	4D8	NT	+	NT
SK-N-DZ	#2	-	-	NT
SK-N-DZ	#4	-	-	NT
SK-N-DZ	#5	+++	++	NT
SK-N-DZ	#6	NT	++	NT

Tabla 8. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con ORL-1 usando endopeptidasa redirigida Noc/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 10 nM de Noc/A	Absorción de 30 nM de Noc/A	Segundo análisis a 1 nM (% escindido)
SK-N-DZ	#7	+	NT	NT
SK-N-DZ	#8	-	NT	NT
SK-N-DZ	#9	+	NT	NT
SK-N-DZ	#10	-	NT	NT
SK-N-DZ	#11	+	+++	NT
SK-N-DZ	#12	-	NT	NT
SK-N-DZ	#14	++	NT	NT
SK-N-DZ	#16	-	NT	NT
SK-N-DZ	#17	+	+++	NT
SK-N-DZ	#19	+	+++	NT
SK-N-DZ	#20	-	NT	NT
SK-N-DZ	#23	NT	++	NT
SK-N-DZ	#25	-	NT	NT
SK-N-DZ	#26	-	++	NT
SK-N-DZ	#27	+	NT	NT

Tabla 8. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con ORL-1 usando endopeptidasa redirigida Noc/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 10 nM de Noc/A	Absorción de 30 nM de Noc/A	Segundo análisis a 1 nM (% escindido)
SK-N-DZ	#28	++	+	NT
SK-N-DZ	#30	++	NT	NT
SK-N-DZ	#31	-	NT	NT
SK-N-DZ	#32	++	++	NT
SK-N-DZ	#33	+	NT	NT
SK-N-DZ	#34	+++	ND	NT
SK-N-DZ	#35	+	++	NT
SK-N-DZ	#36	-	NT	NT
SK-N-DZ	#37	+++	++	NT
SK-N-DZ	#42	-	NT	NT
SK-N-DZ	#43	+	++	NT

ND: Sin determinar; NT: sin analizar

-: sin absorción; +: absorción mínima; ++: absorción moderada; +++: buena absorción

Tabla 9. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con KOR-1 usando endopeptidasa redirigida Dyn/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 100 nM de Dyn/A	unión de 100 nM de Dyn	selecciona da para análisis a futuro
SiMa	2	-	-	No
SiMa	6	+	+	No
SiMa	8	+	+	No
SiMa	12	+++	++	Sí
SiMa	14	++	++	No
SiMa	20	+	++	No
SiMa	25	++	++	No
AGN P33	1	+++	+	Sí
AGN P33	3	++	+	No
AGN P33	5	++	+	Sí
AGN P33	6	++	+	No
AGN P33	7	+++	+	Sí
AGN P33	8	++	+	Sí
AGN P33	9	+++	+	Sí
AGN P33	10	+++	+	Sí

Tabla 9. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con KOR-1 usando endopeptidasa redirigida Dyn/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 100 nM de Dyn/A	unión de 100 nM de Dyn	selecciona da para análisis a futuro
AGN P33	11	++	+	No
AGN P33	12	+++	+	Sí
AGN P33	14	+	+	No
AGN P33	16	++	+	No
AGN P33	17	+++	+	Sí
AGN P33	21	+	++	No
ND7	A1	+	+	No
ND7	A2	-	-	No
ND7	A3	-	-	No
ND7	A4	-	-	No
ND7	A5	-	-	No
ND7	A6	-	-	No
ND7	A7	-	-	No
ND7	A8	-	-	No
ND7	A9	-	-	No

Tabla 9. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con KOR-1 usando endopeptidasa redirigida Dyn/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 100 nM de Dyn/A	unión de 100 nM de Dyn	selecciona da para análisis a futuro
ND7	A10	-	-	No
ND7	A11	-	-	No
ND7	A12	+++	+++	Sí
ND7	B1	-	-	No
ND7	B2	-	-	No
ND7	B3	-	-	No
ND7	B4	-	-	No
ND7	B5	+	+	Sí
ND7	B6	-	-	No
ND7	B7	-	-	No
ND7	B8	-	-	No
ND7	B9	-	-	No
ND7	B10	-	-	No
ND7	B11	-	-	No
ND7	B12	-	-	No

Tabla 9. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con KOR-1 usando endopeptidasa redirigida Dyn/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 100 nM de Dyn/A	unión de 100 nM de Dyn	selecciona da para análisis a futuro
ND7	C1	-	-	No
ND7	C2	-	-	No
ND7	C3	-	-	No
ND7	C4	-	-	No
ND7	C5	-	-	No
ND7	C6	+	+	No
ND7	C7	-	-	No
ND7	C8	-	-	No
ND7	C9	-	-	No
ND7	C10	-	-	No
ND7	C11	-	-	No
ND7	C12	-	-	No
ND7	D1	-	-	No
ND7	D2	-	-	No
ND7	D3	-	-	No

Tabla 9. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con KOR-1 usando endopeptidasa redirigida Dyn/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 100 nM de Dyn/A	unión de 100 nM de Dyn	selecciona da para análisis a futuro
ND7	D4	-	-	No
ND7	D5	-	-	No
ND7	D6	++	++	Sí
ND7	D7	++	++	Sí
ND7	D8	-	-	No
ND7	D9	-	-	No
ND7	D10	-	-	No
ND7	D11	-	-	No
ND7	D12	-	-	No
ND7	E1	-	-	No
ND7	E2	-	-	No
ND7	E3	-	-	No
ND7	E4	-	-	No
ND7	E5	-	-	No
ND7	E6	-	-	No

Tabla 9. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con KOR-1 usando endopeptidasa redirigida Dyn/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 100 nM de Dyn/A	unión de 100 nM de Dyn	selecciona da para análisis a futuro
ND7	E7	-	-	No
ND7	E8	-	-	No
ND7	E9	-	-	No
ND7	E10	-	-	No
ND7	E11	-	-	No
ND7	E12	++	++	Sí
ND7	F1	-	-	No
ND7	F2	-	-	No
ND7	F3	-	-	No
ND7	F4	-	-	No
ND15	A1	-	-	No
ND15	A2	-	-	No
ND15	A3	+	-	No
ND15	A4	+	-	No
ND15	A5	-	-	No

Tabla 9. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con KOR-1 usando endopeptidasa redirigida Dyn/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 100 nM de Dyn/A	unión de 100 nM de Dyn	selecciona da para análisis a futuro
ND15	A6	++	-	No
ND15	A7	++	-	No
ND15	A8	++	-	No
ND15	A9	+	-	No
ND15	A10	+	-	No
ND15	A11	-	-	No
ND15	A12	-	-	No
ND15	B1	-	-	No
ND15	B2	++	-	No
ND15	B3	-	-	No
ND15	B4	-	-	No
ND15	B5	+++	-	Sí
ND15	B6	+	-	No
ND15	B7	-	-	No
ND15	B8	-	-	No

Tabla 9. Análisis de dosis única de líneas celulares clonales candidatas transfectadas de forma estable con KOR-1 usando endopeptidasa redirigida Dyn/A

Línea celular	Número de clon	Absorción de 100 nM de Dyn/A	unión de 100 nM de Dyn	selecciona da para análisis a futuro
ND15	B9	-	-	No
ND15	B10	-	-	No
ND15	B11	-	-	No
ND15	B12	-	-	No
ND15	C1	-	-	No
ND15	C2	+++	+	Sí
ND15	C3	-	-	No
ND15	C4	-	-	No
ND15	C5	+	NT	No
ND15	C6	+++	NT	Sí
SK-N-DZ	#11	NT	NT	ND

ND: Sin determinar; NT: sin analizar

-: sin absorción; +: absorción mínima; ++: absorción moderada; +++: buena absorción

4. Análisis de respuesta a la dosis de líneas celulares clonales transfectadas usando endopeptidasa redirigida

Las líneas celulares clonales transfectadas de forma estable candidatas de la sección 3 que mostraban una buena absorción de la endopeptidasa redirigida Noc/A se analizaron en experimentos de respuesta a la dosis completa para determinar la sensibilidad y eficacia hacia la endopeptidasa redirigida Noc/A. Las células se colocaron en placas recubiertas con colágeno IV o poli-D-lisina de 96 pocillos a $1x10^5$ células/pocillo en medio RPMI1640 que contiene complementos N2 y B27 y NFG (50-100 ng/mL) durante 20 ±4 horas antes del tratamiento del compuesto. Las células de la línea celular AGN P33 original y las líneas celulares clonales ND7 se trataron con 0, 0.14 nM, 0.4 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM y 100 nM de Noc/A en el mismo medio durante 24 horas más 24 horas de incubación en un medio libre de endopeptidasa redirigida para permitir la escisión de la SNAP-25. Las células de la línea celular AGN P33 original también se trataron con 0, 0.03 nM, 0.08 nM, 0.24 nM, 0.74 nM, 2.22 nM, 6.67 nM y 20 nM de Noc/A en el mismo medio durante 24 horas más 24 horas de incubación en un medio libre de endopeptidasa redirigida para permitir la escisión de la SNAP-25. El medio se retiró y las células se lavaron y lisaron para el ensayo ELISA tipo sándwich ECL según se detalla en el Ejemplo II. Los

datos de las líneas celulares clonales y AGN P33 original transfectadas de forma estable con el receptor ORL-1 se resumen en la Tabla 10. Los clones #2 y #6 demostraron una mejor sensibilidad y eficacia hacia la endopeptidasa redirigida Noc/A que la línea celular original. Además, la sensibilidad aumentada de las nuevas líneas celulares clonales permitió el uso de menores concentraciones para que la dosis-respuesta confirmara que las nuevas líneas celulares clonales son más sensibles.

Tabla 10. Tabla de resumen de proporciones de señal a ruido (S/N) y valores de EC_{50} de los tres clones más sensibles que sobreexpresan ORL-1 en la línea celular de referencia AGN P33.

	Original	Clon 2	Clon 6	Clon 8
Proporción S/N de 0.03 nM/BK		41	26	1.8
Proporción S/N de 20 nM/BK		259	522	33.1
Proporción S/N de 0.14 nM/BK				
Proporción S/N de 100 nM/BK				
EC_{50} (nM)	6.8 ± 1.1	0.6 ± 0.1	0.7± 0.07	0.3 ± 0.2

Los datos de las líneas celulares clonales y ND7 original transfectadas de forma estable con el receptor ORL-1 se resumen en la Tabla 11. Todos los clones analizados demostraron una mejor sensibilidad y eficacia hacia la endopeptidasa redirigida Noc/A que la línea celular original ND7. Los clones 4B7, 1E6 y 1C11 eran los más sensibles con valores de EC_{50} menores a 10 pM.

Tabla 11. Tabla de resumen de proporciones de señal a ruido (S/N) y valores de EC_{50} de los seis clones más sensibles que sobreexpresan ORL-1 en la línea celular de referencia ND7.

	Original	1C11	4B7	4C9	4F4	1E6	3E9
Proporción S/N de 0.14 nM/BK	1.7	9.3	11.1	5.3	3.6	5.8	5.1
Proporción S/N de 100 nM/BK	53	217	243	126	169	123	121
EC_{50} (nM)	>50	8.6 ± 2	5.7 ± 0.5	33 ± 11	24 ± 5	6.7 ± 1	>30 nM

La Tabla 12 resume los resultados obtenidos con la generación y análisis de las líneas celulares clonales que sobreexpresan el receptor ORL-1 en diferentes referencias celulares.

Tabla 12: Resumen de líneas celulares clonales que sobreexpresan el receptor ORL-1 humano analizado con Noc/A

línea celular de referencia	especie	líneas celulares estables analizadas con una dosis completa de Noc/A	EC_{50} (nM)
AGN P33	Neuroblastoma humano	tres	0.6-2.5
ND7	Neuroblastoma de rata e híbrido DRG	seis	3.7-8
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	ninguna (siete clones estables seleccionados para estudios adicionales)	N/A

Ejemplo V

Desarrollo de líneas celulares clonales de una línea celular SK-N-DZ original

El siguiente ejemplo demuestra cómo identificar células clonales de una línea celular establecida original que son susceptibles a inhibición de endopeptidasa redirigida de

exocitosis o que tienen capacidad de absorción de endopeptidasa redirigida.

1. Aislamiento de líneas celulares clonales.

Durante la caracterización de la línea celular SK-N-DZ, se descubrió que las células que comprenden esta línea celular establecida comprenden al menos cinco fenotipos celulares diferentes. Para determinar si alguno de estos tipos celulares fenotípicamente diferentes era responsable de la susceptibilidad de esta línea celular a la inhibición de endopeptidasa redirigida de exocitosis, se realizaron dos análisis diferentes de dilución limitada para obtener aislados de colonia simple para cada tipo celular fenotípicamente diferente.

Una densidad adecuada de células de una solución madre SK-N-DZ se cultivaron en DMEM, 10% de suero bovino fetal (inactivado por calor), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sodio, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, contenida en un matraz recubierto por colágeno IV T175. Luego del segundo pasaje, las células se trataron con tripsina para producir una suspensión celular y se determinó la concentración celular. Alrededor de 4.0×10^6 células de esta suspensión celular se

transfirieron a un tubo de 50 mL y las células se disociaron en células simples por expulsión vigorosa repetida a través de una aguja de 18.5 de ancho usando una jeringa de 10 mL. Luego se diluyeron las células de esta suspensión desasociada de una célula a una concentración de 0.2 x 10^6 células/mL agregando 15 mL de medio de cultivo recién preparado y se agregaron 2.5 µL de esta dilución a 50 mL de medio de cultivo recién preparado para obtener una concentración de 10 células/mL. A partir de esta solución madre de dilución final, se agregaron 100 µL de medio de cultivo a cada pocillo de placas cubiertas con colágeno IV de 96 pocillos y las células se cultivaron de forma ininterrumpida en un incubador a 37°C en 5% de dióxido de carbono durante cuatro semanas. Se colocaron cuatro placas de 96 pocillos para ser analizadas. Luego de cuatro semanas, cada pocillo se examinó microscópicamente para identificar colonias simples en crecimiento y para cada colonia identificada, se agregaron 100 µL de medio de cultivo recién preparado a cada pocillo y las células se cultivaron ininterrumpidamente en un incubador a 37°C en 5% de dióxido de carbono durante dos semanas. Luego de dos semanas más de crecimiento, las colonias en crecimiento simples se trataron con tripsina y se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos para que siguiera creciendo. Una vez que las colonias crecieron hasta alrededor de 1,000 células, con base en la inspección visual, las células se trataron con tripsina y cada

suspensión celular se transfirió a un nuevo pocillo de una placa recubierta con colágeno IV de 24 pocillos. Las células se cultivaron en un incubador a 37°C en 5% de dióxido de carbono con medio de cultivo recién preparado que se rellenó cada 2 a 3 días, en caso de ser necesario. Las células se cultivaron hasta que el cultivo alcanzó aproximadamente 60% de confluencia o más, momento en el cual las células se trataron con tripsina y cada suspensión celular se transfirió a un matraz recubierto con Colágeno IV de 25 cm^2 con base en la confluencia de las células en la placa de 24 pocillos. Las células se cultivaron en un incubador a 37°C en 5% de dióxido de carbono con medio de cultivo recién preparado que se rellenó cada 2 a 3 días, en caso de ser necesario. Una vez que las células en el matraz alcanzaron 70 a 80% de confluencia, se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta que las líneas celulares clonales se probaron para determinar su susceptibilidad a la inhibición de Noc/A de exocitosis. De las 384 colonias aisladas inicialmente colocadas para ambos análisis, se seleccionaron 24 líneas celulares clonales con base en criterios de viabilidad y crecimiento y se expandieron para llevar adelante procedimientos de análisis posteriores. De esas, se identificaron 12 líneas celulares de crecimiento rápido.

2. Análisis primario para la susceptibilidad a la actividad de endopeptidasa redirigida de células de una línea celular clonal usando endopeptidasa redirigida.

Para determinar si las células de una línea celular clonal eran susceptibles a la actividad de Noc/A de endopeptidasa redirigida, se realizó un análisis primario usando un método basado en inmunoensayos para determinar la actividad de endopeptidasa.

Trece clones de SK-N-DZ (#3, #4, #5, #8, #9, #10, #13, #15, #16, #17, #18, #22 y #23) más células originales de SK-N-DZ se colocaron en una placa de 96 pocillos (número de célula desconocida por pocillo) se colocaron en una placa de 96 pocillos (número de célula desconocido por pocillo) en EMEM, 10% de FBS, 1x de B27 y 1xN2 y se incubaron durante la noche. Las células se trataron con 1 nM de Noc/A durante 24 horas. Las células se lisaron con 100 µL de amortiguador de lisis durante 20 minutos y se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos. Cincuenta microlitros de 2x de SDS de amortiguador de muestra se agregaron a 50 µL de lisado celular y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Se cargaron diez microlitros de muestra de proteína por vía en 12% de geles NuPage y se realizó un ensayo de transferencia Western como se describió en el Ejemplo I. Evaluación de la SNAP-25 total y la SNAP-25

SDS

escindida demostró que los clones #3, #8, #15 y #22 eran al menos tan buenos como células originales para la absorción de Noc/A. El tratamiento y análisis de respuesta a la dosis completa con el ensayo ELISA tipo sándwich ECL se realizó luego de que las células se aumentaron.

3. Análisis secundaria de respuesta de líneas celulares clonales usando molécula de endopeptidasa redirigida.

Para determinar si las células de una línea celular clonal eran susceptibles a la actividad de Noc/A de endopeptidasa redirigida, se realizó un análisis secundario usando un método basado en inmunoensayos para determinar la actividad de endopeptidasa.

Para comparar adicionalmente estas líneas celulares de SK-N-DZ clonado, se realizó el ensayo ELISA tipo sándwich ECL. Cinco clones (#3, #9, #15, #16, #22) más células originales SK-N-DZ se colocaron en una placa recubierta con poli-D-lisina de 96 pocillos por línea celular a 25,000 células por pocillo en RPMI 1640, 10% de FBS, 1x de B27 y 1x de medio N2 (sin NGF) durante el fin de semana. Las células se trataron con Noc/A en dosis desde 0 a 20 nM (0, 0.03, 0.08, 0.24, 0.74, 2.22, 6.67, 20 nM) durante 24 horas. La $SNAP\text{-}25_{197}$ escindida se cuantificó con un ensayo ELISA ECL como se detalla en el Ejemplo I.

La tabla 13 muestra los valores de EC_{50} y la señal a ruido para los cinco clones y su línea celular original. Tres clones llamados #3, #9 y #15 generaron valores de EC_{50} menores (< 1 nM) y los clones #16 y #22 generaron valores de EC_{50} similares en comparación con la línea celular original (~ 2 nM). Sin embargo, las señales totales de la SNAP25 escindida fueron mayores en los clones #3, #22 y las células originales. Los clones #9, #16 y #15 tenían señales totales menores en comparación con el resto de las líneas celulares.

Tabla 13. Tabla de resumen de proporciones de señal a ruido (S/N) y valores de EC_{50} de los cinco clones obtenidos de células SK-N-DZ por clonación de dilución limitada.

	Original	3	9	19	16	22
Proporción S/N de 0.03 nM/BK	2	3	2	2	2	3
Proporción S/N de 20 nM/BK	19	27	12	8	14	20
EC_{50} (nM)	2.6 ± 1.5	0.8 ± 0.07	0.7 ±0.04	0.6 ± 0.1	2.2 ± 0.8	1.9 ± 0.6

Las condiciones para el tratamiento de Noc/A en clones SK-N-DZ se optimizaron y se ejecutó un ensayo que comparaba

los clones #3, #15 y #22 y la línea celular SK-N-DZ heterogénea original. La Tabla 14 muestra el resultado de la comparación y demostró que la optimización del ensayo mejoró en gran medida la señal a ruido para el ensayo. Se seleccionaron los clones #3 y #22 para el desarrollo de ensayo adicional porque poseían una excelente sensibilidad y eficacia.

Tabla 14. Tabla de resumen de proporciones de señal a ruido (S/N) y valores de EC_{50} de los tres clones obtenidos de células SK-N-DZ usando condiciones optimizadas.

	Original	3	15	22
Proporción S/N 0.03 nM/BK	15	8	5	10
Proporción S/N 20 nM/BK	107	89	33	60
EC_{50} (nM)	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.09

Ejemplo V

Caracterización y comparación de líneas celulares clonales para la absorción de endopeptidasa redirigida

El siguiente ejemplo ilustra cómo caracterizar y comparar líneas celulares clonales originadas a partir de una

línea celular establecida que comprende una población heterogénea o por transfección del receptor diana y la posterior clonación de la línea celular.

Para evaluar la especificidad o selectividad de la absorción de endopeptidasa redirigida, se realizaron ensayos de absorción no específica usando una endopeptidasa redirigida que carece del dominio de direccionamiento. Para la endopeptidasa redirigida desde opioides, las células de la línea celular #6 del clon AGN P33 (que comprende células transformadas de forma estable con una construcción de expresión que codifican un receptor de ORL-1) y las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 Y #22 (que comprenden células que expresan el receptor ORL-1 endógeno) se sembraron a 150,000 células por pocillo en una placa recubierta con poli-D-lisina de 96 pocillos en medio libre de suero RPMI 1640 que contiene complementos N2 y B27 y NGF (50 ng/mL) y se incubó durante 20 ±4 horas a 37°C en un incubador en 5% de CO_2 antes del tratamiento del compuesto. Las células se trataron con 8 dosis de Noc/A que varían desde 0-20 nM o 0-40 nM y/o ocho dosis de LH_N/A que varían desde 0 a 400 nM o de 0 a 40 nM en el mismo medio durante 22 horas. Se retiró el medio y las células se lavaron, lisaron y centrifugaron para eliminar los residuos para prepararse para un ensayo ELISA tipo sándwich. Una placa de ELISA recubierta con anticuerpo monoclonal 2E2A6

se bloqueó con 150 µL de amortiguador de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de que se retiró el amortiguador de bloqueo, se agregaron 30 µL de lisados celulares a cada pocillo y la placa se incubó a 4°C durante 2 horas. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se agregaron 30 µL de anticuerpos policlonales de detección α-SNAP25 etiquetados con NHS-Éster SULFO-TAG a 5 µg/mL en 2% de reactivo de bloqueo en PBS-T en la esquina inferior de los pocillos. Las placas se sellaron y agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido por tres lavados con PBS-T. Luego de que se completaron los lavados, se agregaron 150 µL de amortiguador Read 1x por pocillo y la placa se leyó en un lector de imágenes SI6000. Los resultados que comparaban la absorción de Noc/A con respecto al LH_N/A de control negativo se muestran en la Tabla 15 y la Tabla 16. Estos resultados indican que había buena separación entre la separación de Noc/A y LH_N/A en ambas líneas celulares lo que demuestra absorción específica de Noc/A.

Tabla 15. Absorción no específica para el clon SK-N-DZ #3. Resumen de cuatro experimentos independientes

nM	% de absorción no específica	SEM (error estándar de la media)
0	2	0.5

Tabla 15. Absorción no específica para el clon SK-N-DZ #3. Resumen de cuatro experimentos independientes

nM	% de absorción no específica	SEM (error estándar de la media)
1	6	0.5
2	8	0.5
5	10	1
15	19	0.9
44	33	1.5
133	65	2.4
400	93	2.3

Tabla 16. Absorción no específica para células hORL-1 #6. Resumen de tres experimentos independientes

nM	% de absorción no específica	SEM (error estándar de la media)
0	1	0.2
1	2	0.2
2	3	0.6
5	3	0.3

Tabla 16. Absorción no específica para células hORL-1 #6. Resumen de tres experimentos independientes

nM	% de absorción no específica	SEM (error estándar de la media)
15	8	1.3
44	12	1.9
133	22	3.0
400	32	3.0

La Tabla 17 resume los resultados para la caracterización y comparación de las tres líneas celulares. Las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #22 poseen una sensibilidad idéntica al eDRG primario y una excelente señal a ruido para desarrollar un ensayo sólido para la endopeptidasa redirigida Noc/A. La línea celular clonal AGN P33 #6 también es un excelente candidato con absorción no específica baja y sensibilidad adecuada.

Tabla 17.

Parámetro	clon 3 de SK-N-DZ	clon 22 de SK-N-DZ	clon 6 de AGN P33	eDRG
Especies de línea celular	clonal humana	clonal humana	clonal humana	primario de rata
expresión del receptor celular	ORL1 endógeno humano	ORL1 endógeno humano	ORL1 transfectado humano	ORL1 endógeno de rata
intervalo dinámico	respuesta a la dosis de 0.03 a 20 nM	respuesta a la dosis de 0.03 a 20 nM	respuesta a la dosis de 0.04 a 40 nM	respuesta a la dosis de 0.17 a 20 nM
Sensibilidad (EC_{50})	EC_{50} = 0.75±0.1 (N=10)	EC_{50} = 0.8±0.2 (N=9)	EC_{50} = 2.4 ± 0.2 (N=21)	EC_{50} = 0.8 ± 0.15 (N=6)
ULOQ	20 nM	20 nM	20 nM	10-20 nM
S/N ULOQ/ referencia	98 ± 15 (N=10)	86 ± 17 (N=9)	385 ± 32 (N=19)	~300
S/N LLOQ/ referencia	12 ± 2 (N=11)	10 ± 2 (N=9)	29 ± 7 (N=18)	N/A
Especificidad vs LH_N/A	≥ 2 logs (N=4)	≥ 2 logs (N=4)	≥ 2 logs (N=3)	N/A
Expresión de SNAP-25	endógeno	endógeno	endógeno	endógeno

competición con var. de nociceptina	competición completa (n=4)	competición completa (n=4)	competición completa (n=4)	N/A
inhibición por anticuerpo anti nociceptina	competición completa (n=4)	competición completa (n=4)	competición completa (n=4)	N/A
inhibición por anticuerpo anti-868	competición parcial (N=3)	competición parcial (N=3)	competición parcial (N=3)	N/A

Para evaluar la sensibilidad de absorción de endopeptidasa redirigida, se realizaron ensayos de unión de saturación de ligando. La interacción de la mayoría de los ligandos con sus sitios de unión se puede caracterizar en términos de afinidad de unión (NIH Assay Guidance). En general, la unión de alta afinidad implica un tiempo de residencia mayor para el ligando en su sitio de unión al receptor que en el caso de unión de baja afinidad. La constante de disociación se usa comúnmente para describir la afinidad entre un ligando (L) (tal como un fármaco) y una proteína (P) es decir, cuán fuerte se ajusta un ligando a una proteína particular. Un experimento de unión de saturación de equilibrio mide la unión total y no específica (NSB) en diversas concentraciones de radioligandos. La constante de

disociación de equilibrio (K_d) o la afinidad para el radioligando, K_d y el número máximo de sitios de unión al receptor, Bmáx, se pueden calcular a partir de la unión específica (total - NSB) usando análisis de regresión no lineal. El K_d para la unión específica se puede calcular usando un análisis de regresión no lineal de hipérbola de unión en un sitio (es decir, GraphPad Prism) como se muestra en la ecuación a continuación, donde Bmáx es el número máximo de sitios de unión (pmol/mg o pmol/células o sitios/células) y K_d (nM, pM, etc.) es la concentración de radioligando necesaria para alcanzar la unión media-máxima:

$$\text{Unido} = \frac{B_{max} \times [L]}{[L] + K_d}$$

Para la endopeptidasa redirigida opioide, las células de la línea celular #6 del clon AGN P33 (que comprende células transformadas de forma estable con una construcción de expresión que codifican un receptor de ORL-1), la línea celular original SK-N-DZ y las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3, #15 y #22 (que comprenden células que expresan el receptor endógeno ORL-1) se sembraron a 200,000 células por pocillo en una placa recubierta con poli-D-lisina de 48 pocillos en medio libre de suero RPMI 1640 que contiene complementos 1x de N2 y 1x de B27 y se incubó durante la noche

a 37°C en un incubador en 5% de CO_2. El medio se retiró y las células y 150 µL de amortiguador de unión Tris se agregaron a los pocillos usados para evaluar la unión total y 100 µL de amortiguador de unión Tris se agregó a un pocillo usado para evaluar la unión no específica. Alrededor de 50 µL de 4x de concentración final de nociceptina fría (2.5 µM a líneas celulares SK-N-DZ y 1 µM a la línea celular clonal AGN P33 #6) se agregó a los pocillos de unión no específicos y 50 µL de 4x de concentraciones finales de ^{3}H-nociceptina (0 nM, 0.05 nM, 0.1 nM, 0.2 nM, 0.4 nM, 0.8 nM, 1.6 nM, 3.1 nM, 6.3 nM, 12.5 nM, 25 nM y 50 nM a las líneas celulares SK-N-DZ y 0, 0.01 nM, 0.02 nM, 0.039 nM, 0.078 nM, 0.156 nM, 0.313 nM, 0.625 nM, 1.25 nM, 2.5 nM, 5.0 nM y 10 nM a la línea celular clonal AGN P33 #6) se agregó a los pocillos de unión total y a los pocillos de unión no específica a un volumen final de 200 µL. Luego de la incubación a 37°C durante 30 minutos, los pocillos se lavaron dos veces en 0.5 mL de amortiguador de lavado frío. Luego las células se desnaturalizaron en 200 µL de NaOH 2N y se transfirieron a frascos de centelleo de 20 mL que contenían 5 mL de fluido de centelleo. Los datos sin procesar se usaron para realizar las gráficas de dosis-respuesta y calcular el K_d para cada muestra. Los datos sin procesar obtenidos se transfirieron a SigmaPlot v10.0 y se usó un ajuste One Site Saturation [saturación de un sitio] para definir las curvas de dosis-respuesta en la categoría de ecuación de unión al

ligando. Se generaron los informes gráficos y contuvieron los siguientes parámetros: R^2 (coeficiente de correlación), B*máx* y K_d ± SE (Coeficiente ± error estándar). Las gráficas de la unión total, unión específica y unión no específica se obtuvieron en el ensayo realizado en las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3, #15 y #22 y células de la línea celular clonal AGN P33 #6. Las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #22 produjeron una unión dependiente de la concentración y saturable de ^{3}H-nociceptina. En las mismas condiciones experimentales, la línea celular clonal SK-N-DZ #15 produjo una respuesta dependiente de la dosis de ^{3}H-nociceptina pero no saturada a la dosis máxima de 50 nM. En comparación con las líneas celulares SK-N-DZ que expresan ORL-1 endógeno, las células de la línea celular clonal AGN P33 #6 tenían unión de afinidad significativamente mayor a nociceptina ^{3}H (la dosis máxima era de 10 nM contra 50nM en SK-N-DZ) con una baja unión que no era de especificidad.

Las curvas de unión de saturación de las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3, #22, #15 y la línea celular clonal AGN P33 #6 se usaron para calcular los valores K_d y B*máx* de tres experimentos de unión independientes por línea celular realizados en tres días diferentes. El orden de rango de estas cuatro líneas celulares es: Línea celular clonal AGN P33 #6 (K_d=1.86 nM y B*máx*=2.9 fmol/célula) > línea celular

clonal SK-N-DZ #3 (K_d=14 nM y B*máx*=0.6 fmol/célula) ≥ línea celular clonal SK-N-DZ #22 (K_d=17 nM y B*máx*=0.6 fmol/célula) >> línea celular clonal SK-N-DZ #15 (K_d>50 nM). Para obtener una dosis-respuesta saturada para la línea celular clonal SK-N-DZ #15 se debe usar un intervalo mayor de dosis de ^{3}H-nociceptina. La Tabla 16 resume los datos con respecto a la caracterización de los sitios de unión a la nociceptina de membrana plasmática específicos en tres líneas celulares clonales SK-N-DZ 3, #15 y #22 y líneas celulares estables de la línea celular clonal AGN P33 #3. Los datos mostraron lo siguiente: 1) un sitio de alta afinidad con unión no específica muy baja (K_d, 1.8 nM y B*máx* 2.9 fmol por célula) en la línea celular clonal AGN P33 #6; 2) la unión a nociceptina se puede realizar en células naturales SK-N-DZ que expresan el receptor endógeno; 3) la línea celular clonal AGN P33 #6 tenía alrededor de 10 veces más afinidad a la nociceptina que las líneas celulares SK-N-DZ; 4) como se ve en el ensayo de potencia basado en células, las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #22 (K_d 14-17 nM, B*máx* 0.6 fmol por célula) tenían más sitios de receptor por célula que la línea celular clonal SK-N-DZ #15 (no saturable en el mismo intervalo de dosis).

Tabla 18. Resumen del ensayo de unión de saturación de ^{3}H-nociceptina a cuatro líneas celulares principales (n=3 experimentos independientes)

Líneas celulares	K_d (nM±SD)	*Bmáx* (fmol/célula)
SK-N-DZ #3	14 ± 1.6	0.59
SK-N-DZ #15	>50	ND
SK-N-DZ #22	16.7 ± 1.1	0.58
línea celular clonal AGN P33 #6	1.86 ± 0.1	2.89

Para evaluar la sensibilidad de la absorción de endopeptidasa redirigida, se evaluó la cantidad de receptor de endopepetidasa redirigida expresado en el nivel de ARNm usando RT-PCR. La cantidad de receptor expresado en las células es un aspecto importante de la caracterización de la línea celular utilizada para en análisis y se relaciona con la sensibilidad a endopeptidasas redirigidas. La cantidad de receptor de endopeptidasa redirigida también puede ser una herramienta para analizar otras posibles líneas celulares y para eliminar líneas celulares que no expresan el receptor diana. Un método para medir la expresión del receptor es cuantificar la cantidad de ARNm del receptor de endopeptidasa redirigida usando PCR en tiempo real (RT-PCR).

Para la endopeptidasa redirigida desde opioides, se aisló ARN de células de una línea celular SiMa original no transfectada, células de la línea celular clonal AGN P33 #6, células de la línea celular SK-N-DZ original y células de las líneas celulares clonales SK-N-DZ #3 y #2 cultivadas en medio libre de suero o medio con suero. El ARNm se convirtió en ADNc y el ORL-1 se amplificó y midió en tiempo real para determinar la cantidad relativa presente en cada línea celular usando los siguientes cebadores de oligonucleótidos para ORL-1: 5'-CACTCGGCTGGTGCTGGTGG-3' directo (SEQ ID NO: 148) y 5'-AATGGCCACGGCAGTCTCGC-3' inverso(SEQ ID NO: 149). El ADN se cuantifica usando SYBR® verde que fluoresce con relación a la cantidad de ADN de doble cadena (producto de la PCR) presente en la reacción. La gráfica de la cantidad de fluorescencia contra la cantidad de ciclos proporciona una curva de logística para cada reacción. Cuanto más rápido una reacción alcanza la fase lineal de la curva, más ADNc del receptor ORL-1 se encuentra presente en la reacción. Se utilizó una reacción en RT de referencia sin enzimas agregadas para determinar si había contaminación. Dado que no hay enzimas en RT presentes en esta reacción, no se produce ADNc. No se puede producir un producto de PCR usando una plantilla de ARN, por lo que si aparece una curva de PCR en la reacción en RT, la única posibilidad es la contaminación con ADN genómico. En las reacciones en RT, no aparecen gráficas de PCR, lo que confirma

que había una contaminación con ADN genómico mínima (no se muestran los datos). La Tabla 18 lista las líneas celulares con su valor de CT. La CT es la cantidad de ciclos de PCR que se necesitaron para que esa reacción PCR correspondiente produjera una señal por encima de un umbral establecido. La cantidad de ARNm del receptor ORL-1 en una línea celular se puede comparar con otra observando sus valores de CT correspondientes. De acuerdo con los valores de CT, las células de la línea celular clonal AGN P33 #6 tenía mucho más ARNm de ORL-1 que las células de la línea celular SiMa original en medio libre de suero (CT promedio: 28.6 contra 17.3) y en medio con suero (CT promedio: 26.1 contra 16.5). Asimismo, parece haber una diferencia mínima en el ARNm obtenido de las células en el pasaje 6 contra el pasaje 16 en la línea celular clonal AGN P33 #6. Además, hay diferencias mínimas en los valores de CT y las gráficas en la línea celular SK-N-DZ contra la línea celular clonal #3 y #22. Esta conclusión es cierta en células cultivadas en medio con suero y medio libre de suero y refleja la similitud de estas líneas celulares observada en el ensayo de potencia basado en células para el Noc/A.

Tabla 19. Valores de CT promedio para la expresión de ORL-1 en líneas celulares

Medio	Línea celular	CT promedio
Medio libre de suero	p26 original SiMa	28.6
	clon de SiMa hORL-1 #6 p6	17.3
	clon de SiMa hORL-1 #6 p16	17.3
Medio completo	p26 original SiMa	26.1
	clon de SiMa hORL-1 #6 p6	16.4
	clon de SiMa hORL-1 #6 p16	16.6
Medio libre de suero	SK-N-DZ	26.3
	clon SK-N-DZ #3	25.9
	clon SK-N-DZ #22	26.6
Medio completo	SK-N-DZ	26.2
	clon SK-N-DZ #3	25.8
	clon SK-N-DZ #22	26.4

Ejemplo VII

Desarrollo de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 que unen de forma selectiva un epítopo de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

El siguiente ejemplo ilustra cómo realizar anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 que se puedan unir de forma selectiva a un epítopo de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A.

1. Generación de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25

Para desarrollar anticuerpos α-SNAP-25 monoclonales que se puedan unir de forma selectiva a una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 residuo del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, se diseñó el péptido de 13 residuos $CDSNKTRIDEANQ_{COOH}$ (SEQ ID NO: 38) como un antígeno del producto de la escisión de la SNAP-25. Este péptido comprende una región enlazadora flexible y un residuo de cisteína N-terminal para la conjugación con KLH y los aminoácidos 186-197 de la SNAP-25 humana (SEQ ID NO: 5) con una glutamina C-terminal carboxilada (SEQ ID NO: 38). La generación de anticuerpos monoclonales para secuencias peptídicas únicas bien seleccionadas proporciona un control sobre la especificidad de los epítopos, lo que permite la identificación de una subpoblación particular de proteínas entre un grupo de isoformas muy relacionadas. Las búsquedas de blastos revelaron que este péptido tenía una alta homología solamente con la SNAP-25 y casi ninguna reactividad cruzada

posible con otras proteínas en células neuronales. La secuencia también se sometió a un cuidadoso escrutinio utilizando algoritmos informáticos para determinar índices de hidropatía, probabilidad de superficie proteica, regiones de flexibilidad y estructuras secundarias favorables, seguido de la orientación adecuada y la presentación de la secuencia peptídica elegida. El péptido se sintetizó y conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH) para aumentar la inmunogenicidad. Se inmunizaron seis ratones Balb/c con este péptido y, luego de tres inmunizaciones en alrededor de ocho semanas, los ratones se desangraron para su análisis. Se dejó que la sangre se coagulara mediante incubación a 4°C durante 60 minutos. La sangre coagulada se centrifugó a 10,000x g a 4°C durante 10 minutos para sedimentar los residuos celulares. La muestra de suero resultante se dispensó en alícuotas de 50 µL y se almacenó a -20°C hasta que se necesitó.

Se utilizó una estrategia similar con base en otros antígenos de la SNAP-25 descritos en la presente memoria descriptiva para desarrollar anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Por ejemplo, el antígeno de la SNAP-25 de la SEQ ID NO: 45 se puede conjugar con KLH en lugar del antígeno de la SNAP-25 de la SEQ ID NO: 38. Como

otro ejemplo, los aminoácidos 186-197 de la SNAP-25 humana del antígeno de la SNAP-25 de la SEQ ID NO: 38 se pueden reemplazar con la SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44.

2. Análisis para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25

Para determinar la presencia de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 que se pueda unir de forma selectiva a un antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, se realizaron ensayos de escisión basados en células y ELISA comparativo usando el suero de ratón extraído. Para el ELISA comparativo, se construyeron dos proteínas de fusión: BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ de la SEQ ID NO: 48 y el BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ de la SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ que comprendía un péptido BirA de 16 aminoácidos naturalmente biotinilado de la SEQ ID NO: 50, enlazado en el extremo aminoterminal a un péptido de la SNAP-25 que comprendía los aminoácidos 134-197 de la SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ comprendía un péptido BirA de 16 aminoácidos naturalmente biotinilado de la SEQ ID NO: 50, enlazado en el extremo aminoterminal a un péptido de la SNAP-25 que comprendía los

aminoácidos 134-206 de la SEQ ID NO: 5. Estos dos sustratos se suspendieron en 1 x de PBS a una concentración de 10 µg/mL de BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ y el BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$. El BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ y el BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ se recubrieron en placas separadas agregando aproximadamente 100 µl de la solución de sustrato apropiada y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante una hora en 0.5% de BSA en 1 x de TBS que contenía una dilución de 1:10 a 1:100 de un suero con anticuerpo derivado de uno a seis ratones inmunizados (Ratón 1, Ratón 2, Ratón 3, Ratón 4, Ratón 5 y Ratón 6). Las placas sondadas con anticuerpo principal se lavaron cuatro veces durante 5 minutos cada vez en 200 µl de TBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaureato de sorbitán de polioxietileno (20)). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante 1 hora en 1 x de TBS que contenía una dilución de 1:10,000 de anticuerpo IgG anti-ratón policlonal de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) como anticuerpo secundario. Las placas sondadas con anticuerpo secundario se lavaron cuatro veces en 200 µl de TBS y 0.1% de TWEEN-20® (monolaureato de sorbitán de polioxietileno (20)). La detección cromogénica de los productos de la SNAP-25 etiquetada se visualizaron mediante detección cromogénica usando el kit de sustrato de TMB ImmunoPure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). La

aparición de un color amarillo en las placas recubiertas con BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$, pero no en las placas recubiertas con BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$, indicó que el anticuerpo α-SNAP-25 reconocía preferentemente el producto de la escisión de la SNAP-25_{197}. El resultado indicó que de los seis ratones utilizados para la inmunización, tres ratones (Ratón 2, Ratón 3 y Ratón 4) tenían titulaciones más elevadas y mayor especificidad hacia un antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A.

Estos resultados se confirmaron usando un ensayo de actividad de cadena ligera ELISA. Las placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina Reacti-Bind (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) se prepararon agregando aproximadamente 100 µl de la siguiente solución de sustrato: Las filas A-C se recubrieron con 100 µl de BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ en doce concentraciones diferentes, las filas D-H se recubrieron con 100 µl de BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ a 10 µg/mL. Las placas se lavaron aspirando la solución de sustrato y enjuagando cada pocillo tres veces con 200 µL de TBS y 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Las diluciones de BoNT/A se redujeron previamente a 37°C durante 20 minutos en amortiguador de incubación de BoNT/A (50 mM de HEPES, pH 7.4, 1% de suero bovino fetal, 10 µM de $ZnCl_2$, 10 mM

de ditiotrietol) y se agregaron 100 µl de BoNT/A previamente reducida a las placas recubiertas con sustrato y se incubaron a 37°C durante 90 minutos. Las placas tratadas con BoNT/A se lavaron aspirando el amortiguador de incubación de BoNT/A y enjuagando cada placa tres veces con 200 µL de TBS y 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante una hora en 0.5% de BSA en 1 x de TBS que contenía una dilución de 1:10 a 1:100 del suero con anticuerpo que se analiza. Las placas sondadas con anticuerpo principal se lavaron cuatro veces durante 5 minutos cada vez en 200 µl de TBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaureato de sorbitán de polioxietileno (20)). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante 1 hora en 1 x de TBS que contenía una dilución de 1:10,000 de anticuerpo IgG anti-ratón policlonal de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) como anticuerpo secundario. Las placas sondadas con anticuerpo secundario se lavaron cuatro veces en 200 µl de TBS y 0.1% de TWEEN-20® (monolaureato de sorbitán de polioxietileno (20)). La detección cromogénica de los productos de la SNAP-25 etiquetada se visualizó mediante detección cromogénica usando el kit de sustrato de TMB ImmunoPure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se detectó la aparición de un color amarillo, que tenía correlación con la presencia del producto de la escisión de la $SNAP\text{-}25_{197}$ en muestras tratadas con BoNT/A, pero

no en los controles sin tratar, usando suero con anticuerpos derivado de los seis ratones inmunizados (Ratón 1, Ratón 2, Ratón 3, Ratón 4, Ratón 5 y Ratón 6). Por consiguiente, el análisis de ELISA comparativo indicó que de los ratones utilizados para la inmunización, tres ratones (Ratón 2, Ratón 3 y Ratón 4) tenían titulaciones más elevadas y mayor especificidad hacia un antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A.

Para el ensayo de escisión basado en células, se colocaron densidades adecuadas de células PC12 en placas de cultivo de tejido de 60 mm^2 que contenían 3 mL de un medio de suero apropiado (Tabla 1). Las células se cultivaron en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaron la densidad apropiada. Se preparó una solución de transfección de 500 µL agregando 250 µL de medio de suero reducido OPTI-MEM con 15 µL de LipofectAmina 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos hasta proporcionar 250 µL de medio de suero reducido OPTI-MEM que contenía 10 µg de una construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (SEQ ID NO: 51). La construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC comprende un vector de expresión pQBI-25 (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA), cuyos elementos promotores están unidos de

forma funcional a un polinucleótido que codifica la cadena ligera de GFP-BoNT/A de la SEQ ID NO: 52. Esta mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. El medio se reemplazó con medio no complementado recién preparado y se agregó la solución de transfección de 500 µL a las células. Las células luego se incubaron en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono durante aproximadamente 6 a 18 horas. Las células se lavaron y recolectaron como se describió en el Ejemplo II. Para detectar la presencia del producto de la SNAP-25_{197} escindida, se analizó una alícuota de cada muestra recolectada mediante transferencia Western como se describió en el Ejemplo II, salvo porque el anticuerpo principal utilizado fue una dilución de 1:1,000 del suero con anticuerpo y el anticuerpo secundario fue un 1:20,000 de peroxidasa de rábano picante con α-IgG de ratón (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se detectó una sola banda correspondiente al producto de la escisión de la SNAP-25_{197} en las muestras tratadas con BoNT/A, pero no en los controles sin tratar, usando suero con anticuerpo derivado de tres ratones (Ratón 2, Ratón 3 y Ratón 4). Por consiguiente, el análisis de escisión basado en células indicó que de los ratones utilizados para la inmunización, tres ratones (Ratón 2, Ratón 3 y Ratón 4) tenían titulaciones más elevadas y mayor especificidad hacia un antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el

residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A.

3. Producción de hibridomas

Para realizar hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 que se puedan unir de forma selectiva a un antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 de un enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, se extrajo el bazo del Ratón 2 tres días después de una inmunización final "de refuerzo" y las células del bazo se fusionaron con células de mieloma P3-X63 Ag8.653 usando protocolos de hibridoma estándar. Estas células se colocaron en cinco placas de 96 pocillos y los híbridos se seleccionaron usando medio HAT. Dentro de los 8-14 días posteriores a la fusión, se realizó el primer análisis de los aproximadamente 480 clones progenitores usando un ELISA comparativo con los péptidos BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ y BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ recubiertos en dos placas separadas. El ELISA comparativo proporcionó un método de análisis rápido para identificar hibridomas que producen anticuerpos específicos para la SNAP-25_{197} escindida. Los 18 clones superiores se sometieron a un análisis adicional usando el ensayo de escisión basado en células descrito anteriormente e inmunotinción de las células transfectadas con LC/A (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de sobrenadantes que contenían anticuerpo monoclonal α-SNAP-25

Clon	ELISA comparativo				Ensayo basado en células	
	OD SNAP-25 $_{197}$	OD SNAP-25 $_{206}$	Proporción $_{197/206}$	Proporción $_{206/197}$	SNAP-25$_{197}$	SNAP-25$_{206}$
1D3	1.805	0.225	8.02	0.13	+++	-
1F12	0.365	0.093	3.92	0.25	-	-
1G10	0.590	0.137	4.31	0.23	++	-
1H1	0.335	0.121	2.77	0.36	-	-
1H8	0.310	0.302	1.03	0.97	+	-
2C9	0.139	0.274	0.51	1.97	-	-
2E2	0.892	0.036	24.78	0.04	++	-
2E4	0.228	0.069	3.30	0.30	+	-
2F11	1.095	1.781	0.61	1.63	-	-
3C1	1.268	0.053	23.92	0.04	++	-
3C3	0.809	0.052	15.56	0.06	++	-
3E1	0.086	0.155	0.55	1.80	0	-
3E8	2.048	0.053	38.64	0.03	+++	-
3G2	0.053	0.158	0.34	2.98	-	-
4D1	0.106	0.218	0.49	2.06	-	-

4G6	0.061	0.159	0.38	2.61	-	-
5A5	0.251	0.106	2.37	0.42	+	-
5F11	0.243	0.061	3.98	0.25	-	-

Los clones 1D3, 1G10, 2E2, 3C1, 3C3 y 3E8 se clonaron adicionalmente limitando la dilución debido a que el medio acondicionado producido mediante estos clones comprendía anticuerpos α-SNAP-25 con una especificidad de unión preferencial con una proporción$_{197/206}$ de al menos 4:1 para el producto de la escisión de la SNAP-25$_{197}$ con relación al sustrato no escindido de la SNAP-25$_{206}$ y se detectó el producto de la escisión de la SNAP-25$_{197}$ usando el ensayo de escisión basado en células y la inmunotinción de las células PC12 transfectadas con GFP-LC/A. De forma similar, los clones 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 y 4G6 se clonaron adicionalmente limitando la dilución debido a que el medio acondicionado producido por esos clones comprendía anticuerpos α-SNAP-25 con una especificidad de unión preferencial con una proporción$_{206/197}$ de al menos 1.5:1 para el sustrato no escindido de la SNAP-25$_{206}$ con relación al producto de la escisión de la SNAP-25$_{197}$ y se detectó el sustrato no escindido de la SNAP-25$_{206}$ usando el ensayo de escisión basado en células. Estos clones derivados de células individuales se analizaron nuevamente usando un ELISA comparativo, escisión basada en células e inmunotinción

para confirmar su afinidad y especificidad y los anticuerpos se separaron en isotipos usando procedimientos estándar. Se produjeron ascitis a partir de los clones 1D3B8 (IgM.k), 1G10A12 (IgG3.k), 2C9B10 (IgG3.k), 2E2A6 (IgG3.k), 2F11B6 (IgM.k), 3C1A5 (IgG2a.k) y 3C3E2 (IgG2a.k). El clon 3E8 dejó de producir anticuerpos durante el proceso de clonación y no se pudo evaluar adicionalmente.

4. Evaluación de la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales α-SNAP-25

Para evaluar la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 que se puede unir de forma selectiva a un antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A se utilizaron ascitis de los clones 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5 y 3C3E2 para detectar el producto de la escisión de la SNAP-25 usando el ensayo de actividad basado en células, inmunocitoquímica e inmunoprecipitación.

Para el ensayo de actividad basado en células, se determinó la especificidad de unión analizando la capacidad de los ascitis que contenían anticuerpos de la α-SNAP-25 para detectar el sustrato de la $SNAP\text{-}25_{206}$ no escindida y el producto de la $SNAP\text{-}25_{197}$ escindida mediante análisis de

transferencia Western. Se colocó una densidad adecuada de células PC12 en placas de cultivo de tejido de 60 mm^2 que contenían 3 mL de un medio de suero apropiado, se cultivó en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono hasta que se alcanzó una densidad celular apropiada y se transfectó con una solución de transfección sin la construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células sin transfectar) o una solución de transfección con la construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células transfectadas), como se describió anteriormente. Las células se lavaron y recolectaron como se describió en el Ejemplo I. Para detectar la presencia del sustrato de la $SNAP\text{-}25_{206}$ no escindida y el producto de la $SNAP\text{-}25_{197}$ escindida, se analizó una alícuota de cada muestra recolectada mediante transferencia Western como se describió en el Ejemplo I, salvo porque el anticuerpo principal utilizado fue una dilución de 1:100 de la ascitis que contenía anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 y el anticuerpo secundario utilizado fue un 1:20,000 de IgG α-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Además, se analizaron tres anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 de ratón comercialmente disponibles. Se usó el SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), un anticuerpo α-SNAP-25 que el fabricante indica que detecta tanto el sustrato de la $SNAP\text{-}25_{206}$ no escindida como el producto se la $SNAP\text{-}25_{197}$ escindida, en una dilución de 15,000 de acuerdo con

las recomendaciones del fabricante. Se usó el MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), un anticuerpo α-SNAP-25 que el fabricante indica que detecta tanto el sustrato de la $SNAP\text{-}25_{206}$ no escindida como el producto se la $SNAP\text{-}25_{197}$ escindida, en una dilución de 1:100 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usó el MC-6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), un anticuerpo α-SNAP-25 que el fabricante indica que detecta solamente el producto de la $SNAP\text{-}25_{197}$ escindida, en una dilución de 1:100 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

La Tabla 21 indica las ascitis con anticuerpo α-SNAP-25 que detectaron solamente el producto de la escisión de la $SNAP\text{-}25_{197}$. El ensayo de escisión basado en células indicó que las ascitis producidas a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 sintetizan un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 con alta especificidad de unión al producto de la escisión de la $SNAP\text{-}25_{197}$, lo que permite el reconocimiento selectivo de este producto de escisión con relación al sustrato no escindido de la $SNAP\text{-}25_{206}$. El anticuerpo SMI-81 comercial detectó el sustrato no escindido de la $SNAP\text{-}25_{206}$, pero solo reconoció apenas el producto de la escisión de la $SNAP\text{-}25_{197}$ (Tabla 21). De manera sorpresiva, el anticuerpo comercial MC-6050 detectó solamente el sustrato no escindido

de la SNAP-25_{206} y no pudo reconocer el producto de la escisión de la SNAP-25_{197} (Tabla 21). De manera aun más sorprendente, el anticuerpo comercial MC-6050 solamente detectó el sustrato no escindido de la SNAP-25_{206} y no pudo reconocer el producto de la escisión de la SNAP-25_{197}, incluso a pesar de que el fabricante afirma públicamente que este anticuerpo detecta de forma selectiva el producto de la escisión de la SNAP-25_{197} (Tabla 21). Por consiguiente, este análisis indica que mientras que 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 presentan una selectividad adecuada para el producto de la escisión de la SNAP-25_{197}, no sucede lo mismo con 1G10A12 y 2F11B6. Además, los anticuerpos comerciales SMI-81, MC-6050 y MC-6053 no son adecuados para los métodos basados en inmunoensayos descritos en la presente solicitud, debido a que no pudieron detectar de forma selectiva el producto de la escisión de la SNAP-25_{197}.

Para el análisis de inmunocitoquímica, se determinó la especificidad de unión analizando la capacidad de las ascitis que contenían el anticuerpo α-SNAP-25 de detectar el sustrato de la SNAP-25_{206} no escindida y el producto de la SNAP-25_{197} escindida mediante inmunotinción. *Véase, por ej.,* Ester Fernandez-Salas et al., *Plasma Membrane Localization Signals in the Light Chain of Botulinum Neurotoxin,* Proc. Natl. Acad. Sci., E.U.A. 101(9): 3208-3213 (2004). Se colocó en placas una densidad adecuada de células PC12, se cultivó y se transfectó

con una solución de transfección sin la construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células sin transfectar) o una solución de transfección que contenía la construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células transfectadas), como se describió anteriormente. Las células se lavaron en 1 x de PBS y se fijaron en 5 mL de PAF a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células fijadas se lavaron en solución salina amortiguada con fosfato, se incubaron en 5 mL de 0.5% de Triton® X-100 (éter octilfenólico de polietilenglicol) en 1 x de PBS, se lavaron en 1 x de PBS y se permeabilizaron en 5 mL de metanol a -20°C durante seis minutos. Las células permeabilizadas se bloquearon en 5 mL de 100 mM de glicina a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron en 1 x de PBS y se bloquearon en 5 mL de 0.5% de BSA en 1 x de PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células bloqueadas se lavaron en 1 x de PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas en 0.5% de BSA en 1 x de PBS que contenía una dilución de 1:10 de una ascitis de una línea celular de hibridoma clonal que se analizaba. Las células sondadas con anticuerpo principal se lavaron tres veces durante 5 minutos cada vez en 1 x de PBS. Las células lavadas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en 1 x de PBS que contenía una dilución de 1:200 de inmunoglobulina G anti-ratón policlonal de cabra, anticuerpo de cadenas ligera y pesada (IgG, H+L) conjugado con ALEXA®

FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) como anticuerpo secundario. Las células sondadas con anticuerpo secundario se lavaron tres veces durante 5 minutos cada vez en 1 x de PBS. Las células lavadas se prepararon para la examinación microscópica colocándolas en medio de montaje VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se cubrieron con un cubreobjetos. Las imágenes de la detección de señal se obtuvieron con un microscopio confocal Leica usando los ajustes de láser apropiados. La Tabla 21 indica las ascitis que contenían anticuerpo α-SNAP-25 que detectaron específicamente el producto de la escisión de la SNAP-25_{197}. El análisis de inmunocitoquímica indicó que las ascitis producidas a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 sintetizan un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 con alta especificidad de unión al producto de la escisión de la SNAP-25_{197}, lo que permite el reconocimiento preferencial de este producto de escisión con relación al sustrato no escindido de la SNAP-25_{206}.

Para el análisis de inmunoprecipitación, se determinó la especificidad de unión analizando la capacidad de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 purificados de la Proteína A (Proteína A HiTrap™ Columnas HP, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ) de precipitar el sustrato de la SNAP-25_{206} no escindida y el producto de la SNAP-25_{197} escindida. *Véase, por ej.,*

Capítulo 8 *Storing and Purifying Antibodies*, pp. 309-311, Harlow & Lane, *anteriormente*, 1998a. Se colocó en placas una densidad adecuada de células PC12, se cultivó y se transfectó con una solución de transfección que contenía una construcción de expresión pQBI-25/GFP (células de referencia; SEQ ID NO: 53) o una solución de transfección que contenía la construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células experimentales), como se describió anteriormente. La construcción de expresión pQBI-25/GFP comprende un vector de expresión cuyos elementos promotores están enlazados funcionalmente a un polinucleótido que codifica la GFP de la SEQ ID NO: 54. Luego de incubación durante la noche, las células se lavaron aspirando el medio de cultivo y enjuagando cada pocillo con 200 µL de 1 x de PBS. Para recolectar las células, se aspiró el PBS, las células se lisaron agregando un amortiguador de lisis de inmunoprecipitación con 50 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 1.5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de EGDT, 10% de glicerol, 1% de Triton® X-100 (éter octilfenólico de polietilenglicol) y 1 x de un cóctel inhibidor de proteasa COMPLETE™ (Roche Applied Biosciences, Indianápolis, IN) y se incubaron a 4°C durante una hora. Las células lisadas se centrifugaron a 3,000 x g a 4°C durante 10 minutos para retirar los residuos celulares y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se diluyó hasta proporcionar una concentración proteica de aproximadamente 1 mg/mL. Se

agregaron aproximadamente 5 µg de anticuerpo monoclonal purificado a 0.5 mL de sobrenadante diluido y se incubaron a 4°C durante dos horas. Luego de la incubación del anticuerpo principal, se agregaron aproximadamente 50 µl de Proteína G inmovilizada (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) al sobrenadante diluido y se incubaron a 4°C durante una hora. El sobrenadante incubado se lavó tres veces durante 30 minutos cada vez agregando 0.5 mL de amortiguador de lisis de inmunoprecipitación, con centrifugación a 300 x g a 4°C durante un minuto para sedimentar la Proteína G inmovilizada y se decantó el sobrenadante. Luego del lavado, el sedimento se volvió a suspender en 30 µL de 1 x de amortiguador de carga SDS y la muestra se calentó hasta 95°C durante 5 minutos. Para detectar la presencia del sustrato de la SNAP-25_{206} no escindida y el producto de la SNAP-25_{197} escindida, se analizó una alícuota de cada muestra recolectada mediante transferencia Western, como se describió en el Ejemplo I, salvo porque el anticuerpo principal utilizado fue una dilución de 1:1,000 del suero de anticuerpo policlonal α-SNAP-25 (véase el Ejemplo V) y el anticuerpo secundario utilizado fue un 1:20,000 de peroxidasa de rábano picante con α-IgG de conejo (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). La Tabla 21 indica las ascitis que contenían anticuerpo α-SNAP-25 que disminuyeron específicamente el producto de la escisión de la SNAP-25_{197} mediante análisis de inmunoprecipitación. El

análisis de inmunoprecipitación indicó que las ascitis producidas a partir de los clones 2E2A6 y 3C1A5 sintetizan un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 con alta especificidad de unión al producto de la escisión de la $SNAP\text{-}25_{197}$, lo que permite el reconocimiento preferencial de este producto de escisión con relación al sustrato no escindido de la $SNAP\text{-}25_{206}$.

Tabla 21. Análisis de ascitis de clones que contienen anticuerpo monoclonal α-SNAP-25

Clon	Ensayo basado en células		Inmunocitoquímica		Inmunoprecipitación	
	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$
1D3B8	++	-	++	-	Sin analizar	Sin analizar
1G10A12	++	++	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar
2C9B10	++	-	++	-	Sin analizar	Sin analizar
2E2A6	++	-	++	-	++	-
2F11B6	+	+	+	+	Sin analizar	Sin analizar
3C1A5	++	-	++	-	++	-
3C3E2	+	-	Sin	Sin	Sin	Sin

			analizar	analizar	analizar	analizar
MC-6050	-	+	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar
MC-6053	-	+	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar
SMI-81	-/+	++	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar	Sin analizar

5. Evaluación de la afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales α-SNAP-25

Para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 que muestra alta afinidad de unión al producto de la escisión de la SNAP-25_{197} o el sustrato no escindido de la SNAP-25_{206}, se realizaron ensayos de afinidad de unión en un instrumento BIAcore 3000 usando chips sensores de carboximetil dextrán (CM5) (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Las ejecuciones se realizaron a 25°C con amortiguador HBS-EP con 10 mM de HEPES (pH 7.4), 150 mM de cloruro de sodio, 3 mM de EDTA, 0.005% (v/v) de tensioactivo P20 a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Los péptidos de la SNAP-25 que comprendían los aminoácidos 134-197 de la SEQ ID NO: 5 (SNAP-$25_{134-197}$) o los aminoácidos 134-206 de la SEQ ID NO: 5 (SNAP-$25_{134-206}$) se unieron de forma covalente a la superficie de los chips

sensores CM5 usando acoplamiento estándar de amina. Brevemente, los chips CM5 se activaron mediante una inyección de 7 minutos de una mezcla de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida 0.2 M y N-hidroxisuccinimida 0.05 M, luego los péptidos de la SNAP-25 se inyectaron en 10 mM de acetato de sodio (pH 4.0) durante 20 min a una velocidad de flujo de 10 µL/min y los ésteres de succinimida sin reaccionar se bloquearon mediante una inyección de 7 min de clorhidrato de etanolamina 1 M, pH 8.5. La cantidad inmovilizada de SNAP-$25_{134-197}$ o SNAP-$25_{134-206}$ en los chips se reflejó mediante un aumento de 100-150 en las unidades de respuesta (alrededor de 0.10-0.15 ng/mm^2). Las muestras de anticuerpo que comprendían ascitis o anticuerpos monoclonales purificados producidos a partir de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2, así como los anticuerpos α-SNAP-25 comercialmente disponibles, se pasaron por una superficie de chips CM5, permitiendo un tiempo de asociación de 10 min y un tiempo de disociación de 20 min. Las superficies se regeneraron entre las ejecuciones mediante una inyección de 1 minuto de 10 mM de glicina-HCl (pH 2.5) a una velocidad de flujo de 15 µL/min. Las curvas del sensograma se ajustaron a un modelo de unión cinética 1:1 con el software BIAevaluation 3.0.

Los resultados indican que tanto 2E2A6 como 3C1A5 fueron altamente específicos para el producto de la SNAP-25_{197}

escindida en comparación con el sustrato no escindido de la SNAP-25 (Tabla 22). Al compararlo con las afinidades de unión de MC-6050 y MC-6053, 1D3B6 tuvo una constante de disociación de equilibrio aproximadamente 10 veces más elevada para el producto de la escisión de la SNAP-25 en relación con estos anticuerpos comerciales (Tabla 22). De manera interesante, 2E2A6 tuvo una constante de disociación de equilibrio solo ligeramente menor para el producto de la escisión de la SNAP-25 con relación a estos anticuerpos comerciales (0.405 nM en comparación con 0.497 y 0.508) (Tabla 22). Como ninguno de estos anticuerpos α-SNAP-25 comerciales reconoció de forma selectiva el producto de la escisión de la SNAP-25 (Tabla 21), una constante de disociación de equilibrio menor a alrededor de 0.5 nM parece, en parte, crítica para lograr dicha selectividad. De manera similar, al compararlo con las afinidades de unión de MC-6050 y MC-6053, 2E2A6 tuvo una constante de disociación/velocidad de disociación al menos una vez más lenta (6.74×10^{-5} en comparación con 8.82×10^{-4} s^{-1} y 1.18×10^{-3} s^{-1}) (Tabla 22). Esto sugiere adicionalmente que una constante de disociación/velocidad de disociación menor a alrededor de 8.82×10^{-4} parece, en parte, crítica para lograr la unión selectiva al producto de la escisión de la SNAP-25. Este resultado es coherente con 1D3B8, que tuvo una constante de disociación/velocidad de disociación de 5.78×10^{-5} s^{-1} (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis de afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales α-SNAP-25

Parámetro SPR	1D3B8		2E2A6	
	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$[a]	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$[b]
Ka (M^{-1} s^{-1})	1.06×10^{6}	–	1.70×10^{6} (1.66×10^{5})	– (–)
Kd (s^{-1})	5.78×10^{-5}	–	1.53×10^{-4} (6.74×10^{-5})	– (–)
KD (nM)	0.050	–	0.090 (0.405)	– (–)
Parámetro SPR	3C1A5		2C9B10	
	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$[c]	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$[d]
Ka (M^{-1} s^{-1})	2.17×10^{5}	–	1.15×10^{4}	–
Kd (s^{-1})	2.88×10^{-4}	–	3.11×10^{-4}	–
KD (nM)	1.33	–	27.1	–
Parámetro SPR	MC-6050		MC-6053	
	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$
Ka (M^{-1} s^{-1})	1.78×10^{6}	3.06×10^{2}	2.32×10^{6}	1.06×10^{2}
Kd (s^{-1})	8.82×10^{-4}	6.07×10^{-3}	1.18×10^{-3}	2.56×10^{-5}
KD (nM)	0.497	19,800	0.508	240

[a] No se observó unión al pasar hasta 125 nM del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 1D3B8 por la superficie del chip sensor CM5 luego de un tiempo de asociación de 10 minutos.

[b] No se observó unión al pasar hasta 10 μM del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 2E2A6 por la superficie del chip sensor CM5 luego de un tiempo de asociación de 10 minutos.

[c] No se observó unión al pasar hasta 100 nM del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 3C1A5 por la superficie del chip sensor CM5 luego de un tiempo de asociación de 10 minutos.

[d] No se observó unión al pasar hasta 100 nM del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 2C9B10 por la superficie del chip sensor CM5 luego de un tiempo de asociación de 10 minutos.

Para comparar los seis anticuerpos diferentes, se normalizó la velocidad de asociación (ka) y la velocidad de disociación (kd) de cada uno, usando un programa del software BIA evaluation 4.1. Para la comparación de las velocidades de asociación, los datos primero se cortaron individualmente eliminando la parte de regeneración y las adiciones de inyecciones y luego se normalizaron hasta una escala de 0 a 100. Para la comparación de la velocidad de disociación, los datos se normalizaron hasta el punto superior/detención de la inyección. Este análisis mostró que 2C9B10 tenía un velocidad de asociación mucho más lenta que los otros anticuerpos (FIG.

7A) y que MC-6053 tenía una velocidad de disociación mucho más rápida que los otros anticuerpos (FIG. 7B). La velocidad de disociación rápida del MC-6053 indica que este anticuerpo no tendrá una buena actuación en los métodos descritos en la presente memoria descriptiva, debido a que tendría dificultad para mantenerse unido al antígeno del sustrato durante las etapas de lavado.

6. Determinación de secuencias del epítopo de los anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 aislados

Para determinar el epítopo de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 aislado que se puede unir de forma selectiva a un antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, se determinaron las secuencias de la molécula de polinucleótido que codificaba las cadenas ligera variable (V_L) y pesada variable (V_H) del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2. Se extrajo el ARNm de cada hibridoma, se purificó usando protocolos estándar y se transcribió de forma inversa en ADNc usando un cebador antisentido oligo dT o un cebador anti-sentido específico para el gen (CH y kappa CL de IgG1 murina). Se usaron cebadores de dominio constante humano y murino específicos para amplificar el ADNc mediante PCR luego

de la producción de ADNc para determinar el isotipo del anticuerpo. Los cebadores V_H y V_L redundantes se usaron para amplificar los dominios variables del ADNc. Para 5'RACE, se agregó un residuo de dCTP homopolimérico al extremo 3' del ADNc. Las cadenas pesada y ligera luego se amplificaron con un cebador de sentido oligo dG y un cebador antisentido específico para el gen (CH/KC). Los productos de la PCR incluyeron la secuencia del péptido de señal, dominios variables y dominios constantes hasta el cebador antisentido. Los productos de la PCR se purificaron en gel para retirar fragmentos pequeños y se clonaron en un vector romo o TA para determinar las secuencias. Se determinaron las secuencias de cinco clones independientes para cada cadena y se determinaron los alineamientos de las cadenas V_H y VL y las secuencias de consenso. Los métodos utilizados para determinar las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L se describen, por ej., en Roger A. Sabbadini, et al., *Novel Bioactive Lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same*, publicación de patente estadounidense 2007/0281320 y Peter Amersdorfer, et al., *Molecular Characterization of Murine Humoral Immune Response to Botulinum Neurotoxin Type A Binding Domain as Assessed by Using Phage Antibody Libraries*, 65(9) Infect. Immun. 3743-3752, cada uno de los cuales se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia. Además, se encuentran disponibles servicios comerciales para determinar las

secuencias de las cadenas pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) de un anticuerpo e identificar las regiones de CDR, véase, por ej., Fusion Antibodies Ltd., Irlanda del Norte. En un caso, para la región V_L 3C1A5, la secuencia de aminoácidos también se determinó separando los anticuerpos purificados por afinidad mediante electroforesis 2DE de alta resolución y luego sometiendo a la proteína a análisis de obtención de la huella genética con fragmentación del péptido usando nanoLC-MSMS de alta resolución luego de la digestión proteolítica.

Las secuencias de polinucleótidos que comprendían las cadenas V_H y V_L del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas descritos en la presente memoria descriptiva son como se indica a continuación: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 71), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO: 73), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 75), 3C1A5 V_H (SEQ ID NO: 77), 3C3E2 V_H variante 1 (SEQ ID NO: 79), 3C3E2 V_H variante 2 (SEQ ID NO: 81), 3C3E2 V_H variante 3 (SEQ ID NO: 132), 1D3B8 V_L (SEQ ID NO: 83), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 85), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 87), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 89) y 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 91). La secuencia de aminoácidos que comprendía las cadenas V_H y V_L del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas descritos en la presente memoria descriptiva son como se indica a continuación: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 72), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO:

74), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 76), 3C1A5 V_H (SEQ ID NO: 78), 3C3E2 V_H variante 1 (SEQ ID NO: 80), 3C3E2 V_H variante 2 (SEQ ID NO: 82); 3C3E2 V_H variante 2 (SEQ ID NO: 133), 1D3B8 V_L (SEQ ID NO: 84), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 86), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 88), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 90) y 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 92). Las secuencias de aminoácidos que comprendían los dominios de CDR V_H y V_L del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producidos por los hibridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 se indican en la Tabla 23.

Tabla 23. Secuencias de CDR de los dominios V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales α-SNAP-25

CDR	Secuencia	Identificada en	SEQ ID NO:
CDR 1 V_H	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5	93
CDR 1 V_H	TFTNYVIH	3C3E2	94
CDR 1 V_H	IFTDHALH	1D3B8	95
CDR 2 V_H	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
CDR 2 V_H	YLFPGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5	97
CDR 2 V_H	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C3E2	98
CDR 2 V_H	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
CDR 3 V_H	KRMGY	2E2A6	100

		3C1A5	
CDR 3 V_H	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
CDR 3 V_H	ARMDY	3C3E2var1	102
CDR 3 V_H	ARMGY	3C3E2var2	134
CDR 3 V_H	ARHLANTYYYFDY	3C3E2var3	135
CDR 1 V_L	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
CDR 1 V_L	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
CDR 1 V_L	KSSQSLLYTNGKTYLT	2E2A6	105
CDR 1 V_L	KSSQSLLNTNGKTYLT	3C1A5	106
CDR 1 V_L	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
CDR 2 V_L	KVSNRFS	1D3B8	108
CDR 2 V_L	NAKSLAE	2C9B10	109
CDR 2 V_L	LVSELDS	2E2A6	110
CDR 2 V_L	LVSKLDS	3C1A5	111
CDR 2 V_L	YASQSIS	3C3E2	112
CDR 3 V_L	FQGSHVPPT	1D3B8	113
CDR 3 V_L	QHHYGTPYT	2C9B10	114
CDR 3 V_L	LQSAHFPFT	2E2A6	115
CDR 3 V_L	LQSSHFPFT	3C1A5	116
CDR 3 V_L	QQSDTWPLT	3C3E2	117

Ejemplos no taxativos de secuencias de aminoácidos que comprendían variantes de dominio de CDR V_H del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas descritos en la presente memoria descriptiva incluyen la variante de CDR1 V_H de la SEQ ID NO: 118 para 1D3B8; variante de CDR1 V_H de la SEQ ID NO: 119 para 2C9B10, 2E2A6 y 3C1A5 V_H; variante de CDR1 V_H de la SEQ ID NO: 120 para 3C1A5 V_H y 3C3E2 variante 3; variante de CDR2 V_H de la SEQ ID NO: 121 para 1D3B8 y 2E2A6; variante de CDR2 V_H de la SEQ ID NO: 122 para 2C9B10 y 3C1A5 V_H; variante de CDR2 V_H de la SEQ ID NO: 123 para 3C1A5 V_H y 3C3E2 variante 3; variante de CDR3 V_H MDY para 1D3B8 y 2C9B10; variante de CDR3 V_H MGY para 2E2A6 y 3C1A5 V_H y variante de CDR3 V_H de la SEQ ID NO: 124 para 3C1A5 V_H y 3C3E2 variante 3. Ejemplos no taxativos de secuencias de aminoácidos que comprendían variantes de dominio de CDR V_L del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas descritos en la presente memoria descriptiva incluyen la variante de CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 125 para 1D3B8; variante de CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 126 para 2C9B10; variante de CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 127 para 2E2A6; variante de CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 128 para 3C1A5; variante de CDR1 V_L de la SEQ ID NO: 129 para 3C3E2; variante de CDR2 V_L KVS para 1D3B8; variante de CDR2 V_L NAK para 2C9B10; variante de CDR2 V_L LVS para 2E2A6; variante de CDR2 V_L YAT para 3C1A5 y variante de CDR2 V_L YAS para 3C3E2.

Ejemplo VIII

Desarrollo de anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que unen de forma selectiva un epítopo de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

El siguiente ejemplo ilustra cómo realizar anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se puedan unir de forma selectiva a un epítopo de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A.

Para desarrollar anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se puedan unir de forma selectiva a una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, se diseñó el péptido de 10 residuos CGGGRIDEANQ (SEQ ID NO: 46) como un antígeno del producto de la escisión de la SNAP-25. Este péptido comprende un residuo de cisteína N terminal para la conjugación con KLH, un espaciador flexible espaciador G (GGG) enlazado a los aminoácido 191-197 de la SNAP-25 humana (SEQ ID NO: 5) y tiene una glutamina C terminal carboxilada. Las búsquedas de blastos revelaron que este péptido tenía una alta homología solamente con la SNAP-25 y casi ninguna reactividad cruzada posible con

otras proteínas en células neuronales. La secuencia también se sometió a un cuidadoso escrutinio utilizando algoritmos informáticos para determinar índices de hidropatía, probabilidad de superficie proteica, regiones de flexibilidad y estructuras secundarias favorables, seguido por la orientación adecuada y la presentación de la secuencia peptídica elegida. El péptido se sintetizó y conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH) para aumentar la inmunogenicidad. Antes de inmunizar los animales, primero se analizaron conejos sin tratar en comparación con lisados celulares de líneas celulares candidatas en una transferencia Western para identificar los animales que no tenían inmunorreactividad con las proteínas presentes en los lisados celulares. Se inmunizaron con este péptido dos conejos previamente analizados y, luego de tres inmunizaciones en alrededor de ocho semanas, los conejos se desangraron para su análisis. Se dejó que la sangre se coagulara mediante incubación a 4°C durante 60 minutos. La sangre coagulada se centrifugó a 10,000x g a 4°C durante 10 minutos para sedimentar los residuos celulares. La muestra de suero resultante se dispensó en alícuotas de 50 µL y se almacenó a -20°C hasta que se necesitó.

Se utilizó una estrategia similar con base en otros antígenos de la SNAP-25 descritos en la presente memoria

descriptiva para desarrollar anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Por ejemplo, el antígeno de la SNAP-25 de la SEQ ID NO: 47 se puede conjugar con KLH en lugar del antígeno de la SNAP-25 de la SEQ ID NO: 46. Como otro ejemplo, los aminoácidos 191-197 de la SNAP-25 humana del antígeno de la SNAP-25 de la SEQ ID NO: 38 se pueden reemplazar con la SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44.

2. Análisis para determinar la presencia de anticuerpos policlonales α-SNAP-25

Para determinar la presencia de anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se puedan unir de forma selectiva a un antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, se realizaron ensayos de escisión basados en células y ELISA comparativo usando el suero de conejo extraído como se describió en el Ejemplo III. El suero de los dos conejos contenía anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a un antígeno de la SNAP-25 con un extremo

carboxilo en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A. Los anticuerpos policlonales de conejo α-SNAP-25 se denominaron NTP 22 y NTP 23.

3. Purificación de anticuerpos policlonales α-SNAP-25

Para purificar anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que se pueden unir de forma selectiva a un antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, se purificaron anticuerpos NTP 22 y NTP 23 de suero de conejo usando columnas de afinidad que contenían el antígeno de la SNAP-25 de la SEQ ID NO: 46.

4. Evaluación de la especificidad de unión de los anticuerpos policlonales α-SNAP-25

Para evaluar la especificidad de unión de un anticuerpo policlonal α-SNAP-25 que se puede unir de forma selectiva a un antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, se utilizaron anticuerpos policlonales α-SNAP-25 NTP 22 y NTP 23 purificados para detectar el producto de la escisión usando el ensayo de actividad basado en células, inmunocitoquímica e inmunoprecipitación, como se describió en

el Ejemplo III. El ensayo de escisión basado en células, el análisis de inmunocitoquímica y el análisis de inmunoprecipitación indicaron que los anticuerpos policlonales α-SNAP-25 NTP 22 y NTP 23 no reaccionaron de forma cruzada con la SNAP-25 no escindida. Por consiguiente, tanto la NTP 22 como la NTP 23 tienen alta especificidad de unión al producto de la escisión de la $SNAP\text{-}25_{197}$, lo que permite el reconocimiento preferencial de este producto de escisión con relación al sustrato no escindido de la $SNAP\text{-}25_{206}$. La afinidad a los antígenos se puede determinar usando SPR en el BiAcore como se describió en el Ejemplo III.

Ejemplo IX

Preparación de condición y componente de un ELISA tipo sándwich

El siguiente ejemplo ilustra cómo identificar y preparar los componentes y las condiciones necesarios para realizar un ELISA tipo sándwich útil para realizar los métodos basados en inmunoensayos para detectar la actividad de la endopepetidasa redirigida detectando un producto de la escisión de la SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 específico para una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A.

1. Preparación de lisados celulares a partir de células tratadas con endopeptidasa redirigida

Para obtener una endopeptidasa redirigida tratada con lisados celulares para análisis, se sembró una densidad adecuada de células de un cultivo madre de Neuro-2a en un matraz T175 que contenía 50 mL de un medio libre de suero que contenía medio esencial mínimo, 2 mM de GlutaMAX™ I con sales de Earle, 1 x de complemento B27, 1 x de complemento N2, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y 10 mM de HEPES. Estas células se incubaron en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, según se evaluó mediante criterios morfológicos estándar y de rutina, tal como la detención del crecimiento y la extensión de neuritas (aproximadamente 2 a 3 días). Como referencia, se sembró una densidad adecuada de células de un cultivo madre de Neuro-2a en un matraz T175 que contenía 50 mL de un medio de crecimiento adecuado (Tabla 1). Estas células de referencia no diferenciadas se cultivaron en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono hasta alcanzar una confluencia del 50% (aproximadamente 18 horas). Se aspiró el medio de ambos cultivos de referencia diferenciado y no diferenciado de cada pocillo y se reemplazó con medio recién preparado que contenía 0 (muestra sin tratar) o 10 nM de una endopeptidasa

redirigida. Luego de una incubación durante la noche, las células se lavaron y se recolectaron lisándolas en amortiguador de lisis Tritón X-100 recién preparado (50 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 1.5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de EGTA, 1% de Tritón X-100) a 4°C durante 30 minutos con agitación constante. Las células lisadas se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min a 4°C para eliminar los residuos usando una centrifugadora de mesa. Las concentraciones de proteínas de lisados celulares se midieron a través del ensayo Bradford.

2. Preparación e identificación de componentes del ELISA tipo sándwich

Para identificar un par de anticuerpos de detección de anticuerpos de captura adecuado se realizó un análisis ELISA tipo sándwich ECL en veintiséis combinaciones diferentes de pares de anticuerpos de detección y de captura que comprendían once anticuerpos de captura α-SNAP-25 diferentes y siete anticuerpos de detección α-SNAP-25 diferentes. Los anticuerpos α-SNAP-25 utilizados fueron los anticuerpos monoclonales de ratón α-SNAP-25 2E2A6 y 3C1A5 descritos en la presente memoria descriptiva, los anticuerpos monoclonales de ratón α-SNAP-25 SMI-81, MC-6050 y MC-6053 descritos en la presente memoria descriptiva, los anticuerpos policlonales de conejo α-SNAP-25 NTP 23 descritos en la presente memoria descriptiva, los

anticuerpos policlonales de conejo α-SNAP-25 S9684 (Sigma, San Louis, MO), los anticuerpos policlonales de conejo α-SNAP-25 H-50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), los anticuerpos policlonales de cabra α-SNAP-25 C-18 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), los anticuerpos policlonales de cabra α-SNAP-25 N-19 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) y los anticuerpos policlonales de ratón α-SNAP-25 SP12 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

Para preparar la solución de anticuerpo de captura, se purificaron los anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 contenidos en las ascitis de las líneas celulares de hibridoma 2E2A6 y 3C1A5, así como los anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 MC-6050 y MC-6053 usando un protocolo de purificación de Proteína A estándar. Todos los otros anticuerpos α-SNAP-25 se adquirieron como anticuerpos purificados.

Para preparar la solución de anticuerpo de detección, el anticuerpo α-SNAP-25 apropiado se conjugó con el reactivo de etiquetado del éster NHS de Rutenio(II)-tris-bipiridina-(4-metisulfonato) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación se llevó a cabo agregando 30 µL de solución madre MSD SULFO-TAG™

reconstituida con agua destilada a 200 µL de 2 mg/mL de anticuerpos policlonales α-SNAP-25 e incubando la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Los anticuerpos etiquetados se purificaron usando un protocolo de columna de centrifugación estándar y la concentración de proteína se determinó usando un ensayo de proteína colorimétrico estándar. La absorbancia del anticuerpo α-SNAP-25/conjugado de MSD SULFO-TAG™ se midió a 455 nm usando un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de anticuerpo de detección se almacenó a 4°C hasta que se necesitara.

Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura específico para un producto de la escisión de la SNAP-25, se agregaron aproximadamente 5 µL de la solución de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 apropiada (20 µg/mL en 1 x de PBS) a cada pocillo de una placa MSD de alta unión de 96 pocillos y la solución se dejó secar al aire en un gabinete de seguridad biológica durante 2 a 3 horas para que el líquido se evaporara de la solución. Los pocillos unidos por anticuerpo de captura luego se bloquearon agregando 150 µL de amortiguador de bloqueo que comprendía 2% de reactivo de bloqueo Amersham (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y 10% de suero de cabra (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente

durante 2 horas. Las placas bloqueadas se sellaron y se almacenaron a 4°C hasta que se necesitaron.

Para detectar la presencia de un producto de la escisión de la SNAP-25 escindida mediante análisis ELISA tipo sándwich ECL, se aspiró de los pocillos el amortiguador de bloqueo de placas almacenadas, se agregaron 25 µL de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida, como se describió anteriormente, a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante la noche. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pocillo tres veces con 200 µL de 1 x PBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego del lavado, se agregaron 25 µl de 5 µg/mL de solución de anticuerpo de detección que comprendía 2% de reactivo de bloqueo Amersham en 1 x de PBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se selló e incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Luego de la incubación del anticuerpo de detección, los pocillos se lavaron tres veces con 200 µL de 1 x de PBS y 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego de lavar se agregaron 150 µL de 1 x amortiguador Read (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y las placas se leyeron usando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se

calculó una proporción dividiendo la señal obtenida con la dosis de 10 nM para cada par de anticuerpos por la señal obtenida con la dosis de 0 nM para cada par de anticuerpos (Tabla 24). Estos resultados indicaron que entre las veintiséis combinaciones diferentes de pares de anticuerpos analizadas, solamente tres pares de anticuerpos tuvieron proporciones de señal a ruido por encima de 10:1 para la dosis más elevada analizada: el par No. 1 (mAb de ratón 2E2A6 y pAb de conejo S9684), el par No. 4 (mAb de ratón 3C1A5 y pAb de conejo S9684) y el par No. 18 (pAb de conejo S9684 y mAb de ratón 2E2A6). Se eligió el par de anticuerpos 1 para estudios adicionales.

Tabla 24. Análisis de combinaciones de anticuerpos α-SNAP-25

No. de par de anticuerpos	Anticuerpo de captura	Anticuerpo de detección	Producto de la escisión de la SNAP-25 de detección	Sustrato no escindido de la SNAP-25 de detección	Proporción señal/ruido (10 nM/0 nM)
1	mAb de ratón 2E2A6	pAb de conejo S9684	Sí	No	26.6:1
2	mAb de ratón 2E2A6	pAb de cabra N-19	Sí	No	7.3:1
3	mAb de ratón	pAb de conejo	Sí	No	0.9:1

	2E2A6	H-50			
4	mAb de ratón 3C1A5	pAb de conejo S9684	Sí	No	12.1:1
5	mAb de ratón 3C1A5	pAb de cabra N-19	Sí	No	1.9:1
6	mAb de ratón 3C1A5	pAb de conejo H-50	Sí	No	0.9:1
7	pAb de cabra C-18	pAb de conejo S9684	No	No	0.8:1
8	pAb de cabra C-18	pAb de cabra N-19	No	No	0.9:1
9	pAb de cabra C-18	pAb de conejo H-50	No	No	0.9:1
10	pAb de conejo H-50	mAb de ratón 2E2A6	Sí	No	0.9:1
11	pAb de conejo H-50	pAb de cabra C-18	No	No	1.0:1
12	pAb de cabra N-19	mAb de ratón 2E2A6	Sí	No	0.9:1
13	pAb de cabra N-19	pAb de cabra C-18	No	No	1.1:1
14	pAb de conejo NTP	pAb de cabra N-19	Sí	No	1.2:1

	23				
15	pAb de conejo NTP 23	pAb de cabra C-18	No	No	1.1:1
16	pAb de conejo NTP 23	pAb de ratón SP12	Sí	No	1.3:1
17	pAb de conejo NTP 23	pAb de conejo H-50	Sí	No	1.1:1
18	pAb de conejo S9684	mAb de ratón 2E2A6	Sí	No	21.3:1
19	pAb de conejo S9684	pAb de cabra C-18	No	No	0.7:1
20	pAb de conejo S9684	mAb de ratón SMI-	Sí	Sí	1.2:1
21	mAb de ratón SMI-81	pAb de conejo S9684	Sí	Sí	1.1:1
22	mAb de ratón SMI-81	pAb de cabra N-19	Sí	Sí	1.0:1
23	mAb de ratón	pAb de cabra	No	No	0.8:1

	SMI-81	C-18			
24	pAb de ratón SP12	pAb de cabra C-18	No	No	1.0:1
25	mAb de ratón MC-6050	pAb de conejo S9684	Sí	Sí	5.0:1
26	mAb de ratón MC-6053	pAb de conejo S9684	Sí	Sí	7.1:1

Ejemplo X

Método basado en inmunoensayos para detectar endopeptidasa redirigida con una actividad enzimática de cadena ligera de la BoNT/A usando un ELISA tipo sándwich ECL

El siguiente ejemplo ilustra métodos basados en inmunoensayos para detectar la actividad de endopeptidasa redirigida detectando un producto de la escisión de la SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 específico para un producto de la escisión de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A mediante un ELISA tipo sándwich ECL.

Para preparar un lisado a partir de células tratadas con una endopeptidasa redirigida con actividad enzimática de

cadena ligera de la BoNT/A, se colocó una densidad adecuada de células de una línea celular establecida en los pocillos de placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contenían 100 µL del medio apropiado. Estas células luego se incubaron en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono durante aproximadamente 24 horas. Se aspiró el medio de las células de cada pocillo y se reemplazó con medio recién preparado que contenía 0 (muestra sin tratar) o una de las dosis determinadas de un experimento de dosis-respuesta para esa endopeptidasa redirigida. Luego de una incubación de 24 horas, las células se lavaron y se recolectaron.

Para preparar la solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25, el anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 S9684 contenido en las ascitas de la línea celular de hibridoma 2E2A6 se purificó usando un protocolo de purificación de Proteína A estándar. Para preparar la solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25, se conjugó anticuerpo policlonal de conejo α-SNAP-25 S9684 (Sigma, San Luis, MO) con el reactivo de etiquetado del éster de NHS de Rutenio(II)-tris-bipiridina-(4-metisulfonato) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación, la purificación del anticuerpo α-SNAP-25 etiquetado, la determinación de la

concentración y el almacenamiento fueron como se describió en el Ejemplo VI.

Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura específico para un producto de la SNAP-25 escindida, se agregaron aproximadamente 5 µL de la solución 2E2A6 de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 (20 µg/mL en 1 x de PBS) a cada pocillo de una placa MSD de alta unión de 96 pocillos y la solución se dejó secar al aire en un gabinete de seguridad biológica durante 2 a 3 horas para que el líquido se evaporara de la solución. Los pocillos unidos con anticuerpo de captura luego se bloquearon y se utilizaron directamente para detectar la actividad de la endopeptidasa redirigida.

Para detectar la presencia de un producto de la SNAP-25 escindida mediante un análisis ELISA tipo sándwich ECL, se aspiró de los pocillos el amortiguador de bloqueo de placas almacenadas, se agregaron 25 µL de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida desde cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante la noche. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pocillo tres veces con 200 µL de 1 x PBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego del lavado, se agregaron 25 µl de 5 µg/mL de solución de anticuerpo de detección que comprendía 2% de reactivo de

bloqueo Amersham en 1 x de PBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se selló e incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Luego de la incubación del anticuerpo de detección, los pocillos se lavaron tres veces con 200 µL de 1 x de PBS y 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego de lavar se agregaron 150 µL de 1 x amortiguador Read (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y las placas se leyeron usando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Los datos recolectados se analizaron y la EC_{50} se calculó como se describió en el Ejemplo VI. Para las endopeptidasas redirigidas desde opioides, estos resultados indicaron que, en promedio, se detectó 1.0 nM de Noc/A en la EC_{50} (un intervalo de alrededor de 0.3 nM a alrededor de 2.0 nM) con una proporción de señal a ruido para la asíntota inferior de alrededor de 15:1 a alrededor de 20:1 y una proporción de señal a ruido para la asíntota superior de alrededor de 180:1 a alrededor de 300:1.

Ejemplo XI

Método basado en inmunoensayos para detectar la actividad de la endopeptidasa redirigida usando un ELISA tipo sándwich CL

El siguiente ejemplo ilustra métodos basados en inmunoensayos para detectar la actividad de endopeptidasa redirigida detectando un producto de la escisión de la SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 específico para una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A mediante un ELISA tipo sándwich CL.

Los lisados de las células tratadas con una endopeptidasa redirigida y la solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25 se prepararon como se describió en el Ejemplo VII.

Para preparar la solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25, el anticuerpo policlonal α-SNAP-25 S9684 (Sigma, San Louis, MO) se conjuga con peroxidasa de rábano picante (HRP) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). La reacción de conjugación se realizará agregando a 500 µL de 1 mg/mL de anticuerpos policlonales α-SNAP-25 a un frasco que contenía peroxidasa activada liofilizada, mezclando los componentes y luego agregando 10 µL de cianoborohidruro de sodio. Esta mezcla de reacción se incubará a temperatura ambiente durante 1 hora en una campana de humo. Luego de inactivar la reacción, los

anticuerpos etiquetados se purificarán usando un protocolo de columna de centrifugación estándar y la concentración de proteína se determinará usando un ensayo de proteína colorimétrico estándar. La absorbancia del conjugado de anticuerpo policlonal α-SNAP-25/HRP se medirá a 455 nm usando un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 se almacenará a 4°C hasta que se necesite.

Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura α-SNAP-25 específico para el producto escindido de la SNAP-25, se agregarán aproximadamente 100 µL de solución de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 2E2A6 (1 mg/mL en 1 x de PBS) a cada pocillo de una placa blanca de Greiner de 96 pocillos y las placas se incubarán a 4°C durante la noche y luego se desechará toda solución de anticuerpo en exceso. Los pocillos unidos por anticuerpo de captura luego se bloquearán agregando 150 µL de amortiguador de bloqueo con 2% de reactivo de bloqueo Amersham (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y 10% de suero de cabra (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 1 hora. El amortiguador de bloqueo se desechará y las placas se transferirán secas a toallas de papel con inversión y golpes suaves. Los pocillos unidos con anticuerpo de captura luego se bloquearán y se utilizarán directamente para detectar la actividad de la endopeptidasa redirigida.

Para detectar la presencia de un producto de la SNAP-25 escindida mediante un análisis ELISA tipo sándwich CL, se agregarán 50 µL de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida desde cada pocillo, la placa se sellará y la placa sellada se incubará en un agitador con rotación a 500 rpm a 4°C durante 2-4 horas toda la noche. Los pocillos de la placa se lavarán tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pocillo tres veces con 200 µL de 1 x PBS y 0.05 % de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego del lavado, se agregarán 100 µl de 1 mg/mL de solución de anticuerpo de detección HRP/anticuerpo policlonal α-SNAP-25 con 2% de reactivo de bloqueo Amersham en 1 x de PBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se sellará e incubará en un agitador con rotación a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de la incubación del anticuerpo de detección, los pocillos se lavarán tres veces con 200 µL de 1 x de PBS y 0.05% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego del lavado se agregarán 100 µl de mezcla 1:1 de SuperSignal ELISA Pico (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a cada pocillo y las placas se leerán usando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Los datos recolectados se analizarán y la EC_{50} se calculará como se describió en el Ejemplo VI.

Ejemplo XII

Método basado en inmunoensayos para detectar la actividad de la endopeptidasa redirigida usando un ELISA tipo sándwich ECL Múltiple

El siguiente ejemplo ilustra métodos basados en inmunoensayos múltiples para detectar la actividad de la endopeptidasa redirigida detectando un producto de la escisión de la SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 específico para un producto de la escisión de la SNAP-25 y un segundo par de anticuerpos para una proteína diferente.

Se puede realizar un ensayo de potencia de la endopeptidasa redirigida usando un ELISA tipo sándwich ECL múltiple. Tal ensayo se describe en la solicitud de patente acompañante de Ester Fernandez-Salas, et al., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, solicitud de patente estadounidense No. de serie: 12/403,531, que se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia y se puede usar empleando las líneas celulares y las endopeptidasas redirigidas y las líneas celulares correspondientes descritas en la presente memoria descriptiva.

Ejemplo XIII

Método basado en inmunoensayos para detectar la actividad de la endopeptidasa redirigida usando un ELISA tipo sándwich EC Múltiple

El siguiente ejemplo ilustra métodos basados en inmunoensayos múltiples para detectar la actividad de la endopeptidasa redirigida detectando un producto de la escisión de la SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 especifico para un producto de la escisión de la SNAP-25 y un segundo par de anticuerpos para una proteína diferente.

Se puede realizar un ensayo de potencia de la endopeptidasa redirigida usando un ELISA tipo sándwich EC múltiple. Tal ensayo se describe en la solicitud de patente acompañante de Ester Fernandez-Salas, et al., *Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays*, solicitud de patente estadounidense No. de serie: 12/403,531, que se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia y se puede usar empleando las líneas celulares y las endopeptidasas redirigidas y las líneas celulares correspondientes descritas en la presente memoria descriptiva.

Ejemplo XIV

Método basado en inmunoensayos para detectar las cantidades nanomolares de endopeptidasas redirigidas

El siguiente ejemplo ilustra cómo realizar métodos basados en inmunoensayos para detectar cantidades nanomolares de actividad de la endopeptidasa redirigida.

1. Método basado en inmunoensayos para detectar endopeptidasas redirigidas usando un ELISA tipo sándwich ECL

Para preparar un lisado de células tratadas con una endopeptidasa redirigida, se colocaron aproximadamente 50,000 a 150,000 células de una línea celular establecida adecuada para el ensayo en los pocillos de placas de poli-D-lisina de cultivo de tejido de 96 pocillos que contenían 100 µL del medio apropiado (véanse los Ejemplos I y II). Estas células se incubaron en un incubador a 37°C con 5% de dióxido de carbono durante 24 horas. Se aspiró el medio de las células de cada pocillo y se reemplazó con medio recién preparado que contenía 0 (muestra sin tratar) y la respuesta a la dosis apropiada como se describió para cada endopeptidasa redirigida en esta solicitud. Luego de una incubación de 24 horas, las células se lavaron y se recolectaron o incubaron durante dos días adicionales sin endopeptidasa redirigida desdentes de la

recolección. Para recolectar las células, se aspiró el medio, se lavó con 1 x de PB y se lisó agregando 30 µL de amortiguador de lisis que comprendía 50 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 1.5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de EGTA y 1% de Tritón X-100 a cada pocillo y la placa se incubó en un agitador con rotación a 500 rpm durante 30 minutos a 4°C. La placa se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C para sedimentar los residuos celulares y el sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpo de captura para realizar la etapa de detección.

La solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25, la solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 y el soporte de fase sólida que comprendía el anticuerpo de captura específico para un producto de la SNAP-25 escindida se prepararon como se describió en el Ejemplo VII.

Para detectar la presencia de un producto de la SNAP-25 escindida mediante análisis ELISA tipo sándwich ECL, se aspiró el amortiguador de bloqueo de las placas almacenadas, se agregaron 25-30 µL de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida desde cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante 2 horas o 24 horas. Los pocillos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pocillo tres veces con 200 µL de 1 x PBS, 0.1%

de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego del lavado, se agregaron 25 µl de 5 µg/mL de solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 que comprendía 2% de reactivo de bloqueo Amersham en 1 x de PBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se selló e incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Luego de la incubación del anticuerpo de detección α-SNAP-25, los pocillos se lavaron tres veces con 200 µL de 1 x de PBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego del lavado, las placas se procesaron, los datos recolectados se analizaron y la EC_{50} se calculó como se describió en el Ejemplo VI. Estos resultados indicaron que, en promedio, se detectó 1.0 nM de Noc/A en la EC_{50}, al usar células de la línea celular clonal SK-N-DZ #3 (un intervalo de alrededor de 0.3 nM a alrededor de 2.0 nM) con una proporción de señal a ruido para la asíntota superior de alrededor de 20:1 a alrededor de 300:1. Adicionalmente, en promedio, se detectaron 3.7 nM de Noc/A en la EC_{50}, al usar células de la línea celular clonal AGN P33 #6 (un intervalo de alrededor de 2.0 nM a alrededor de 5.5 nM) con una proporción de señal a ruido para la asíntota superior de alrededor de 20:1 a alrededor de 500:1. Para las células SK12 específicas para la endopeptidasa redirigida con un ligando A de dinorfina, en promedio, se detectaron 8.4 nM de Dyn/A en la EC_{50}, al usar células SK12 (un intervalo de

alrededor de 4.5 nM a alrededor de 10.0 nM) con una proporción de señal a ruido para la asíntota superior de alrededor de 10:1 a alrededor de 20:1. Adicionalmente, en promedio, se detectaron 8.8 nM de TVEMP de galanina en la EC_{50}, al usar células de la línea celular clonal Neuro-2a #7 (un intervalo de alrededor de 5.0 nM a alrededor de 15.5 nM) con una proporción de señal a ruido para la asíntota superior de alrededor de 20:1 a alrededor de 200:1. Este método también se puede realizar en forma múltiple como se describe en el Ejemplo IX.

2. Método basado en inmunoensayos para detectar endopeptidasas redirigidas usando un ELISA tipo sándwich CL

Los lisados de las células tratadas con una endopeptidasa redirigida y la solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25 se prepararán como se describió en el Ejemplo VII. La solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 y el soporte de fase sólida con el anticuerpo de captura específico para el producto escindido de la SNAP-25 se prepararán como se describió en el Ejemplo VIII.

Para detectar la presencia de un producto de la SNAP-25 escindida mediante un análisis ELISA tipo sándwich CL, se agregarán 100 µL de un lisado de células tratadas con endopeptidasa redirigida desde cada pocillo, la placa se

sellará y la placa sellada se incubará en un agitador con rotación a 500 rpm a 4°C durante 2 horas o 24 horas. Los pocillos de la placa se lavarán tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pocillo tres veces con 200 µL de 1 x de PBS y 0.05 % de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego del lavado, se agregarán 100 µl de 1 mg/mL de solución de anticuerpo de detección HRP/anticuerpo policlonal α-SNAP-25 con 2% de reactivo de bloqueo Amersham en 1 x de PBS, 0.1% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)) a cada pocillo, la placa se sellará e incubará en un agitador con rotación a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de la incubación del anticuerpo de detección, los pocillos se lavarán tres veces con 200 µL de 1 x de PBS y 0.05% de TWEEN-20® (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)). Luego del lavado se agregarán 100 µl de mezcla 1:1 de SuperSignal ELISA Pico (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a cada pocillo y las placas se leerán usando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Los datos recolectados se analizarán y la EC_{50} se calculará como se describió en el Ejemplo VI. Este método también se puede realizar en forma múltiple como se describe en el Ejemplo IX.

Ejemplo XV

Método basado en inmunoensayos para detectar anticuerpos neutralizantes de la endopeptidasa α-redirigida

El siguiente ejemplo ilustra cómo realizar un método basado en inmunoensayos que puede detectar la presencia de anticuerpo α-Noc/A neutralizante.

Noc/A está en evaluación actualmente para el tratamiento de afecciones dolorosas, algunas de ellas crónicas. Con el tratamiento repetido y a largo plazo de Noc/A, un paciente puede desarrollar anticuerpos α-Noc/A neutralizantes para la endopeptidasa redirigida, lo que lleva a la inmunoresistencia. Los anticuerpos α-Noc/A neutralizantes inhibirán la actividad de la endopeptidasa redirigida deteniendo la absorción de la endopeptidasa redirigida en células neuronales y otras mediante la unión al ligando de direccionamiento y/o el dominio de desplazamiento (H_N) de la endopeptidasa redirigida. No hay un ensayo establecido para determinar la presencia de los anticuerpos α-Noc/A neutralizantes en la sangre del paciente. Sería más costoso y eficiente si se pudiera desarrollar un ensayo basado en células para detectar anticuerpos neutralizantes en pacientes tratados con endopeptidasas redirigidas.

Para detectar la presencia o la ausencia de anticuerpos α-Noc/A neutralizantes, se pueden usar los métodos basados en inmunoensayos para determinar la actividad de la endopeptidasa redirigida descrita en la presente memoria descriptiva. Una forma es determinar la cantidad de producto de la escisión de la SNAP-25 presente luego del tratamiento con diversas concentraciones de Noc/A usando un método de detección de transferencia Western, la otra forma es utilizar un método de detección ELISA tipo sándwich ECL.

Para preparar una muestra con anticuerpos α-Noc/A neutralizantes, se aisló suero de la sangre de un mono inmunizado con Noc/A y los anticuerpos se purificaron por afinidad. Los conejos también se inmunizaron con el péptido variante de nociceptina, el ligando de direccionamiento presente en la molécula de Noc/A, se recolectó su suero y los anticuerpos se purificaron por afinidad (anticuerpos policlonales anti-nociceptina).

Para preparar un lisado de células tratadas con una muestra con Noc/A, se sembraron células de la línea celular clonal SK-N-DZ #3 y células de la línea celular clonal AGN P33 #6 en placas de 96 pocillos de poli-D-lisina durante 16-18 horas. Se diluyeron 0-3 µg/mL de pAb anti-nociceptina en RPMI SFM (con complementos N2, B27 y NGF) que contenían 1 nM de

Noc/A y la mezcla se preincubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego las soluciones se agregaron a las células y se incubaron durante 24 h antes de realizar el ensayo ELISA ECL. Este anticuerpo variante anti-nociceptina bloqueó completamente la absorción de 1 nM de Noc/A en 1 µg/mL (inhibición >90%) en ambas líneas celulares. El anticuerpo policlonal de mono anti-Noc/A también se analizó para estas líneas celulares. Las células se colocaron en una placa de poli-D-lisina de 96 pocillos a 100,000 células por pocillo durante 24 horas en medio de crecimiento RPMI complementado con N2, B27 y NGF. Se diluyeron los anticuerpos policlonales anti-Noc/A a 0-20 µg/mL en medio que contenía 1 nM de Noc/A y la mezcla se preincubó a temperatura ambiente durante 1 h. Luego la mezcla se agregó a las células y se incubó durante 24 h antes de realizar el ensayo ELISA ECL. Se observó una inhibición de hasta el 60% en concentraciones más elevadas de 6-20 µg/mL de pAb anti-Noc/A en la línea celular SK-N-DZ y alrededor de 30% en la línea celular clonal AGN P33 #6. Esto se puede deber a que los anticuerpos policlonales anti-Noc/A no son específicos para el sitio de unión y contienen otros anticuerpos que unen otras partes de la molécula que produce solamente un bloqueo parcial en las concentraciones analizadas. Se pueden necesitar concentraciones más elevadas para lograr un bloqueo completo.

Para detectar la presencia de un producto de la SNAP-25 escindida mediante análisis de transferencia Western, se aspiró el medio de cada pocillo, las células se suspendieron en 50 µL de amortiguador de carga SDS-PAGE y luego se calentó hasta 95°C durante 5 minutos. Se analizará una alícuota de cada muestra recolectada mediante transferencia Western como se describió en el Ejemplo I, salvo porque las muestras recolectadas se separarán mediante SDS-PAGE usando 12% de geles de criterio de 26 pocillos (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA) y el suero del anticuerpo α-SNAP-25_{197} policlonal de conejo se utilizará como anticuerpo principal (véase el Ejemplo V). Los resultados revelarán la menor concentración de endopeptidasa redirigida que producirá una banda detectable de producto de la escisión de la SNAP-25 en la transferencia Western.

Para detectar la presencia de un producto de la SNAP-25 escindida mediante ELISA tipo sándwich ECL, se retiró el medio de cada pocillo y las células se lisaron como se describió en Ejemplo VI. La solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25, la solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 y el soporte de fase sólida α-SNAP-25 se prepararon como se describió en el Ejemplo VIII. Los sobrenadantes se transfirieron a un soporte de fase sólida α-SNAP-25 y se realizó el ensayo ELISA tipo sándwich ECL como se detalló en el Ejemplo VI. Se analizaron

los datos recolectados y se calculó la EC_{50} como se describió en el Ejemplo VI, salvo porque la EC_{50} es la dilución de suero necesaria para inhibir la actividad de la endopeptidasa redirigida hasta ½ de su máximo y se obtuvo la proporción de señal máxima ($Señal_{Max}$) a la señal mínima ($Señal_{Min}$) dividiendo la señal del producto de la escisión de la SNAP-25 obtenida con la mayor dilución de anticuerpo por la señal obtenida con la menor dilución de anticuerpo.

Los resultados indican que se puede detectar la presencia de anticuerpos α-Noc/A neutralizantes en el suero de monos y la presencia de anticuerpos variantes α-nociceptina de conejos. La actividad de la molécula de Noc/A incubada en anticuerpos purificados por afinidad del animal inmunizado disminuyó a medida que disminuía la dilución de anticuerpo. Se realizará el mismo ensayo con los compuestos de Dyn/A y TVEMP-galanina, utilizando las líneas celulares específicas para cada compuesto que se desea analizar.

Ejemplo XV

Desarrollo de un ensayo basado en células para una endopeptidasa redirigida desde la galanina

El siguiente ejemplo demuestra cómo identificar líneas celulares establecidas que poseen la capacidad de absorción de endopeptidasa redirigida necesaria para desarrollar un ensayo de potencia basado en células.

Crecimiento de cultivo madre de líneas celulares candidatas

El crecimiento de líneas celulares, una densidad adecuada de células de la línea celular que se está analizando se colocaron en placas en un matraz de cultivo de tejido de 162 cm^2 que contiene 30 mL de un medio de cultivo adecuado (véase Tabla 25) y se cultivaron en un incubador a 37°C en 5% o 10% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaran la densidad deseada.

Tabla 25. Tabla de resumen de todas las líneas celulares y sus medios respectivos

Tipo celular; descripción; fuente	Medio completo (CM) Todos de Invitrogen (salvo que se especifique lo contrario)	Medio libre de suero (SFM) Todos de Invitrogen (salvo que se especifique lo contrario)

SiMa (línea celular de neuroblastoma humano, DSMZ# ACC 164, Brunswick, Alemania) SiMa H1 (línea celular clonada a partir de células SiMa)	RPMI 1640 (90 %) Suero bovino fetal (FBS, 10%) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 nM) Penicilina (100 U por ml) Estreptomicina (100 µg por ml)	RPMI 1640 (90 %) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 nM) Penicilina (100 U por ml) Estreptomicina (100 µg por ml) Complemento N2 (1x) Complemento B27 (1x)
Neuro-2a (Neuroblastoma de ratón: (ATCC#CCl131, Manassas, VA,)	MEM de Earle (90 %) Suero bovino fetal (10%) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 mM), Penicilina (100 U por ml), Estreptomicina (100 µg por ml)	EMEM (90 %) NEAA (0.1 mM), HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 mM), Penicilina (100 U por ml), Estreptomicina (100 µg por ml)
PC-12 Feocromocitoma de rata	RPMI 1640 (90 %) FBS dializado (5%) Suero de caballo (10%)	Medio de diferenciación: RPMI 1640 (90 %)

(ATCC # CRL-1721)	HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 nM) D-glucosa (0.5%, Sigma) Penicilina (100 U por ml), Estreptomicina (100 µg por ml) Complemento N2 (1x)	HEPES (10 mM), Piruvato de sodio (1 nM) D-glucosa (0.5%, Sigma) Penicilina (100 U por ml), Estreptomicina (100 µg por ml) Complemento N2 (1x) Albúmina de suero bovino (0.2 % p/v) NGF (50 ng por ml, Promega)
P19 Carcinoma embriónico de ratón (ATCC # CRL-1825)	Alfa MEM (90 %) Suero de ternero bovino (7.5 %) FBS (2.5 %) Penicilina (100 U por ml), Estreptomicina (100 µg por ml)	Alfa MEM (90 %) FBS (2.5 %) Penicilina (100 U por ml), Estreptomicina (100 µg por ml)
NEAA: Aminoácidos no esenciales, MEM: Medio esencial mínimo. DMEM: MEM de Dulbecco. EMEM- MEM de Earle. Obsérvese que las células PC-12		

se diferenciaron en medio de diferenciación y no en SFM.

2. Análisis de líneas celulares comerciales para determinar la sensibilidad a los compuestos de galanina-TVEMP galanina

Las líneas celulares comerciales se analizaron para determinar su sensibilidad a los compuestos de TVEMP-galanina según medida a través de la escisión de la SNAP25 luego del tratamiento con los compuestos correspondientes. Se utilizaron diversos compuestos de TVEMP-galanina para el estudio y el análisis. Las células PC-12, Neuro-2a, SiMa y P19 se colocaron en medio libre de suero durante tres días o en CM durante un día. Estas células diferenciadas e indiferenciadas se trataron durante 18 horas con el lote A de TVEMP-galanina en concentraciones de 0 y 75 nM. El lote A de TVEMP-galanina mostró actividad tanto en las células PC-12 como Neuro-2a, según se observó mediante la mayor presencia de SNAP25 escindida y células Neuro-2a en el estado diferenciado son más sensibles a los compuestos de TVEMP con el ligando de galanina que las células no diferenciadas. El orden de rangos en la actividad de las células muestra que las células PC-12 tienen la mayor actividad, seguidas por Neuro-2a y, por último, SiMa. No es necesario determinar si la absorción fue específica para estos compuestos redirigidos a la galanina y, por lo tanto,

fue importante analizar las células con otros compuestos que no contienen el ligando de galanina. Noc/A es un compuesto redirigido que contiene un ligando variante de nociceptina y LH_N/A (un control negativo) un compuesto que carece del dominio de unión. La absorción de LH_N/A no es específica y debería tener una actividad significativamente menor que el compuesto de TVEMP-galanina si la línea celular posee absorción específica para el compuesto redirigido. El compuesto de Noc/A ha mostrado previamente tener absorción específica en las células SiMa y se utilizará como una referencia para analizar las líneas celulares. Una línea celular favorable debería tener baja absorción del compuesto LH_N/A y Noc/A y alta absorción del compuesto de TVEMP-galanina. La Tabla 26 muestra los resultados de este experimento.

Tabla 26. Análisis de células PC-12, Neuro-2a y SiMa en condiciones diferentes usando TVEMP-galanina.

		Lote A de TVEMP-galanina	Lote B de TVEMP-galanina	LH_N/A	Noc/A
Conc. (mg/mL)		0.168	0.175	1.63	1.00
Valores de EC_{50} (nM)	PC-12, indiferenciadas	73.4 ± 10.7	105.6 ± 16.0	>200	72.9 ± 26.9
	SiMa, indiferenc	138.6 ± 43.9	133.8 ± 24.2	>300	48.3 ± 18.1

iadas				
Neuro-2a, indiferenciadas	122.4 ± 15.7	116 ± 17.5	>200	>150
SiMa, Dif O/N	>400	>150	>400	16.1 ± 11.9
Neuro-2a Dif 4 d		34.5 ± 7.5	39.7 ± 5.6	105.9 ± 44.3
SiMa, Dif 4 d	101.8 ± 20.5	65.3 ± 7.8	>150	88.7 ± 23.3

Análisis de los lotes A y B de TVEMP-galanina y los controles de LH_N/A y Noc/A en diversas líneas celulares y condiciones de crecimiento/diferenciación. Cuadro de resumen que muestra detalles de cada compuesto analizado más valores de EC_{50}.

Los resultados muestran que el lote A de TVEMP-galanina y el lote B de TVEMP-galanina tienen gráficas o valores de EC_{50} similares o solamente 1-2 veces más activos que los controles negativos en las líneas celulares analizadas. Estos datos hacen suponer que las células naturales no son suficientemente sensibles y que estas células deberán ser transfectadas con los plásmidos que codifican los receptores GalR1 o GalR2 de las proteínas del receptor de galanina.

3. Transfección estable de células PC-12, Neuro-2a y SiMa con GalR

Un día antes de la transfección, las células se sembraron a densidades de 0.5 x 10^6 células/pocillo en una placa de 6 pocillos recubierta con colágeno IV (Cat#354554: BD Biosciences) (SiMa, PC-12) o una placa Costar de 6 pocillos (Cat# 3516: Corning) (Neuro-2a). Las transfecciones se realizaron diluyendo 12 µl de Lipofectamine™ 2000 (Cat # 52758, Invitrogen) en 250 µl de medio de suero reducido Opti-MEM® I (Cat# 3195, Invitrogen) seguido por incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se mezclaron cuatro microgramos de ADN del plásmido GalR con 0.4 µg del vector pAdVantage™ (1 mg por ml, Cat#E1711, Promega) en 250 µl de medio de suero reducido Opti-MEM® I durante 5 minutos. Luego de 5 minutos de incubación, el Lipofectamine™ 2000 diluido y el ADN de plásmidos diluido se mezclaron e incubaron durante 20 min adicionales a temperatura ambiente, para formar un complejo. Mientras tanto, las células se lavaron con OPTI-MEM® y se agregaron 0.5 ml de OPTI-MEM® a cada pocillo. Luego de una incubación de 20 minutos, se agregaron cuidadosamente 0.5 ml que contenían los complejos de Lipofectamine™ 2000 diluido y ADN de plásmidos diluido a los pocillos que contenían células en 0.5 ml de OPTI-MEM®. La placa se incubó a 37°C durante 5 horas, luego de lo cual se agregó 1 ml de medio

completo. El día siguiente, el medio se reemplazó con medio de crecimiento durante 48 horas. El día 4, luego de recuperar las células de la transfección, se reemplazó el medio de crecimiento con medio de crecimiento recién preparado que contenía Geneticin® (Cat #10131: Invitrogen) a 0.5 mg por ml (dilución de 1:100) y se incubó durante 3 días adicionales. El día 7 luego de la transfección, las células se transfirieron a un matraz con colágeno IV de 75 cm (Cat# 35423: BD Biosciences) que contenía medio de crecimiento y geneticina (0.5 mg por ml, dilución de 1:100). En esta transferencia, aproximadamente el 90% de las células se encontraban muertas y se retiraron durante el cambio de medio. El medio de crecimiento que contenía geneticina (0.5 mg por ml, dilución 1:100) se cambió cada dos días hasta el día 21.

Para la selección de células estables que pueden absorber compuestos de TVEMP galanina, se analizaron los parámetros para determinar los clones que producían el mayor porcentaje de escisión de la SNAP25 con el tratamiento con TVEMP-galanina en el ELISA tipo sándwich ECL, usando placas recubiertas con 2E2A6 monoclonal para la captura y anticuerpo sulmarcado con SNAP25 policlonal (Sigma Cat # S9684) para la detección. Los valores de EC_{50} en la Tabla 27 muestran que el lote D de TVEMP-galanina presenta al menos una absorción 10 veces mayor que el control negativo en las células SiMa y

Neuro-2a con GalR1 y GalR2 y una absorción solamente 2-4 veces mayor en células transfectadas con PC-12. Dado que las células transfectadas con PC-12 parecen tener sensibilidad y especificidad más bajas que las células SiMa y Neuro-2a, no se clonarán. Asimismo, dado que el ligando de galanina 1-16 mer en los compuestos de TVEMP-galanina se une al receptor GALR1 con más afinidad que a GALR2, solamente se colonarán las células transfectadas con GALR1. La figura también muestra que los lotes C y D de TVEMP-galanina presentan una absorción 9-10 mayor que LH_N/A y el compuesto de nociceptina redirigida TVEMP-nociceptina en el GalR1 de Neuro-2a.

Tabla 27. Prueba de poblaciones transfectadas de forma estable pero no clonales de SiMa, Neuro-2a y PC12 transfectada con los receptores GalR1 o GalR2

		TVEMP-galanina C	TVEMP-galanina D	LH_N/A	TVEMP-nociceptina
Conc. (mg/mL)		1.260	0.303	1.46	1.00
Valores de EC_{50} (nM)	GalR1 de SiMa		36.2 ± 8.6	>300	
	GalR2 de SiMa		26.6 ± 6.7	>300	
	GalR1 de		64.1 ± 19.5	202.7	

	PC-12				
	GalR2 de PC-12		>150	>300	
	GalR1 de Neuro-2a	32.2 ± 3.3	40.8 ± 6.0	>300	>300
	GalR2 de Neuro-2a	35.2 ± 3.1	46.0 ± 6.1	>300	>300

Las poblaciones no clonales seleccionadas no son una buena población de células para su uso regular debido a que contienen una mezcla de células que expresan diferentes niveles de receptor y estas poblaciones pueden cambiar con el tiempo. Para obtener líneas celulares estables derivadas de células individuales, se inició un enfoque de clonación por dilución. El día 21, las células transfectadas se tripsinizaron, se disociaron con agujas y se contaron. Las líneas celulares transfectadas restantes se congelaron para futuros usos. Las células se diluyeron en serie hasta 10 células por ml en medio de crecimiento que contenía geneticina (0.5 mg por ml, dilución 1:100). Se colocaron placas recubiertas con colágeno IV de 2 x 96 pocillos (SiMa, PC-12) placas Costar de 2 x 96 pocillos (Neuro-2a) a 100 µl por pocillo para lograr una densidad de 1 célula por pocillo. Las placas se volvieron a colocar en el incubador y de dejaron

intactas durante dos semanas para la formación de colonias. Luego de dos semanas (día 35), los pocillos se verificaron cuidadosamente para determinar la presencia de colonias individuales formadas en el fondo del pocillo (todo el pocillo se verificó cuidadosamente para determinar colonias múltiples). Al identificar un solo grupo de células en un pocillo, todo ese pocillo se sometió a un escrutinio cuidadoso para asegurarse de que solo había presente un solo grupo de células. Se tomó una fotografía de ese único grupo. En caso de haber alguna duda con respecto a grupos adicionales, el pocillo no se seleccionaba. El día 36, los clones que se seleccionaron se separaron con TrypLE y se agregaron 0.5 ml de medio completo que contenía geneticina (0.5 mg por ml, dilución 1:100) para detener la reacción de tripsina. Todo el volumen se transfirió a placas de 6 pocillos y se diluyó adicionalmente con 3.0 ml de medio completo adicional que contenía geneticina (0.5 mg por ml, dilución 1:100). Los clones se dejaron crecer hasta una confluencia del 90%, luego se tripsinizaron nuevamente y se transfirieron a matraces de Colágeno IV o Costar de 75 cm con 10.0 ml de medio completo que contenía geneticina (0.5 mg por ml, dilución 1:100). Una vez que se volvió a lograr una confluencia del 90% para las células, estas se utilizaron para cargar tres crioviales para almacenamiento con congelación o se utilizaron para el

análisis en el ensayo ELISA para determinar los compuestos de galanina redirigida.

Se usó el lote C del compuesto TVEMP-galanina de referencia para analizar estos clones usando dos operadores que realizaban pruebas independientes. Los clones del GalR1 de SiMa crecieron lentamente y no se pudieron analizar en ese momento. Afortunadamente, los clones de Neuro-2a crecieron más rápido y pronto hubo cantidades suficientes de 8 de los 12 clones para el análisis. Estas células clonales del GalR1 de Neuro-2a se analizaron con un intervalo de dosis completa de los compuestos de TVEMP-galanina (0-300 nM) y los resultados de nueve de estos clones se muestran a continuación. Los cuatro clones restantes crecieron muy lentamente y no se analizaron. Las células originales seleccionadas pero no clonales se colocaron en placas, junto con los clones que se deseaba utilizar como referencia. La Tabla 28 muestra la actividad de cada uno de los ocho clones junto con las células del GalR1 de Neuro-2a no clonales seleccionadas, al realizar el análisis con el compuesto de TVEMP-galanina. De los ocho clones analizados, solamente los clones #4, 7 y 12 mostraron una buena absorción del compuesto de TVEMP-galanina con valores de EC_{50} aceptables. Los clones del GalR1 de Neuro-2a # 1, 3 y 10 no absorbieron el compuesto de TVEMP-galanina, mientras que los clones #5, 11 y 13, junto con la población no

clonal generaron valores de EC_{50} muy elevados y no se realizaron análisis adicionales con estas células.

Tabla 28. Resultados del análisis de clones derivados de células únicas del GalR1 de Neuro-2a con el lote C de TVEMP-galanina

		EC50 ± error estándar (nM)	
Placa	Tipo celular	Operador 1	Operador 2
1	N2A No clonal	82.1±9.6	92.0±10.8
1	GALR1 de N2A, Clon #1	>300	>300
1	GALR1 de N2A, Clon #3	>300	>300
1	GALR1 de N2A, Clon #4	39.7±3.4	39.4±6.6
2	N2A No clonal	211.2±167.7	116.0±26.8
2	GALR1 de N2A, Clon #5	202.6±82.9	113.0±18.1
2	GALR1 de N2A, Clon #7	23.1±3.3	15.5±1.8
2	GALR1 de N2A, Clon #10	>300	>300
3	GALR1 de N2A, Clon #7	20.3 ± 1.6	38.0±6.3
3	GALR1 de N2A, Clon #11	270.0±243	247.0±101
3	GALR1 de N2A, Clon #12	43.2±5.2	57.5±14.3
3	GALR1 de N2A, Clon #13	144.1±143	184.7±15.6

4. Caracterización de la expresión de GalR1 en las líneas celulares clonales

El análisis de los clones mostró que solamente los clones # 4, 7 y 12 son más sensibles que las células no clonales. Se extrajo el ARN mensajero (ARNm) de estos 3 clones, así como las células Neuro-2a no clonales transfectadas de forma estables y originales no transfectadas para la caracterización mediante RT-PCR usando las condiciones de RT-PCR descritas en el Ejemplo V y los cebadores descritos en la Tabla 29.

Tabla 29. Cebadores de GALR1 y GALR2 específicos

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
GALR1 directo	5' ' CCCCATCATGTCATCCACCT 3'	150
GALR1 inverso	5' ATGGGGTTCACCGAGGAGTT 3'	151
GALR2 directo	5' CATCGTGGCGGTGCTTTT 3'	152
GALR2 inverso	5' AGCGGGAAGCGACCAAAC 3'	153

Los resultados en la Tabla 30 muestran que los clones y las células no clonales transfectadas tienen cantidades mucho mayores de ARNm de GALR1 que las células originales. En el análisis celular de TVEMP-galanina, el clon #7 mostró ser el más sensible a la TVEMP-galanina. El clon #7 también mostró tener la mayor cantidad de ARNm de GALR1 de acuerdo con la Tabla 30. Los valores de CT para el clon 7 del GalR1 de Neuro-

2a (Neuro-2a #7) fueron los más bajos, seguidos por el clon 4 y luego el clon 12. Los no clonales analizados en ese momento proporcionaron una CT similar al clon 12, no obstante, estas células contienen una población siempre cambiante de células que contienen concentraciones diversas del receptor GalR1 y, por lo tanto, no se consideraron una buena población para futuros trabajos. De los tres clones con EC_{50} bajas, el clon #12 del GalR1 del clon de Neuro-2a (Neuro-2a #12) fue el que creció con mayor rapidez, seguido por el clon #7 de Neuro-2a y, por ultimo, el clon #4 de Neuro-2a. Además de su baja velocidad de crecimiento, el clon #4 de Neuro-2a no se analizó adicionalmente debido a que la sensibilidad del clon #7 de Neuro-2a era mucho mejor que la del clon #4.

Tabla 30. Grandes diferencias en el ARNm del GALR1 en células clonales tranfectadas Neuro-2a contra células originales transfectadas y no clonales

Línea celular	Original	No clonal	Clon 4	Clon 7	Clon 12
CT promedio	32.0	21.7	20.8	19.3	21.6
cambio múltiplo de ARNm	1.0	1269.5	2418.7	6793.8	1332.6

5. Comparación de la sensibilidad y la especificidad de los clones #7 y #12 de Neuro-2a con compuestos de TVEMP-galanina

Los dos clones se analizaron uno junto al otro en un intento de identificar al más sensible y selectivo de los dos, de forma que se pudieran recolectar de forma confidencial los datos del clon con mejor rendimiento. La Tabla 31 muestra los resultados de estos dos clones al tratarlos con el lote C de TVEMP-galanina y LH_N/A para evaluar la sensibilidad y la selectividad, respectivamente. Ambos clones presentan altas proporciones de señal a ruido. El clon #7 de Neuro-2a tiene una EC_{50} de 5.5 nM, mientras que la EC_{50} del clon #12 de Neuro-2a es de 68.4 nM. El clon #12 de Neuro-2a se tiene que analizar con un intervalo de dosis de 0-300 nM, mientras que el clon #7 de Neuro-2a se puede analizar con un intervalo de dosis de 0-30 nM para provocar una meseta en la mayor concentración utilizada. Ambos clones muestran una buena separación entre LH_N/A y el lote C de TVEMP-galanina, el clon #12 de Neuro-2a muestra una absorción no específica en las concentraciones más elevadas, mientras que el clon #7 de Neuro-2a no lo hace. Como se observó en los resultados tabulados, el intervalo para el análisis con células de Neuro-2a #7 es 10 veces menor que el de las células Neuro-2a #12, lo que da como resultado el uso de 10 veces menos compuesto para

Neuro-2a #7 que para Neuro-2a #12. Neuro-2a #7 es 8 veces más selectivo que el clon #12 de Neuro-2a, al usar LH_N/A como comparación. La proporción de señal a ruido es de más de 100 para ambos clones, no obstante, una proporción de 10 sería suficiente para desarrollar un ensayo de potencia basado en células. La EC_{50} para el clon #7 de Neuro-2a es de 5.5 nM, alrededor de 12 veces menor que para Neuro-2a #12, cuya EC_{50} es de 68.4 nM. El intervalo de dosis menor para el análisis, la selectividad de 24 veces con respecto a la LH_N/A, la alta proporción señal a ruido, la excelente sensibilidad que da como resultado una EC_{50} baja y la baja cantidad de proteína necesaria para cada análisis hacen suponer que el clon #7 de Neuro-2a sería el clon que continuaría en el ensayo de potencia basado en células para su uso en la determinación de las proporciones de potencia para los compuestos de TVEMP-galanina.

Tabla 31. Comparación de características de los clones #7 y #12 de Neuro-2a

	Neuro-2a #7	Neuro-2a #12
Intervalo	0-30 nM	0-300 nM

Selectividad	24 veces	3 veces
Proporción de señal a ruido	190	547
Porcentaje de señal de LH_N/A máxima con respecto a la señal de TVEMP-Gal máxima	4.3%	37.6%
EC_{50}	5.5 nM	68.4 nM
Proteína necesaria	~ 1 µg	~ 10 µg
Neuro-2a # 7 y #12 se trataron con el lote C de TVEMP-galanina y LH_N/A durante 16 horas en la CM. La actividad se detectó usando ECL-ELISA.		

Ejemplo XVI

Generación de líneas celulares clonales que sobreexpresan el receptor de KOR-1 para la absorción de endopeptidasa redirigida desde Dinorfina A

El siguiente ejemplo ilustra cómo caracterizar y comparar diversas líneas celulares clonales originadas a partir de una línea celular establecida transfectada con el receptor diana y la clonación posterior de la línea celular. Este ejemplo específico se refiere a la identificación y la caracterización de las líneas celulares clonales transfectadas

con hKOR-1 que se describieron en primer término en el Ejemplo III, Tabla 9.

Cuatro de los clones AGN P33-KOR (clones número 8, 9, 10 y 12 de la Tabla 9 en el Ejemplo III) se seleccionaron y analizaron con Dyn/A con una respuesta a la dosis completa de 0-150 nM. Al mismo tiempo, dos clones SiMa-KOR (clones número 12 y 16 de la Tabla 9 en el Ejemplo III) se seleccionaron y analizaron con Dyn/A con una respuesta a la dosis completa de 0-150 nM. En este experimento, los clones 8, 9 y 12 de AGN P33-KOR produjeron una absorción muy baja y por lo tanto se desecharon; el clon 10 de AGN P33-KOR presentó una buena absorción y se obtuvo una EC_{50} de 30.3 nM. Los dos clones de SiMa-KOR analizados presentaron una buena absorción y se obtuvo una EC_{50} de 26.6 nM para el clon 16 y se obtuvo una EC_{50} de 11.8 nM para el clon 12. Estos tres clones luego se analizaron para determinar la sensibilidad y la selectividad comparando la absorción del compuesto de Dyn/A diana contra el LH_N/A de control negativo que carece de un ligando de direccionamiento y el control Noc/A. La comparación de los tres clones y las células SiMa originales utilizando una respuesta a la dosis completa de 0-150 nM se resume en la Tabla 32.

Tabla 32			
Línea celular	EC_{50} de Dyn/A (nM)	EC_{50} de LHN/A (nM)	EC_{50} de Noc/A (nM)
SiMa original	> 100	> 100	5.4
clon 10 de AGN P33-KOR	9.7	> 150	9.4
clon 16 de SiMa-KOR	10.6	> 100	1.6
clon 12 de SiMa-KOR	4.65	>150	19.7

Hubo un marcado aumento en la absorción de Dyn/A en los clones transfectados con KOR-1 tratados con Dyn/A, mientras que las células SiMa originales mostraron una absorción mínima del compuesto (absorción similar al LH_N/A de control negativo). Hubo algo de Noc/A en todas las líneas celulares, incluyendo las células SiMa originales. Esto no sorprende ya que se observó absorción de Noc/A en células SiMa durante el desarrollo del ensayo para este compuesto redirigido. Adicionalmente, la absorción de Noc/A es mejor en la línea celular AGN P33 que se derivó específicamente para esta endopeptidasa redirigida. La diferencia entre la absorción de

Noc/A y la absorción de compuesto de Dyn/A en mayor en las células del clon 12 de SiMa-KOR clonal (SK12). En todas las gráficas, la actividad del control negativo, LHN/A, es mínima, lo que muestra que en ausencia del dominio de unión no había absorción específica en estas líneas celulares y la más baja se produjo en las células SK12, lo que muestra que la absorción del compuesto de Dyn/A es altamente específica. A partir de estos resultados, se seleccionó el clon SK12 para una optimización y caracterización futura.

Los estudios de optimización se realizaron con las células SK12 para desarrollar un ensayo sólido, específico y sensible. Se analizaron diversos parámetros incluyendo el medio de colocación en placas y las densidades de colocación en placas, el medio de tratamiento y el tiempo de tratamiento. En la tabla 33 de proporciona un resumen de los datos obtenidos durante la optimización.

Tabla 33

Medio utilizado			Células/pocillo				
colocación en placas	tratamiento	Tiempo de tratamiento	25000	50000	75000	100000	150000
completo	completo	6 hr + o/n	51.3	76	13.4	9.2	n/a

completo	completo	16 hr	21.3	19.0	4.96	4.64	n/a
completo	completo	16 hr	n/a	n/a	n/a	2.1	15.3
libre de suero	libre de suero	16 hr	n/a	n/a	n/a	9.0	12.1
completo	libre de suero	16 hr	n/a	10.3	5.4	8.97	8.38
completo	completo	16 hr	n/a	7.7	4.86	13.72	11.26
libre de suero	libre de suero	16 hr	n/a	11.2	8.5	8.4	9.2

La Tabla B muestra que las células colocadas en placas a 100,000 células por pocillo en CM y tratadas con los compuestos en CM mostraron más variabilidad en los valores de EC_{50} de un experimento al siguiente (4.6; 1.2 y 13.72 nM), mientras que las células colocadas en placas a 100,000 células por pocillo en SFM y tratadas con compuestos diluidos en SFM proporcionó las mejores curvas y valores de EC_{50} consistentes (9.0 y 8.4 nM). En el futuro, las células también se colocarán en placas a 100,000 células por pocillo en SFM y se tratarán con compuestos en SFM.

Las SK12 colocadas en placas de PDL a 100,000 células por pocillo en SFM durante 24 horas, seguido por el

tratamiento en SFM durante 16 horas, proporcionó el valor de EC_{50} más bajo de 8.4 +/- 1.1 nM y una proporción de señal a ruido de 12. Ambos valores serían aceptables para el uso futuro de estas células en CBPA.

Caracterización de células SK12 con el ensayo de unión de saturación

El ensayo de unión de saturación utilizado en la presente se describe en detalle en el Ejemplo V. Los estudios de unión de saturación se realizaron usando el antagonista de KOR-1 ^{3}H-diprenorfina par evaluar la unión. La unión específica y no específica total se midió en diversos experimentos. Se generó una curva de unión de saturación de ^{3}H-diprenorfina con el receptor a partir de dos experimentos independientes. Aparentemente, alrededor del 25% de la unión es no específica y 75% de la unión es específica de la molécula al receptor. La afinidad de la molécula al receptor es adecuada a 6.5 nM. La Bmáx indica que hay receptores KOR-1 de 23 fmol por célula en las células SK12.

Salvo que se indique lo contrario, se debe comprender que todas las cifras que expresan cantidades de ingredientes, propiedades como peso molecular, condiciones de reacción y otras utilizadas en la presente memoria descriptiva y

reivindicaciones se encuentran modificadas en todos los casos por el término "alrededor de". Por lo tanto, salvo que se indique lo contrario, los parámetros numéricos que se indican en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busque obtener con la presente invención. En última instancia y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debería interpretar al menos en vista de la cantidad de dígitos significativos indicados y aplicando técnicas de redondeo normales. Sin perjuicio de que los intervalos y los parámetros numéricos que indican el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos que se indican en los ejemplos específicos se indican de la forma más precisa posible. No obstante, todo valor numérico contiene inherentemente algunos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar que se encuentra en sus mediciones de análisis respectivas.

Los términos "un", "una", "el" y referentes similares utilizados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deben interpretar como abarcativos del singular y el plural, salvo que se indique lo contrario en la

presente o que el contexto lo contradiga claramente. La mención de intervalos de valores en la presente pretende meramente servir como un método taquigráfico para referirse de forma individual a cada valor separado que se encuentra en el intervalo. Salvo que se indique lo contrario en la presente, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara de forma individual en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden realizar en cualquier orden adecuado, salvo que se indique lo contrario en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cualquiera de los ejemplos o las expresiones de ejemplo (por ej., "como") en la presente pretende meramente iluminar mejor la invención y no presenta una limitación al alcance de la invención reivindicada de otra forma. No se debe interpretar ningún lenguaje en la memoria descriptiva como una indicación de algún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Las agrupaciones de elementos o modalidades alternativos de la invención descritos en la presente no se deben interpretar como limitaciones. Cada miembro del grupo se puede referir y reivindicar de forma individual o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos que se encuentran en la presente. Se anticipa que uno o más miembros de un grupo se pueden incluir o eliminar de un grupo

por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando ocurra una de tales inclusiones o eliminaciones, se considera que la memoria descriptiva contiene el grupo según se modificó y, por consiguiente, cumple con la descripción escrita de todos los grupos Markush utilizados en las reivindicaciones adjuntas.

Algunas modalidades de la presente invención se describen en la presente, incluyendo la mejor forma conocida por los inventores para realizar la invención. Por supuesto, variaciones de estas modalidades descritas serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la descripción que antecede. Los inventores esperan que los expertos utilicen tales variaciones según sea apropiado y pretenden que la invención se practique de una forma diferente a la que se describe específicamente en la presente. Por lo tanto, la presente invención incluye todas las modificaciones y los equivalentes de la materia mencionada en las reivindicaciones adjuntas a la presente según permita la ley. Adicionalmente, toda combinación de los elementos antedichos en todas las variaciones posibles de los mismos se encuentra incluida en la invención, salvo que se indique lo contrario en la presente o que lo contradiga claramente el contexto.

Las modalidades específicas descritas en la presente se pueden limitar adicionalmente en las reivindicaciones usando

el vocabulario "que consiste en" o "que consiste esencialmente en". Cuando se utiliza en las reivindicaciones, ya sea como se presentan o en adiciones a modo de corrección, el término de transición "que consiste en" excluye todo elemento, etapa o ingrediente que no se especifique en las reivindicaciones. El término de transición "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o las etapas especificados y a aquellos que no afectan de forma material la o las características básicas y novedosas. Las modalidades de la invención que se reivindican de tal forma se describen y permiten inherente o expresamente en la presente.

Adicionalmente, se han realizado diversas referencias a patentes y publicaciones impresas a lo largo de la presente memoria descriptiva. Cada una de las referencias y publicaciones impresas antedichas se incorporan de forma individual a la presente en su totalidad a modo de referencia.

Por último, se debe comprender que las modalidades de la invención descritas en la presente ilustran los principios de la presente invención. Otras modificaciones que se pueden utilizar se encuentran dentro del alance de la invención. Por consiguiente, a modo de ejemplo, pero de forma no taxativa, se pueden utilizar configuraciones alternativas de la presente invención de acuerdo con las enseñanzas que obran en la

presente. Por lo tanto, la presente invención no se limita a las mismas precisamente como se muestra y describe.

Se reivindica lo siguiente:

1. Un método para detectar la actividad de la endopeptidasa redirigida, donde el método comprende las etapas de:

a. tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que comprende una endopeptidasa redirigida, donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a la actividad de la endopeptidasa redirigida en alrededor de 500 pM o menos de una endopeptidasa redirigida.

b. aislar de la célula tratada un componente de la SNAP-25 que comprende un producto de la escisión de la SNAP-25 con una glutamina en el extremo carboxiloterminal del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A;

c. poner en contacto el componente de la SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 enlazado a un soporte de fase sólida,

donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende una glutamina en el extremo carboxiloterminal del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25, el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación de un epítopo

de una SNAP-25 que no comprende una glutamina en el extremo carboxiloterminal del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A de un producto de la escisión de la SNAP-25 menor a 1×10^{1} M^{-1} s^{-1} y el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio del epítopo menor a 0.450 nM;

d. detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de la escisión de la SNAP-25 con una glutamina en el extremo carboxiloterminal del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A;

donde la detección mediante el complejo de anticuerpo-antígeno indica la actividad de la endopeptidasa redirigida.

2. El método de la Reivindicación 1, donde el producto de la escisión de la SNAP-25 es $SNAP\text{-}25_{197}$.

3. El método de la Reivindicación 1, donde la presencia de un complejo de anticuerpo-antígeno se detecta usando un ELISA tipo sándwich.

4. El método de la Reivindicación 1, donde el método tiene una proporción de señal a ruido en la asíntota menor de

al menos 3:1 y una proporción de señal a ruido en la asíntota superior de al menos 10:1.

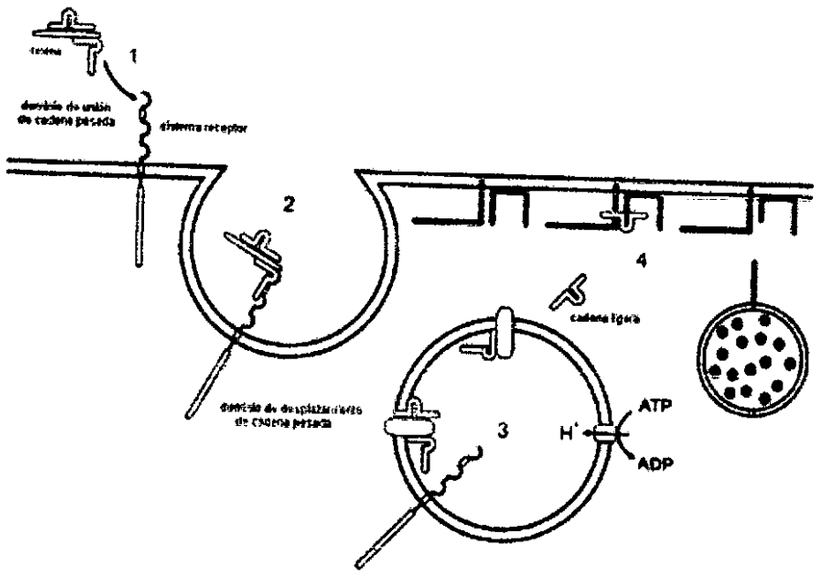
5. El método de la Reivindicación 1, donde la muestra comprende como máximo 100 pM de una endopeptidasa redirigida.

6. El método de la Reivindicación 1, donde la célula de una línea celular establecida es susceptible de inhibición de la exocitosis con endopeptidasa redirigida en alrededor de 100 pM o menos de la endopeptidasa redirigida.

7. El método de la Reivindicación 1, donde el método se realiza en forma única o en forma múltiple.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

FIG. 1B.



La presente memoria descriptiva describe composiciones que inducen una respuesta inmune a la SNAP-25, métodos para realizar anticuerpos α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a un epítopo que comprende una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, anticuerpos α-SNAP-25 que se unen de forma selectiva a un epítopo que comprende una SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal en el residuo de P_1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A, métodos para detectar la actividad de la endopeptidasa redirigida y métodos para detectar anticuerpos de endopeptidasa α-redirigida neutralizantes.

FIG. 1A.

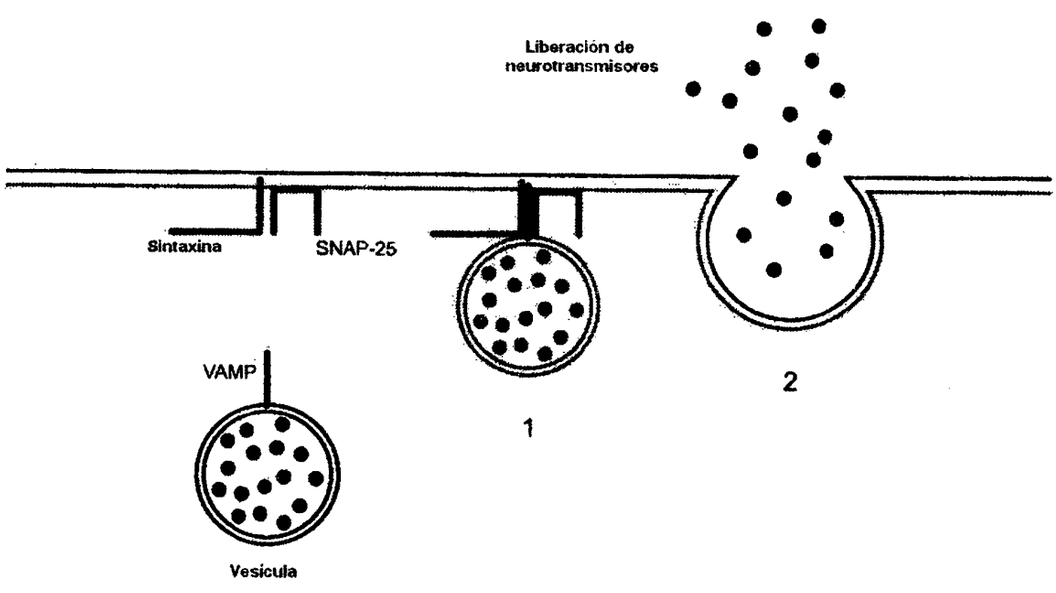

Liberación de
neurotransmisores
Sintaxina
SNAP-25
VAMP
Vesícula
1
2

FIG. 1B.

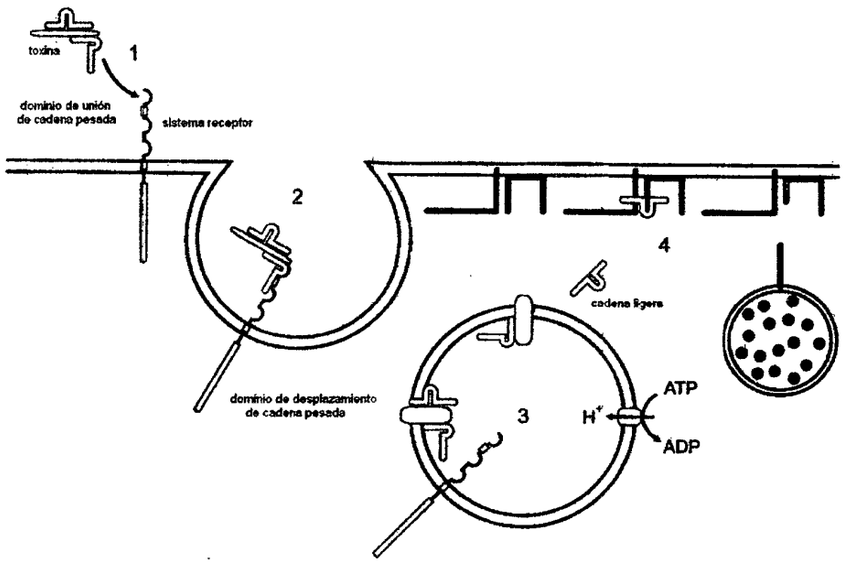

toxina
1
dominio de unión
de cadena pesada
sistema receptor
2
4
cadena ligera
dominio de desplazamiento
de cadena pesada
3
H+
ATP
ADP

FIG. 2.

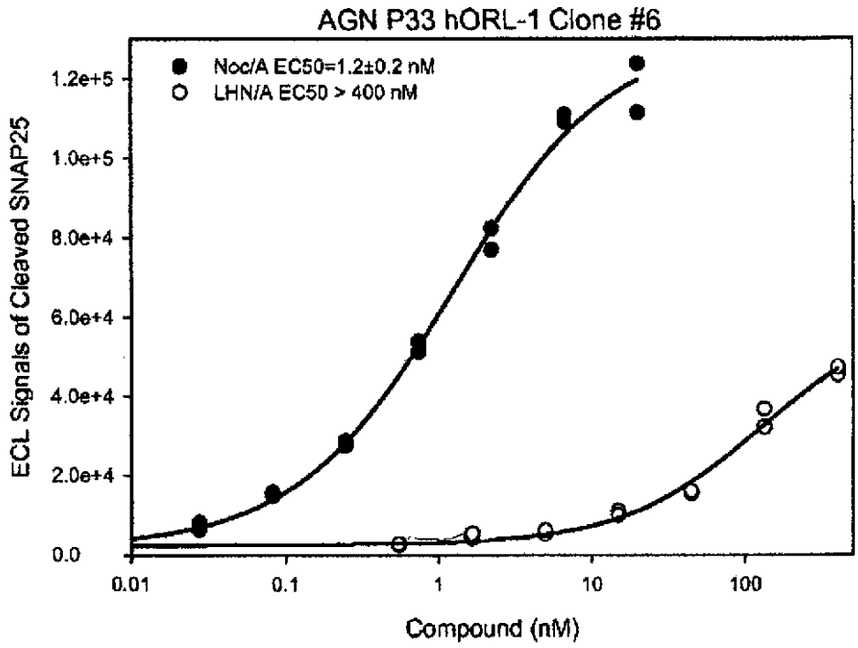

AGN P33 hORL-1 Clone #6
Noc/A EC50=1.2±0.2 nM
LHN/A EC50 > 400 nM
ECL Signals of Cleaved SNAP25
1.2e+5
1.0e+5
8.0e+4
6.0e+4
4.0e+4
2.0e+4
0.0
0.01
0.1
1
10
100
Compound (nM)

FIG. 3.

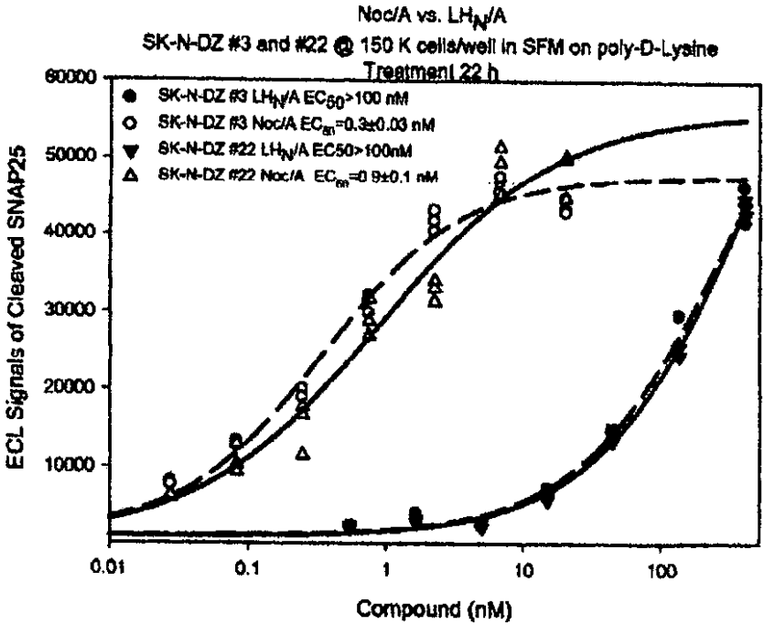

Noc/A vs. LHN/A
SK-N-DZ #3 and #22 @ 150 K cells/well in SFM on poly-D-Lysine
Treatment 22 h
SK-N-DZ #3 LHN/A EC50>100 nM
SK-N-DZ #3 Noc/A EC50=0.3±0.03 nM
SK-N-DZ #22 LHN/A EC50>100nM
SK-N-DZ #22 Noc/A EC50=0.9±0.1 nM
ECL Signals of Cleaved SNAP25
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0.01
0.1
1
10
100
Compound (nM)

FIG. 4.

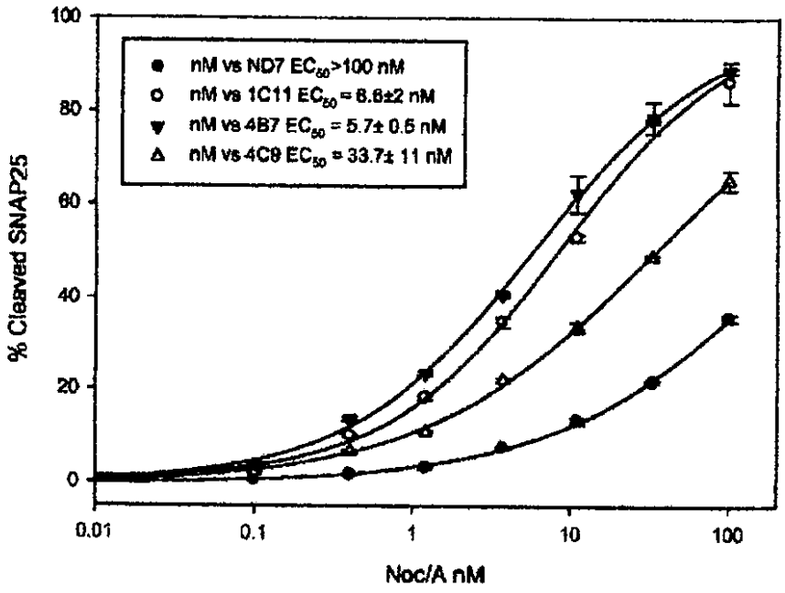

nM vs ND7 EC50>100 nM
nM vs 1C11 EC50 = 6.6±2 nM
nM vs 4B7 EC50 = 5.7± 0.5 nM
nM vs 4C9 EC50 = 33.7± 11 nM
% Cleaved SNAP25
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
Noc/A nM

FIG. 5.

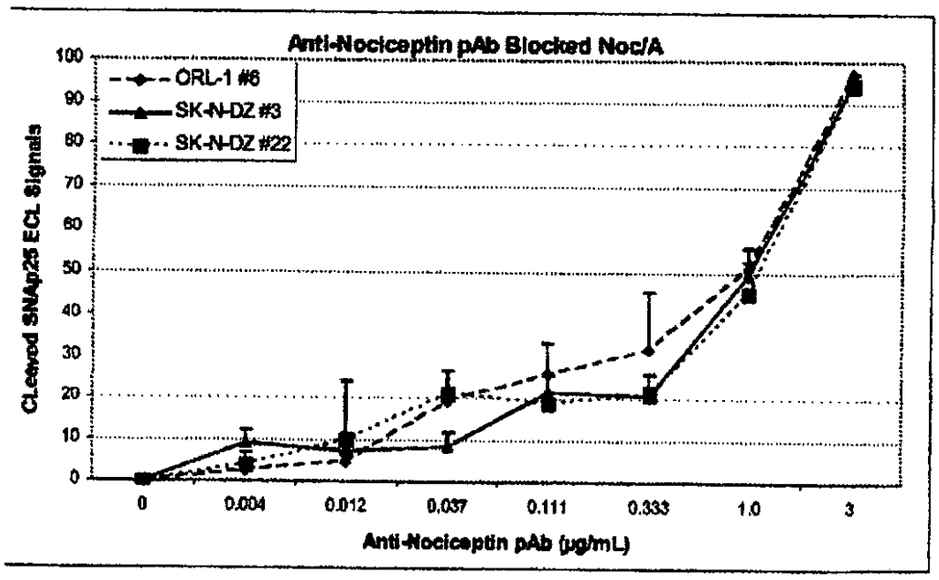

Anti-Nociceptin pAb Blocked Noc/A
ORL-1 #6
SK-N-DZ #3
SK-N-DZ #22
Cleaved SNAp25 ECL Signals
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.004
0.012
0.037
0.111
0.333
1.0
3
Anti-Nociceptin pAb (µg/mL)

FIG. 6.

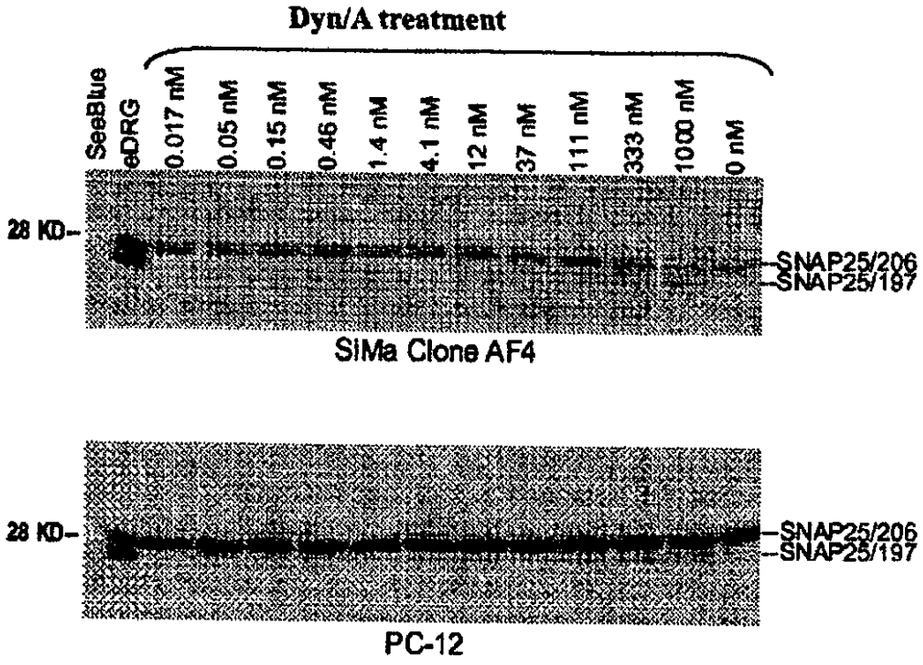

Dyn/A treatment
SeeBlue
eDRG
0.017 nM
0.05 nM
0.15 nM
0.46 nM
1.4 nM
4.1 nM
12 nM
37 nM
111 nM
333 nM
1000 nM
0 nM
28 KD
SNAP25/206
SNAP25/197
SIMa Clone AF4
28 KD
SNAP25/206
SNAP25/197
PC-12

FIG. 7A.

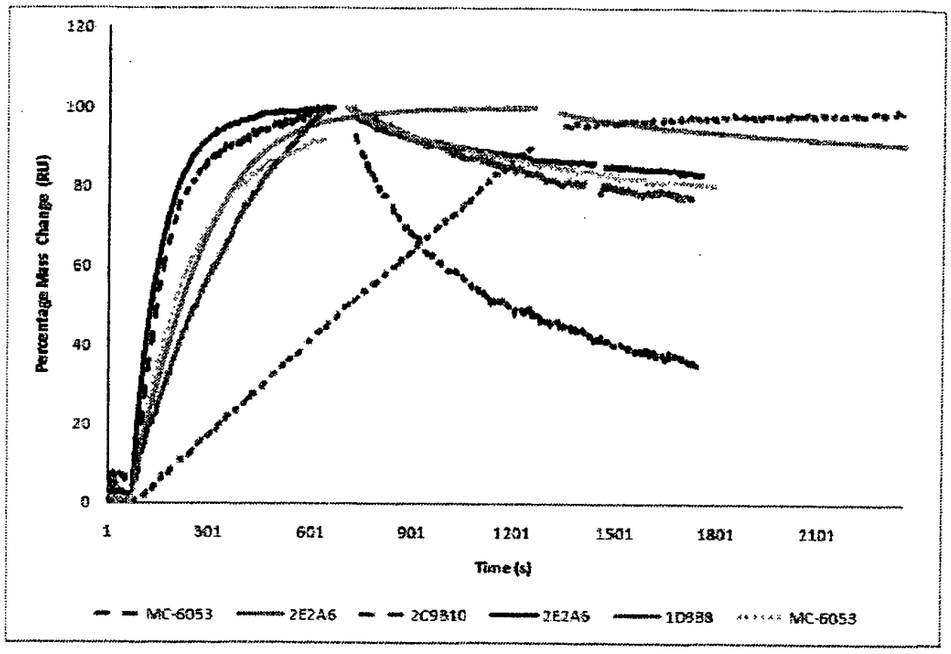
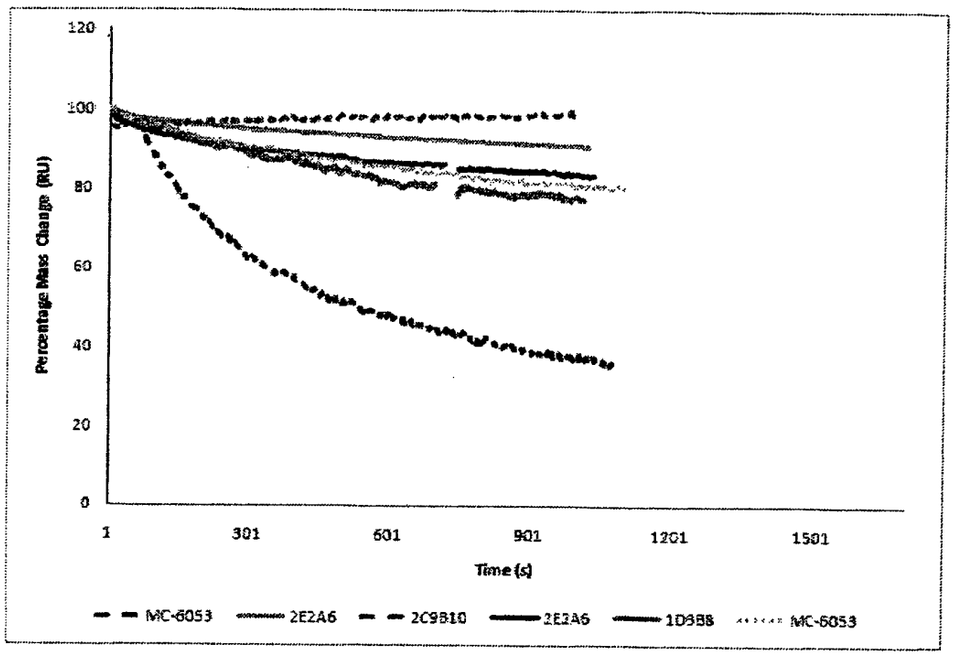

120
100
80
60
40
20
0
Percentage Mass Change (RU)
1
301
601
901
1201
1501
1801
2101
Time (s)
MC-6053
2E2A6
2C9B10
2E2A6
1D8B8
MC-6053

FIG. 7B.


120
100
80
60
40
20
0
Percentage Mass Change (RU)
1
301
601
901
1201
1501
Time (s)
MC-6053
2E2A6
2C9B10
2E3A6
1D8B8
MC-6053

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wang, Joanne
Zhu, Hong
Hodges, D. Dianne
Fernandez-Salas, Ester

<120> Ensayos de la actividad de la endopeptidasa redirigida basados en inmunoensayos

<130> 18496 (BOT)

<150> US 61/160,217
<151> 2009-03-13

<160> 153

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 903
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Endopeptidasa redirigida

<400> 1

```
Met Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro
 1               5                  10                  15
Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln
            20                  25                  30
Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile
        35                  40                  45
Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro
    50                  55                  60
Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys
                85                  90                  95
Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr
            100                 105                 110
Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr
        115                 120                 125
Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp
    130                 135                 140
Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser
145                 150                 155                 160
Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu
                165                 170                 175
Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser
            180                 185                 190
Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn
        195                 200                 205
Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu
    210                 215                 220
```

Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile
225 230 235 240
Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met
245 250 255
Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His
260 265 270
Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr
275 280 285
Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys
290 295 300
Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe
305 310 315 320
Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val
325 330 335
Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr
340 345 350
Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr
355 360 365
Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys
370 375 380
Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu
385 390 395 400
Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe
405 410 415
Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu
420 425 430
Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Asp Asp Asp Asp
435 440 445
Lys Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys Arg Lys
450 455 460
Asn Gln Ala Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
465 470 475 480
Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp
485 490 495
Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn
500 505 510
Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu
515 520 525
Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe
530 535 540
Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile
545 550 555 560
Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly
565 570 575
Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala
580 585 590
Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val
595 600 605
Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser
610 615 620
Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu
625 630 635 640
Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu
645 650 655
Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr
660 665 670

```
Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe
        675                 680                 685
Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile
    690                 695                 700
Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr
705                 710                 715                 720
Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser
                725                 730                 735
Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn
            740                 745                 750
Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met
        755                 760                 765
Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn
    770                 775                 780
Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe
785                 790                 795                 800
Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala
                805                 810                 815
Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu
            820                 825                 830
Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp
        835                 840                 845
Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly
    850                 855                 860
Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr
865                 870                 875                 880
Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln
                885                 890                 895
Arg Leu Leu Ser Thr Leu Asp
            900
```

<210> 2
<211> 908
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Endopeptidasa redirigida

<400> 2

```
Met Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro
 1               5                  10                  15
Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln
            20                  25                  30
Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile
        35                  40                  45
Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro
    50                  55                  60
Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys
                85                  90                  95
Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr
            100                 105                 110
Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr
```

```
        115                 120                 125
Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp
    130                 135                 140
Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser
145                 150                 155                 160
Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu
                165                 170                 175
Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser
            180                 185                 190
Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn
        195                 200                 205
Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu
    210                 215                 220
Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile
225                 230                 235                 240
Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met
                245                 250                 255
Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His
            260                 265                 270
Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr
        275                 280                 285
Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys
    290                 295                 300
Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe
305                 310                 315                 320
Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val
                325                 330                 335
Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr
            340                 345                 350
Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr
        355                 360                 365
Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys
    370                 375                 380
Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu
385                 390                 395                 400
Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe
                405                 410                 415
Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu
            420                 425                 430
Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Asp Asp Asp Asp
        435                 440                 445
Lys Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys Trp Asp
    450                 455                 460
Asn Gln Ala Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
465                 470                 475                 480
Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp
                485                 490                 495
Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn
            500                 505                 510
Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu
        515                 520                 525
Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe
    530                 535                 540
Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile
545                 550                 555                 560
Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly
```

```
                565                 570                 575
Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala
            580                 585                 590
Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val
        595                 600                 605
Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser
    610                 615                 620
Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu
625                 630                 635                 640
Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu
                645                 650                 655
Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr
            660                 665                 670
Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe
        675                 680                 685
Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile
    690                 695                 700
Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr
705                 710                 715                 720
Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser
                725                 730                 735
Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn
            740                 745                 750
Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met
        755                 760                 765
Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn
    770                 775                 780
Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe
785                 790                 795                 800
Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala
                805                 810                 815
Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu
            820                 825                 830
Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp
        835                 840                 845
Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly
    850                 855                 860
Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr
865                 870                 875                 880
Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln
                885                 890                 895
Arg Leu Leu Ser Thr Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
            900                 905
```

<210> 3
<211> 906
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Endopeptidasa redirigida

<400> 3

```
Ile Ser Glu Phe Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr
 1               5                  10                  15
```

Lys Asp Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn
20 25 30
Ala Gly Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile
35 40 45
Trp Val Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp
50 55 60
Leu Asn Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp
65 70 75 80
Ser Thr Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly
85 90 95
Val Thr Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met
100 105 110
Leu Leu Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr
115 120 125
Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile
130 135 140
Gln Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile
145 150 155 160
Gly Pro Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His
165 170 175
Glu Val Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile
180 185 190
Arg Phe Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val
195 200 205
Asp Thr Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala
210 215 220
Val Thr Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly
225 230 235 240
Ile Ala Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr
245 250 255
Tyr Glu Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe
260 265 270
Gly Gly His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe
275 280 285
Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn
290 295 300
Lys Ala Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys
305 310 315 320
Asn Val Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys
325 330 335
Phe Ser Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr
340 345 350
Glu Ile Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn
355 360 365
Arg Lys Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile
370 375 380
Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn
385 390 395 400
Thr Asn Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn
405 410 415
Met Asn Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr
420 425 430
Lys Leu Leu Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu
435 440 445
Ile Glu Gly Arg Asn Lys Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn
450 455 460

Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp
465 470 475 480
Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala
485 490 495
Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe
500 505 510
Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser
515 520 525
Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro
530 535 540
Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu
545 550 555 560
Arg Ala Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn
565 570 575
Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe
580 585 590
Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met
595 600 605
Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr
610 615 620
Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile
625 630 635 640
Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp
645 650 655
Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu
660 665 670
Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val
675 680 685
Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala
690 695 700
Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val
705 710 715 720
Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys
725 730 735
Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile
740 745 750
Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile
755 760 765
Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn
770 775 780
Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser
785 790 795 800
Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp
805 810 815
Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn
820 825 830
Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn
835 840 845
Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp
850 855 860
Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
865 870 875 880
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Val Gly Arg Pro Glu
885 890 895
Trp Trp Met Asp Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly
900 905

<210> 4
<211> 919
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Endopeptidasa redirigida

<400> 4
Met Glu 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 Asp
            420                 425                 430
Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Asp Asp Asp Asp Lys Tyr Gly
        435                 440                 445
Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe
    450                 455                 460
Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu Ala Leu Ala
465                 470                 475                 480
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
                485                 490                 495
Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser
            500                 505                 510
Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile
        515                 520                 525
Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp
    530                 535                 540
Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu
545                 550                 555                 560
Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu
                565                 570                 575
Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu
            580                 585                 590
Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His
        595                 600                 605
Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu
    610                 615                 620
Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys
625                 630                 635                 640
Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln
                645                 650                 655
Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp
            660                 665                 670
Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu
        675                 680                 685
Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile
    690                 695                 700
Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile
705                 710                 715                 720
Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val
                725                 730                 735
Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys
            740                 745                 750
Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val
        755                 760                 765
Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu
    770                 775                 780
Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln
785                 790                 795                 800
Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu
```

```
                805                 810                 815
Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn
            820                 825                 830
Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile
        835                 840                 845
Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp
    850                 855                 860
Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln
865                 870                 875                 880
Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile
                885                 890                 895
Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr
            900                 905                 910
Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
        915
```

<210> 5
<211> 206
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

```
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1               5                  10                  15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20                  25                  30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35                  40                  45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
    50                  55                  60
Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
65                  70                  75                  80
Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85                  90                  95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100                 105                 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115                 120                 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130                 135                 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145                 150                 155                 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205
```

<210> 6
<211> 206
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1   5   10   15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20   25   30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35   40   45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50   55   60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65   70   75   80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85   90   95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100   105   110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115   120   125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130   135   140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145   150   155   160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165   170   175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
            180   185   190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195   200   205

<210> 7
<211> 206
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<400> 7
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1   5   10   15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20   25   30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35   40   45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50   55   60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65   70   75   80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85   90   95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100   105   110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115   120   125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130   135   140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145   150   155   160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg

```
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205
```

<210> 8
<211> 206
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 8

```
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1               5                  10                  15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20                  25                  30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35                  40                  45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
    50                  55                  60
Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
65                  70                  75                  80
Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85                  90                  95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100                 105                 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115                 120                 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130                 135                 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145                 150                 155                 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205
```

<210> 9
<211> 206
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 9

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

65 70 75 80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
85 90 95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
100 105 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
115 120 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
130 135 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145 150 155 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
165 170 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
180 185 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200 205

<210> 10
<211> 206
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65 70 75 80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
85 90 95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
100 105 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
115 120 125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
130 135 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145 150 155 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
165 170 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
180 185 190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200 205

<210> 11
<211> 206
<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 11
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1   5   10   15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20   25   30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35   40   45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50   55   60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65   70   75   80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85   90   95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100   105   110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115   120   125
Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn
    130   135   140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145   150   155   160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165   170   175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile
            180   185   190
Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195   200   205

<210> 12
<211> 204
<212> PRT
<213> Carassius auratus

<400> 12
Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Ser Asp Met Gln Gln
 1   5   10   15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20   25   30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35   40   45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50   55   60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn Leu Asn Asp
65   70   75   80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys Asn Lys Met Lys
                85   90   95
Ser Gly Gly Ser Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala
            100   105   110
Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser
        115   120   125
Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met
    130   135   140
Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu Arg His

145 150 155 160
Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile
165 170 175
Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu
180 185 190
Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200

<210> 13
<211> 203
<212> PRT
<213> Carassius auratus

<400> 13
Met Ala Asp Glu Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Thr Asp Met Gln Ala
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Gly Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65 70 75 80
Leu Gly Asn Leu Cys Gly Leu Cys Pro Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
85 90 95
Gly Gly Gly Gln Ser Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ser Ser
100 105 110
Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser Gly
115 120 125
Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met Asp
130 135 140
Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg His Met
145 150 155 160
Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile Asp
165 170 175
Arg Ile Met Asp Met Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala
180 185 190
Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200

<210> 14
<211> 204
<212> PRT
<213> Danio rerio

<400> 14
Met Ala Glu Asp Ser Asp Met Arg Asn Glu Leu Ala Asp Met Gln Gln
1 5 10 15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met

```
    50                  55                  60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn Leu Asn Asp
65                  70                  75                  80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys Asn Lys Met Lys
                85                  90                  95
Ser Gly Ala Ser Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala
            100                 105                 110
Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser
        115                 120                 125
Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met
    130                 135                 140
Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu Arg His
145                 150                 155                 160
Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile
                165                 170                 175
Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu
            180                 185                 190
Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200
```

<210> 15
<211> 203
<212> PRT
<213> Danio rerio

<400> 15

```
Met Ala Asp Glu Ser Asp Met Arg Asn Glu Leu Asn Asp Met Gln Ala
 1               5                  10                  15
Arg Ala Asp Gln Leu Gly Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20                  25                  30
Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35                  40                  45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50                  55                  60
Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65                  70                  75                  80
Leu Gly Asn Leu Cys Gly Leu Cys Pro Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85                  90                  95
Gly Gly Gly Gln Ser Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ser Ser
            100                 105                 110
Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser Gly
        115                 120                 125
Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met Asp
    130                 135                 140
Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg His Met
145                 150                 155                 160
Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile Asp
                165                 170                 175
Arg Ile Met Asp Met Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala
            180                 185                 190
Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200
```

<210> 16

<211> 210
<212> PRT
<213> Torpedo marmorata

<400> 16
Met Glu Asn Ser Val Glu Asn Ser Met Asp Pro Arg Ser Glu Gln Glu
 1   5   10   15
Glu Met Gln Arg Cys Ala Asp Gln Ile Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser
            20   25   30
Thr Arg Arg Met Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile
        35   40   45
Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile
    50   55   60
Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys
65   70   75   80
Asn Leu Ser Asp Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Cys Ser Cys Pro Cys
                85   90   95
Asn Lys Leu Lys Asn Phe Glu Ala Gly Gly Ala Tyr Lys Lys Val Trp
            100   105   110
Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Met
        115   120   125
Asp Asp Arg Glu Gln Met Ala Met Ser Gly Gly Tyr Ile Arg Arg Ile
    130   135   140
Thr Asp Asp Ala Arg Glu Asn Glu Met Glu Glu Asn Leu Asp Gln Val
145   150   155   160
Gly Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Ser Asn
                165   170   175
Glu Ile Gly Ser Gln Asn Ala Gln Ile Asp Arg Ile Val Val Lys Gly
            180   185   190
Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys
        195   200   205
Met Leu
    210

<210> 17
<211> 206
<212> PRT
<213> Xenopus laevis

<400> 17
Met Ala Asp Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1   5   10   15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20   25   30
Leu Gln Tyr Val Glu Gly Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35   40   45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Asp Arg Val Glu Glu Gly Met
    50   55   60
Asn His Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Lys Asp
65   70   75   80
Leu Gly Lys Cys Cys Gly Leu Phe Ile Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85   90   95
Ser Ser Gly Ala Tyr Asn Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100   105   110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala

```
        115                 120                 125
Ile Ser Gly Gly Phe Val Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Thr
    130                 135                 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145                 150                 155                 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Ala Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205
```

<210> 18
<211> 206
<212> PRT
<213> Xenopus laevis

<400> 18

```
Met Ala Asp Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
 1               5                  10                  15
Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
            20                  25                  30
Leu Gln Tyr Val Glu Gly Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
        35                  40                  45
Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
    50                  55                  60
Glu Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp
65                  70                  75                  80
Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys
                85                  90                  95
Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val
            100                 105                 110
Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala
        115                 120                 125
Ile Ser Gly Gly Phe Val Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Thr
    130                 135                 140
Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Gly Gly Ile Ile Gly Asn Leu
145                 150                 155                 160
Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Ala Arg Ile
            180                 185                 190
Asp Glu Ala Asn Lys His Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
        195                 200                 205
```

<210> 19
<211> 212
<212> PRT
<213> Strongylocentrotus purpuratus

<400> 19

```
Met Glu Asp Gln Asn Asp Met Asn Met Arg Ser Glu Leu Glu Glu Ile
 1               5                  10                  15
Gln Met Gln Ser Asn Met Gln Thr Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg
```

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

<210> 20
<211> 212
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 20

```
Met Pro Ala Asp Pro Ser Glu Glu Val Ala Pro Gln Val Pro Lys Thr
 1               5                  10                  15
Glu Leu Glu Glu Leu Gln Ile Asn Ala Gln Gly Val Ala Asp Glu Ser
            20                  25                  30
Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ala Leu Cys Glu Glu Ser Lys Glu
        35                  40                  45
Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val Ala Leu Asp Asp Gln Gly Glu Gln Leu
    50                  55                  60
Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Ala Asp Met Arg Glu
65                  70                  75                  80
Ala Glu Lys Asn Leu Ser Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Ile Cys Val
                85                  90                  95
Leu Pro Cys Asn Lys Ser Gln Ser Phe Lys Glu Asp Asp Gly Thr Trp
            100                 105                 110
Lys Gly Asn Asp Asp Gly Lys Val Val Asn Asn Gln Pro Gln Arg Val
        115                 120                 125
Met Asp Asp Arg Asn Gly Met Met Ala Gln Ala Gly Tyr Ile Gly Arg
    130                 135                 140
Ile Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met Glu Glu Asn Met Gly Gln
145                 150                 155                 160
Val Asn Thr Met Ile Gly Asn Leu Arg Asn Met Ala Leu Asp Met Gly
                165                 170                 175
Ser Glu Leu Glu Asn Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Asn Arg Lys
```

```
            180                 185                 190
Gly Glu Ser Asn Glu Ala Arg Ile Ala Val Ala Asn Gln Arg Ala His
        195                 200                 205
Gln Leu Leu Lys
    210
```

<210> 21
<211> 212
<212> PRT
<213> Hirudo medicinalis

<400> 21

```
Met Ala Lys Asp Ile Lys Pro Lys Pro Ala Asn Gly Arg Asp Ser Pro
 1               5                  10                  15
Thr Asp Leu Gln Glu Ile Gln Leu Gln Met Asn Ala Ile Thr Asp Asp
            20                  25                  30
Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ala Met Cys Glu Glu Ser Lys
        35                  40                  45
Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln
    50                  55                  60
Leu Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Gln Asp Met Arg
65                  70                  75                  80
Asp Ala Glu Lys Asn Leu Glu Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys
                85                  90                  95
Ile Leu Pro Trp Lys Arg Thr Lys Asn Phe Asp Lys Gly Ala Glu Trp
            100                 105                 110
Asn Lys Gly Asp Glu Gly Lys Val Asn Thr Asp Gly Pro Arg Leu Val
        115                 120                 125
Val Gly Asp Gly Asn Met Gly Pro Ser Gly Gly Phe Ile Thr Lys Ile
    130                 135                 140
Thr Asn Asp Ala Arg Glu Glu Glu Met Glu Gln Asn Met Gly Glu Val
145                 150                 155                 160
Ser Asn Met Ile Ser Asn Leu Arg Asn Met Ala Val Asp Met Gly Ser
                165                 170                 175
Glu Ile Asp Ser Gln Asn Arg Gln Val Asp Arg Ile Asn Asn Lys Met
            180                 185                 190
Thr Ser Asn Gln Leu Arg Ile Ser Asp Ala Asn Lys Arg Ala Ser Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Lys Glu
    210
```

<210> 22
<211> 212
<212> PRT
<213> Loligo pealei

<400> 22

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

```
    50                  55                  60
Glu Gly Leu Asp Gln Ile Asn Gln Asp Met Lys Asp Ala Glu Lys Asn
65                  70                  75                  80
Leu Glu Gly Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys Val Leu Pro Trp Lys
                85                  90                  95
Arg Gly Lys Ser Phe Glu Lys Ser Gly Asp Tyr Ala Asn Thr Trp Lys
            100                 105                 110
Lys Asp Asp Asp Gly Pro Thr Asn Thr Asn Gly Pro Arg Val Thr Val
        115                 120                 125
Gly Asp Gln Asn Gly Met Gly Pro Ser Ser Gly Tyr Val Thr Arg Ile
    130                 135                 140
Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Asp Met Glu Asn Asn Met Lys Glu Val
145                 150                 155                 160
Ser Ser Met Ile Gly Asn Leu Arg Asn Met Ala Ile Asp Met Gly Asn
                165                 170                 175
Glu Ile Gly Ser Gln Asn Arg Gln Val Asp Arg Ile Gln Gln Lys Ala
            180                 185                 190
Glu Ser Asn Glu Ser Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys Lys Ala Thr Lys
        195                 200                 205
Leu Leu Lys Asn
    210
```

<210> 23
<211> 220
<212> PRT
<213> Lymnaea stagnalis

<400> 23

```
Met Thr Thr Asn Gly Glu Ile Leu Pro Val Gly Glu Glu Glu Glu Glu
 1                  5                  10                  15
Glu Leu Gly Glu Asp Ala Leu Leu Arg Lys Gln Ile Asp Cys Asn Thr
            20                  25                  30
Asn Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Ser Leu Cys Glu Glu
        35                  40                  45
Ser Lys Glu Ala Gly Ile Lys Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly
    50                  55                  60
Glu Gln Leu Asp Arg Ile Glu Glu Gly Met Gly Gln Ile Asn Gln Asp
65                  70                  75                  80
Met Arg Asp Ala Glu Lys Asn Leu Glu Gly Leu Glu Lys Cys Cys Gly
                85                  90                  95
Leu Cys Val Leu Pro Trp Lys Arg Ser Lys Asn Phe Glu Lys Gly Ser
            100                 105                 110
Asp Tyr Asn Lys Thr Trp Lys Ala Ser Glu Asp Gly Lys Ile Asn Thr
        115                 120                 125
Asn Gly Pro Arg Leu Val Val Asp Gln Gly Asn Gly Ser Gly Pro Thr
    130                 135                 140
Gly Gly Tyr Ile Thr Arg Ile Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asp Glu Met
145                 150                 155                 160
Glu Gln Asn Ile Gly Glu Val Ala Gly Met Val Ser Asn Leu Arg Asn
                165                 170                 175
Met Ala Val Asp Met Gly Asn Glu Ile Glu Ser Gln Asn Lys Gln Leu
            180                 185                 190
Asp Arg Ile Asn Gln Lys Gly Gly Ser Leu Asn Val Arg Val Asp Glu
        195                 200                 205
Ala Asn Lys Arg Ala Asn Arg Ile Leu Arg Lys Gln
```

210 215 220

<210> 24
<211> 207
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elegans

<400> 24
Met Ser Gly Asp Asp Asp Ile Pro Glu Gly Leu Glu Ala Ile Asn Leu
1 5 10 15
Lys Met Asn Ala Thr Thr Asp Asp Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30
Leu Ala Leu Cys Glu Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ile Lys Thr Leu Val
35 40 45
Met Leu Asp Asp Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Cys Glu Gly Ala Leu
50 55 60
Asp Thr Ile Asn Gln Asp Met Lys Glu Ala Glu Asp His Leu Lys Gly
65 70 75 80
Met Glu Lys Cys Cys Gly Leu Cys Val Leu Pro Trp Asn Lys Thr Asp
85 90 95
Asp Phe Glu Lys Thr Glu Phe Ala Lys Ala Trp Lys Lys Asp Asp Asp
100 105 110
Gly Gly Val Ile Ser Asp Gln Pro Arg Ile Thr Val Gly Asp Ser Ser
115 120 125
Met Gly Pro Gln Gly Gly Tyr Ile Thr Lys Ile Thr Asn Asp Ala Arg
130 135 140
Glu Asp Glu Met Asp Glu Asn Val Gln Gln Val Ser Thr Met Val Gly
145 150 155 160
Asn Leu Arg Asn Met Ala Ile Asp Met Ser Thr Glu Val Ser Asn Gln
165 170 175
Asn Arg Gln Leu Asp Arg Ile His Asp Lys Ala Gln Ser Asn Glu Val
180 185 190
Arg Val Glu Ser Ala Asn Lys Arg Ala Lys Asn Leu Ile Thr Lys
195 200 205

<210> 25
<211> 370
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Met Glu Pro Leu Phe Pro Ala Pro Phe Trp Glu Val Ile Tyr Gly Ser
1 5 10 15
His Leu Gln Gly Asn Leu Ser Leu Leu Ser Pro Asn His Ser Leu Leu
20 25 30
Pro Pro His Leu Leu Leu Asn Ala Ser His Gly Ala Phe Leu Pro Leu
35 40 45
Gly Leu Lys Val Thr Ile Val Gly Leu Tyr Leu Ala Val Cys Val Gly
50 55 60
Gly Leu Leu Gly Asn Cys Leu Val Met Tyr Val Ile Leu Arg His Thr
65 70 75 80
Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala
85 90 95
Asp Thr Leu Val Leu Leu Thr Leu Pro Phe Gln Gly Thr Asp Ile Leu

```
            100                 105                 110
Leu Gly Phe Trp Pro Phe Gly Asn Ala Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala
        115                 120                 125
Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Thr Phe Thr Leu Thr Ala Met
    130                 135                 140
Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys His Pro Ile Arg Ala Leu Asp
145                 150                 155                 160
Val Arg Thr Ser Ser Lys Ala Gln Ala Val Asn Val Ala Ile Trp Ala
                165                 170                 175
Leu Ala Ser Val Val Gly Val Pro Val Ala Ile Met Gly Ser Ala Gln
            180                 185                 190
Val Glu Asp Glu Glu Ile Glu Cys Leu Val Glu Ile Pro Thr Pro Gln
        195                 200                 205
Asp Tyr Trp Gly Pro Val Phe Ala Ile Cys Ile Phe Leu Phe Ser Phe
    210                 215                 220
Ile Val Pro Val Leu Val Ile Ser Val Cys Tyr Ser Leu Met Ile Arg
225                 230                 235                 240
Arg Leu Arg Gly Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg
                245                 250                 255
Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe
            260                 265                 270
Val Gly Cys Trp Thr Pro Val Gln Val Phe Val Leu Ala Gln Gly Leu
        275                 280                 285
Gly Val Gln Pro Ser Ser Glu Thr Ala Val Ala Ile Leu Arg Phe Cys
    290                 295                 300
Thr Ala Leu Gly Tyr Val Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala
305                 310                 315                 320
Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Ala Cys Phe Arg Lys Phe Cys Cys Ala
                325                 330                 335
Ser Ala Leu Arg Arg Asp Val Gln Val Ser Asp Arg Val Arg Ser Ile
            340                 345                 350
Ala Lys Asp Val Ala Leu Ala Cys Lys Thr Ser Glu Thr Val Pro Arg
        355                 360                 365
Pro Ala
    370
```

<210> 26
<211> 365
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

```
            100                 105                 110
Phe Gly Asn Ala Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Ile Asp Tyr Tyr Asn
        115                 120                 125
Met Phe Thr Ser Thr Phe Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Tyr
    130                 135                 140
Val Ala Ile Cys His Pro Ile Arg Ala Leu Asp Val Arg Thr Ser Ser
145                 150                 155                 160
Lys Ala Gln Ala Val Asn Val Ala Ile Trp Ala Leu Ala Ser Val Val
                165                 170                 175
Gly Val Pro Val Ala Ile Met Gly Ser Ala Gln Val Glu Asp Glu Glu
            180                 185                 190
Ile Glu Cys Leu Val Glu Ile Pro Thr Pro Gln Asp Tyr Trp Gly Pro
        195                 200                 205
Val Phe Ala Ile Cys Ile Phe Leu Phe Ser Phe Ile Val Pro Val Leu
    210                 215                 220
Val Ile Ser Val Cys Tyr Ser Leu Met Ile Arg Arg Leu Arg Gly Val
225                 230                 235                 240
Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile
                245                 250                 255
Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Gly Cys Trp Thr
            260                 265                 270
Pro Val Gln Val Phe Val Leu Ala Gln Gly Leu Gly Val Gln Pro Ser
        275                 280                 285
Ser Glu Thr Ala Val Ala Ile Leu Arg Phe Cys Thr Ala Leu Gly Tyr
    290                 295                 300
Val Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
305                 310                 315                 320
Phe Lys Ala Cys Phe Arg Lys Phe Cys Cys Ala Ser Ala Leu Arg Arg
                325                 330                 335
Asp Val Gln Val Ser Asp Arg Val Arg Ser Ile Ala Lys Asp Val Ala
            340                 345                 350
Leu Ala Cys Lys Thr Ser Glu Thr Val Pro Arg Pro Ala
        355                 360                 365


<210> 27
<211> 372
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Met Glu Pro Ala Pro Ser Ala Gly Ala Glu Leu Gln Pro Pro Leu Phe
 1               5                  10                  15
Ala Asn Ala Ser Asp Ala Tyr Pro Ser Ala Cys Pro Ser Ala Gly Ala
            20                  25                  30
Asn Ala Ser Gly Pro Pro Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ser Leu Ala Leu
        35                  40                  45
Ala Ile Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ser Ala Val Cys Ala Val Gly Leu
    50                  55                  60
Leu Gly Asn Val Leu Val Met Phe Gly Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met
65                  70                  75                  80
Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala
                85                  90                  95
Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Met Glu
            100                 105                 110
Thr Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys Ala Val Leu Ser Ile Asp
```

```
        115                 120                 125
Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val
    130                 135                 140
Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Ala Lys Ala Lys Leu Ile Asn Ile Cys Ile Trp Val Leu Ala
                165                 170                 175
Ser Gly Val Gly Val Pro Ile Met Val Met Ala Val Thr Arg Pro Arg
            180                 185                 190
Asp Gly Ala Val Val Cys Met Leu Gln Phe Pro Ser Pro Ser Trp Tyr
        195                 200                 205
Trp Asp Thr Val Thr Lys Ile Cys Val Phe Leu Phe Ala Phe Val Val
    210                 215                 220
Pro Ile Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Leu Leu Arg Leu
225                 230                 235                 240
Arg Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg Ser Leu
                245                 250                 255
Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Gly Ala Phe Val Val
            260                 265                 270
Cys Trp Ala Pro Ile His Ile Phe Val Ile Val Trp Thr Leu Val Asp
        275                 280                 285
Ile Asp Arg Arg Asp Pro Leu Val Val Ala Ala Leu His Leu Cys Ile
    290                 295                 300
Ala Leu Gly Tyr Ala Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe
305                 310                 315                 320
Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Gln Leu Cys Arg Lys Pro
                325                 330                 335
Cys Gly Arg Pro Asp Pro Ser Ser Phe Ser Arg Ala Arg Glu Ala Thr
            340                 345                 350
Ala Arg Glu Arg Val Thr Ala Cys Thr Pro Ser Asp Gly Pro Gly Gly
        355                 360                 365
Gly Ala Ala Ala
    370
```

<210> 28
<211> 372
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

```
Met Glu Pro Ala Pro Ser Ala Gly Ala Glu Leu Gln Pro Pro Leu Phe
 1               5                  10                  15
Ala Asn Ala Ser Asp Ala Tyr Pro Ser Ala Phe Pro Ser Ala Gly Ala
            20                  25                  30
Asn Ala Ser Gly Pro Pro Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ser Leu Ala Leu
        35                  40                  45
Ala Ile Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ser Ala Val Cys Ala Val Gly Leu
    50                  55                  60
Leu Gly Asn Val Leu Val Met Phe Gly Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met
65                  70                  75                  80
Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala
                85                  90                  95
Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Met Glu
            100                 105                 110
Thr Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys Ala Val Leu Ser Ile Asp
```

```
        115                 120                 125
Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val
    130                 135                 140
Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg
145                 150                 155                 160
Thr Pro Ala Lys Ala Lys Leu Ile Asn Ile Cys Ile Trp Val Leu Ala
                165                 170                 175
Ser Gly Val Gly Val Pro Ile Met Val Met Ala Val Thr Arg Pro Arg
            180                 185                 190
Asp Gly Ala Val Val Cys Met Leu Gln Phe Pro Ser Pro Ser Trp Tyr
        195                 200                 205
Trp Asp Thr Val Thr Lys Ile Cys Val Phe Leu Phe Ala Phe Val Val
    210                 215                 220
Pro Ile Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Leu Leu Arg Leu
225                 230                 235                 240
Arg Ser Val Arg Leu Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg Ser Leu
                245                 250                 255
Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Gly Ala Phe Val Val
            260                 265                 270
Cys Trp Ala Pro Ile His Ile Phe Val Ile Val Trp Thr Leu Val Asp
        275                 280                 285
Ile Asp Arg Arg Asp Pro Leu Val Val Ala Ala Leu His Leu Cys Ile
    290                 295                 300
Ala Leu Gly Tyr Ala Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe
305                 310                 315                 320
Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Gln Leu Cys Arg Lys Pro
                325                 330                 335
Cys Gly Arg Pro Asp Pro Ser Ser Phe Ser Arg Ala Arg Glu Ala Thr
            340                 345                 350
Ala Arg Glu Arg Val Thr Ala Cys Thr Pro Ser Asp Gly Pro Gly Gly
        355                 360                 365
Gly Ala Ala Ala
    370
```

<210> 29
<211> 380
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

```
Met Asp Ser Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Glu Pro Gly Pro Thr Cys
 1               5                  10                  15
Ala Pro Ser Ala Cys Leu Pro Pro Asn Ser Ser Ala Trp Phe Pro Gly
            20                  25                  30
Trp Ala Glu Pro Asp Ser Asn Gly Ser Ala Gly Ser Glu Asp Ala Gln
        35                  40                  45
Leu Glu Pro Ala His Ile Ser Pro Ala Ile Pro Val Ile Ile Thr Ala
    50                  55                  60
Val Tyr Ser Val Val Phe Val Val Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val
65                  70                  75                  80
Met Phe Val Ile Ile Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile
                85                  90                  95
Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Val Thr Thr Thr Met
            100                 105                 110
Pro Phe Gln Ser Thr Val Tyr Leu Met Asn Ser Trp Pro Phe Gly Asp
```

```
        115                 120                 125
Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr
    130                 135                 140
Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val
145                 150                 155                 160
Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys
                165                 170                 175
Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Ser
            180                 185                 190
Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile
        195                 200                 205
Glu Cys Ser Leu Gln Phe Pro Asp Asp Asp Tyr Ser Trp Trp Asp Leu
    210                 215                 220
Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu
225                 230                 235                 240
Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val
                245                 250                 255
Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile
            260                 265                 270
Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Val Cys Trp Thr
        275                 280                 285
Pro Ile His Ile Phe Ile Leu Val Glu Ala Leu Gly Ser Thr Ser His
    290                 295                 300
Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr
305                 310                 315                 320
Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
                325                 330                 335
Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Leu Lys Met Arg Met
            340                 345                 350
Glu Arg Gln Ser Thr Ser Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
        355                 360                 365
Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Gly Met Asn Lys Pro Val
    370                 375                 380
```

<210> 30
<211> 380
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

```
Met Glu Ser Pro Ile Gln Ile Phe Arg Gly Glu Pro Gly Pro Thr Cys
 1               5                  10                  15
Ala Pro Ser Ala Cys Leu Pro Pro Asn Ser Ser Ala Trp Phe Pro Gly
            20                  25                  30
Trp Ala Glu Pro Asp Ser Asn Gly Ser Ala Gly Ser Glu Asp Ala Gln
        35                  40                  45
Leu Glu Pro Ala His Ile Ser Pro Ala Ile Pro Val Ile Ile Thr Ala
    50                  55                  60
Val Tyr Ser Val Val Phe Val Val Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val
65                  70                  75                  80
Met Phe Val Ile Ile Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile
                85                  90                  95
Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ala Leu Val Thr Thr Thr Met
            100                 105                 110
Pro Phe Gln Ser Thr Val Tyr Leu Met Asn Ser Trp Pro Phe Gly Asp
```

```
        115                 120                 125
Val Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr
    130                 135                 140
Ser Ile Phe Thr Leu Thr Met Met Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val
145                 150                 155                 160
Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp Phe Arg Thr Pro Leu Lys Ala Lys
                165                 170                 175
Ile Ile Asn Ile Cys Ile Trp Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Ser
            180                 185                 190
Ala Ile Val Leu Gly Gly Thr Lys Val Arg Glu Asp Val Asp Val Ile
        195                 200                 205
Glu Cys Ser Leu Gln Phe Pro Asp Asp Asp Tyr Ser Trp Trp Asp Leu
    210                 215                 220
Phe Met Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe Val Ile Pro Val Leu
225                 230                 235                 240
Ile Ile Ile Val Cys Tyr Thr Leu Met Ile Leu Arg Leu Lys Ser Val
                245                 250                 255
Arg Leu Leu Ser Gly Ser Arg Glu Lys Asp Arg Asn Leu Arg Arg Ile
            260                 265                 270
Thr Arg Leu Val Leu Val Val Val Ala Val Phe Val Val Cys Trp Thr
        275                 280                 285
Pro Ile His Ile Phe Ile Leu Val Glu Ala Leu Gly Ser Thr Ser His
    290                 295                 300
Ser Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Tyr Phe Cys Ile Ala Leu Gly Tyr
305                 310                 315                 320
Thr Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Glu Asn
                325                 330                 335
Phe Lys Arg Cys Phe Arg Asp Phe Cys Phe Pro Leu Lys Met Arg Met
            340                 345                 350
Glu Arg Gln Ser Thr Ser Arg Val Arg Asn Thr Val Gln Asp Pro Ala
        355                 360                 365
Tyr Leu Arg Asp Ile Asp Gly Met Asn Lys Pro Val
    370                 375                 380
```

<210> 31
<211> 493
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

```
Met Cys Leu His Arg Arg Val Pro Ser Glu Glu Thr Tyr Ser Leu Asp
 1               5                  10                  15
Arg Phe Ala Gln Asn Pro Pro Leu Phe Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ala
            20                  25                  30
Ser Glu Ser Arg Met Ala His Ala Pro Leu Leu Gln Arg Cys Gly Ala
        35                  40                  45
Ala Arg Thr Gly Phe Cys Lys Lys Gln Gln Glu Leu Trp Gln Arg Arg
    50                  55                  60
Lys Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Thr Arg Lys Val Ser Val Leu Leu
65                  70                  75                  80
Ala Thr Ser His Ser Gly Ala Arg Pro Ala Val Ser Thr Met Asp Ser
                85                  90                  95
Ser Ala Ala Pro Thr Asn Ala Ser Asn Cys Thr Asp Ala Leu Ala Tyr
            100                 105                 110
Ser Ser Cys Ser Pro Ala Pro Ser Pro Gly Ser Trp Val Asn Leu Ser
```

```
        115                 120                 125
His Leu Asp Gly Asn Leu Ser Asp Pro Cys Gly Pro Asn Arg Thr Asp
    130                 135                 140
Leu Gly Gly Arg Asp Ser Leu Cys Pro Pro Thr Gly Ser Pro Ser Met
145                 150                 155                 160
Ile Thr Ala Ile Thr Ile Met Ala Leu Tyr Ser Ile Val Cys Val Val
                165                 170                 175
Gly Leu Phe Gly Asn Phe Leu Val Met Tyr Val Ile Val Arg Tyr Thr
            180                 185                 190
Lys Met Lys Thr Ala Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala
        195                 200                 205
Asp Ala Leu Ala Thr Ser Thr Leu Pro Phe Gln Ser Val Asn Tyr Leu
    210                 215                 220
Met Gly Thr Trp Pro Phe Gly Thr Ile Leu Cys Lys Ile Val Ile Ser
225                 230                 235                 240
Ile Asp Tyr Tyr Asn Met Phe Thr Ser Ile Phe Thr Leu Cys Thr Met
                245                 250                 255
Ser Val Asp Arg Tyr Ile Ala Val Cys His Pro Val Lys Ala Leu Asp
            260                 265                 270
Phe Arg Thr Pro Arg Asn Ala Lys Ile Ile Asn Val Cys Asn Trp Ile
        275                 280                 285
Leu Ser Ser Ala Ile Gly Leu Pro Val Met Phe Met Ala Thr Thr Lys
    290                 295                 300
Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Asp Cys Thr Leu Thr Phe Ser His Pro Thr
305                 310                 315                 320
Trp Tyr Trp Glu Asn Leu Leu Lys Ile Cys Val Phe Ile Phe Ala Phe
                325                 330                 335
Ile Met Pro Val Leu Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Leu Met Ile Leu
            340                 345                 350
Arg Leu Lys Ser Val Arg Met Leu Ser Gly Ser Lys Glu Lys Asp Arg
        355                 360                 365
Asn Leu Arg Arg Ile Thr Arg Met Val Leu Val Val Val Ala Val Phe
    370                 375                 380
Ile Val Cys Trp Thr Pro Ile His Ile Tyr Val Ile Ile Lys Ala Leu
385                 390                 395                 400
Val Thr Ile Pro Glu Thr Thr Phe Gln Thr Val Ser Trp His Phe Cys
                405                 410                 415
Ile Ala Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala
            420                 425                 430
Phe Leu Asp Glu Asn Phe Lys Arg Cys Phe Arg Glu Phe Cys Ile Pro
        435                 440                 445
Thr Ser Ser Asn Ile Glu Gln Gln Asn Ser Thr Arg Ile Arg Gln Asn
    450                 455                 460
Thr Arg Asp His Pro Ser Thr Ala Asn Thr Val Asp Arg Thr Asn His
465                 470                 475                 480
Gln Leu Glu Asn Leu Glu Ala Glu Thr Ala Pro Leu Pro
                485                 490
```

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre
en el P1

<400> 32
Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<400> 33
Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<400> 34
Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<400> 35
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

<210> 36
<211> 9

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<400> 36
Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el P1

<400> 37
Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5 10

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<400> 38
Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5 10

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<400> 39
Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
1 5 10

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antigeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal carboxilado libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<221> SITIO
<222> (13)...(13)
<223> glutamina carboxilada

<400> 40
Cys Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1   5   10

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antigeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el P1

<400> 41
Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1   5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antigeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<400> 42
Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1   5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<400> 43
Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<400> 44
Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<400> 45
Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<400> 46
Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
1 5 10

<210> 47
<211> 13

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25 con un extremo carboxiloterminal carboxilado libre en el residuo de P1 del enlace escísil del sitio de escisión de la BoNT/A

<221> SITIO
<222> (13)...(13)
<223> Lisina carboxilada

<400> 47
Cys Asp Met Asn Lys Ala Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1   5   10

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25

<400> 48
Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
 1   5   10

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Antígeno de la SNAP-25

<400> 49
Cys Gly Gly Gly Arg Ile Asp Glu Ala Asn Lys
 1   5   10

<210> 50
<211> 88
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> BirA-HisTag?-SNAP-25-134-197

<400> 50
Met Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
 1   5   10   15
His His His His His His His His Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala
            20   25   30

Arg Glu Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile
35 40 45
Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr
50 55 60
Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys
65 70 75 80
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln
85

<210> 51
<211> 97
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> BirA-HisTag?-SNAP-25-134-206

<400> 51
Met Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
1 5 10 15
His His His His His His His His Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala
20 25 30
Arg Glu Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile
35 40 45
Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr
50 55 60
Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys
65 70 75 80
Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser
85 90 95
Gly

<210> 52
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido de BirA

<400> 52
Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
1 5 10 15

<210> 53
<211> 7570
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcción de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC.

<400> 53
gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc
tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct
gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg
aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat
acgttgtatc 240
catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca
tgttgacatt 300
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat
agcccatata 360
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg
cccaacgacc 420
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata
gggactttcc 480
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta
catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc
gcctggcatt 600
atgcccagta catgaccttа tgggactttc ctacttggca gtacatctac
gtattagtca 660
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga
tagcggtttg 720
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg
ttttggcacc 780
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg
caaatgggcg 840
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac
cgtcagatcg 900
cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac
cgatccagcc 960
tccgcgggcc accatggagg gcccggttac cggtaccgga tccagatatc
tgggcggccg 1020
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag
aagaactctt 1080
cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatggtgat gttaacggcc
acaagttctc 1140
tgtcagtgga gagggtgaag gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga
agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt
gctatggtgt 1260
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gacttttтca
agagtgccat 1320
gcccgaaggt tatgtacagg aaaggaccat cttcttcaaa gatgacggca
actacaagac 1380
acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac ccttgttaat agaatcgagt
taaaaggtat 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact
ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact
tcaagacccg 1560
ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa
atactccaat 1620

tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaat
ctgccctttc 1680
gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagtttgtaa
cagctgctgg 1740
gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga ggcggaggtg
gacctttgt 1800
taataaacaa tttaattata aagatcctgt aaatggtgtt gatattgctt
atataaaaat 1860
tccaaatgca ggacaaatgc aaccagtaaa agcttttaaa attcataata
aaatatgggt 1920
tattccagaa agagatacat ttacaaatcc tgaagaagga gatttaaatc
caccaccaga 1980
agcaaaacaa gttccagttt catattatga ttcaacatat ttaagtacag
ataatgaaaa 2040
agataattat ttaaagggag ttacaaaatt atttgagaga atttattcaa
ctgatcttgg 2100
aagaatgttg ttaacatcaa tagtaagggg aataccattt tggggtggaa
gtacaataga 2160
tacagaatta aaagttattg atactaattg tattaatgtg atacaaccag
atggtagtta 2220
tagatcagaa gaacttaatc tagtaataat aggaccctca gctgatatta
tacagtttga 2280
atgtaaaagc tttggacatg aagttttgaa tcttacgcga aatggttatg
gctctactca 2340
atacattaga tttagcccag attttacatt tggttttgag gagtcacttg
aagttgatac 2400
aaatcctctt ttaggtgcag gcaaatttgc tacagatcca gcagtaacat
tagcacatga 2460
acttatacat gctggacata gattatatgg aatagcaatt aatccaaata
gggtttttaa 2520
agtaaatact aatgcctatt atgaaatgag tgggttagaa gtaagctttg
aggaacttag 2580
aacatttggg ggacatgatg caaagtttat agatagttta caggaaaacg
aatttcgtct 2640
atattattat aataagttta aagatatagc aagtacactt aataaagcta
aatcaatagt 2700
aggtactact gcttcattac agtatatgaa aaatgttttt aaagagaaat
atctcctatc 2760
tgaagataca tctggaaaat tttcggtaga taaattaaaa tttgataagt
tatacaaaat 2820
gttaacagag atttacacag aggataattt tgttaagttt tttaaagtac
ttaacagaaa 2880
aacatatttg aattttgata aagccgtatt taagataaat atagtaccta
aggtaaatta 2940
cacaatatat gatggattta atttaagaaa tacaaattta gcagcaaact
ttaatggtca 3000
aaatacagaa attaataata tgaattttac taaactaaaa aattttactg
gattgtttga 3060
attttataag ttgctatgtg taagagggat aatcacttcg aaatgaacgc
gttggcccta 3120
ttctatagtg tcacctaaat gctagagctc gctgatcagc ctcgactgtg
ccttctagtt 3180
gccagccatc tgttgtttgc ccctcccccg tgccttcctt gaccctggaa
ggtgccactc 3240
ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt
aggtgtcatt 3300

ctattctggg gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa
gacaatagca 3360
ggcatgctgg ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc
agctggggct 3420
ctagggggta tccccacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt
gtggtggtta 3480
cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc
gctttcttcc 3540
cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg
ggcatcccct 3600
tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat
tagggtgatg 3660
gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg
ttggagtcca 3720
cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct
atctcggtct 3780
attcttttga tttataaggg attttgggga tttcggccta ttggttaaaa
aatgagctga 3840
tttaacaaaa atttaacgcg aattaattct gtggaatgtg tgtcagttag
ggtgtggaaa 3900
gtccccaggc tccccaggca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat
tagtcagcaa 3960
ccaggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc
atgcatctca 4020
attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccat cccgccccta
actccgccca 4080
gttccgccca ttctccgccc catggctgac taatttttt tatttatgca
gaggccgagg 4140
ccgcctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttggga
ggcctaggct 4200
tttgcaaaaa gctcccggga gcttgtatat ccattttcgg atctgatcaa
gagacaggat 4260
gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg
gccgcttggg 4320
tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct
gatgccgccg 4380
tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac
ctgtccggtg 4440
ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg
acgggcgttc 4500
cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg
ctattgggcg 4560
aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa
gtatccatca 4620
tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca
ttcgaccacc 4680
aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt
gtcgatcagg 4740
atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc
aggctcaagg 4800
cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc
ttgccgaata 4860
tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg
ggtgtggcgg 4920
accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt
ggcggcgaat 4980

gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag
cgcatcgcct 5040
tctatcgcct tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa
tgaccgacca 5100
agcgacgccc aacctgccat cacgagattt cgattccacc gccgccttct
atgaaaggtt 5160
gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg
gggatctcat 5220
gctggagttc ttcgcccacc ccaacttgtt tattgcagct tataatggtt
acaaataaag 5280
caatagcatc acaaatttca caaataaagc attttttttca ctgcattcta
gttgtggttt 5340
gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataccg tcgacctcta
gctagagctt 5400
ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca
caattccaca 5460
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag
tgagctaact 5520
cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt
cgtgccagct 5580
gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc
gctcttccgc 5640
ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg
tatcagctca 5700
ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa
agaacatgtg 5760
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg
cgtttttcca 5820
taggctccgc cccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga
ggtggcgaaa 5880
cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg
tgcgctctcc 5940
tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg
gaagcgtggc 6000
gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc
gctccaagct 6060
gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg
gtaactatcg 6120
tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca
ctggtaacag 6180
gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt
ggcctaacta 6240
cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag
ttaccttcgg 6300
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg
gtggtttttt 6360
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc
ctttgatctt 6420
ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt
tggtcatgag 6480
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt
ttaaatcaat 6540
ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca
gtgaggcacc 6600
tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg
tcgtgtagat 6660

aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac
cgcgagaccc 6720
acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg
ccgagcgcag 6780
aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc
gggaagctag 6840
agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt gccattgcta
caggcatcgt 6900
ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac
gatcaaggcg 6960
agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc
ctccgatcgt 7020
tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac
tgcataattc 7080
tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact
caaccaagtc 7140
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa
tacgggataa 7200
taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt
cttcggggcg 7260
aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca
ctcgtgcacc 7320
caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa
aaacaggaag 7380
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac
tcatactctt 7440
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg
gatacatatt 7500
tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc
gaaaagtgcc 7560
acctgacgtc
7570

<210> 54
<211> 682
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera GFP-BoNT/A.

<400> 54
Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1   5   10   15
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
            20   25   30
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
        35   40   45
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
    50   55   60
Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
65   70   75   80
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
                85   90   95

```
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
                100                 105                 110
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
        115                 120                 125
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
    130                 135                 140
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145                 150                 155                 160
Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
                165                 170                 175
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
            180                 185                 190
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
        195                 200                 205
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
    210                 215                 220
Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp
225                 230                 235                 240
Gly Gly Gly Gly Gly Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp
                245                 250                 255
Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly
            260                 265                 270
Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val
        275                 280                 285
Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn
    290                 295                 300
Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr
305                 310                 315                 320
Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr
                325                 330                 335
Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu
            340                 345                 350
Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp
        355                 360                 365
Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro
    370                 375                 380
Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro
385                 390                 395                 400
Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val
                405                 410                 415
Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe
            420                 425                 430
Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr
        435                 440                 445
Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr
    450                 455                 460
Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala
465                 470                 475                 480
Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu
                485                 490                 495
Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly
            500                 505                 510
His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu
        515                 520                 525
Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala
    530                 535                 540
```

```
Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val
545                 550                 555                 560
Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser
                565                 570                 575
Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile
            580                 585                 590
Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys
        595                 600                 605
Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro
    610                 615                 620
Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn
625                 630                 635                 640
Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn
                645                 650                 655
Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu
            660                 665                 670
Leu Cys Val Arg Gly Ile Ile Thr Ser Lys
        675                 680
```

<210> 55
<211> 6259
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcción de expresión pQBI-25/GFP.

<400> 55
gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc
tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct
gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg
aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcc tcgaggcctg gccattgcat
acgttgtatc 240
catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac attaccgcca
tgttgacatt 300
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat
agcccatata 360
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg
cccaacgacc 420
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata
gggactttcc 480
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta
catcaagtgt 540
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc
gcctggcatt 600
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac
gtattagtca 660
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga
tagcggtttg 720
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg
ttttggcacc 780

aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg
caaatgggcg 840
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac
cgtcagatcg 900
cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac
cgatccagcc 960
tccgcgggcc accatggagg gcccggttac cggtaccgga tccagatatc
tgggcggccg 1020
ctcagcaagc ttcgcgaatt cgggaggcgg aggtggagct agcaaaggag
aagaactctt 1080
cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt agatggtgat gttaacggcc
acaagttctc 1140
tgtcagtgga gagggtgaag gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctga
agttcatctg 1200
cactactggc aaactgcctg ttccatggcc aacactagtc actactctgt
gctatggtgt 1260
tcaatgcttt tcaagatacc cggatcatat gaaacggcat gacttttca
agagtgccat 1320
gcccgaaggt tatgtacagg aaaggaccat cttcttcaaa gatgacggca
actacaagac 1380
acgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac ccttgttaat agaatcgagt
taaaaggtat 1440
tgacttcaag gaagatggca acattctggg acacaaattg gaatacaact
ataactcaca 1500
caatgtatac atcatggcag acaaacaaaa gaatggaatc aaagtgaact
tcaagacccg 1560
ccacaacatt gaagatggaa gcgttcaact agcagaccat tatcaacaaa
atactccaat 1620
tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa ccattacctg tccacacaat
ctgccctttc 1680
gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat ggtccttctt gagtttgtaa
cagctgctgg 1740
gattacacat ggcatggatg aactgtacaa catcgatgga ggcggaggtg
gatgaacgcg 1800
ttggccctat tctatagtgt cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc
tcgactgtgc 1860
cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctcccccgt gccttccttg
accctggaag 1920
gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcatcgcat
tgtctgagta 1980
ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caaggggag
gattgggaag 2040
acaatagcag gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggc ttctgaggcg
gaaagaacca 2100
gctggggctc taggggtat ccccacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc
gcggcgggtg 2160
tggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgccc
gctcctttcg 2220
ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg ccggctttcc ccgtcaagct
ctaaatcggg 2280
gcatcccttt agggttccga tttagtgctt tacggcacct cgaccccaaa
aaacttgatt 2340
agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc
cctttgacgt 2400
tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaacaaca
ctcaacccta 2460

tctcggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttggggat ttcggcctat
tggttaaaaa 2520
atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attaattctg tggaatgtgt
gtcagttagg 2580
gtgtggaaag tccccaggct ccccaggcag gcagaagtat gcaaagcatg
catctcaatt 2640
agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt
atgcaaagca 2700
tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc
ccgcccctaa 2760
ctccgcccag ttccgcccat tctccgcccc atggctgact aatttttttt
atttatgcag 2820
aggccgaggc cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc
ttttttggag 2880
gcctaggctt ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatatc cattttcgga
tctgatcaag 2940
agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg aacaagatgg attgcacgca
ggttctccgg 3000
ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc
ggctgctctg 3060
atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggt tctttttgtc
aagaccgacc 3120
tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg
ctggccacga 3180
cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg
gactggctgc 3240
tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct
gccgagaaag 3300
tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgct tgatccggct
acctgcccat 3360
tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc gagcacgtac tcggatggaa
gccggtcttg 3420
tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa
ctgttcgcca 3480
ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc
gatgcctgct 3540
tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt
ggccggctgg 3600
gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg tgatattgct
gaagagcttg 3660
gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat cgccgctccc
gattcgcagc 3720
gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg
ggttcgaaat 3780
gaccgaccaa gcgacgccca acctgccatc acgagatttc gattccaccg
ccgccttcta 3840
tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccggc tggatgatcc
tccagcgcgg 3900
ggatctcatg ctggagttct tcgcccaccc caacttgttt attgcagctt
ataatggtta 3960
caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca ttttttttcac
tgcattctag 4020
ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt
cgacctctag 4080
ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt
atccgctcac 4140

aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg
cctaatgagt 4200
gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg
gaaacctgtc 4260
gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc
gtattgggcg 4320
ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc
ggcgagcggt 4380
atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata
acgcaggaaa 4440
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg
cgttgctggc 4500
gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct
caagtcagag 4560
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccccctggaa
gctccctcgt 4620
gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc
tcccttcggg 4680
aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt
aggtcgttcg 4740
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg
ccttatccgg 4800
taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg
cagcagccac 4860
tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct
tgaagtggtg 4920
gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc
tgaagccagt 4980
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg
ctggtagcgg 5040
tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc
aagaagatcc 5100
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt
aagggatttt 5160
ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa
aatgaagttt 5220
taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat
gcttaatcag 5280
tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct
gactccccgt 5340
cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgctg
caatgatacc 5400
gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag
ccggaagggc 5460
cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta
attgttgccg 5520
ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg
ccattgctac 5580
aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg
gttcccaacg 5640
atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct
ccttcggtcc 5700
tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta
tggcagcact 5760
gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg
gtgagtactc 5820

aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc
cggcgtcaat 5880
acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg
gaaaacgttc 5940
ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga
tgtaacccac 6000
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg
ggtgagcaaa 6060
aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat
gttgaatact 6120
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc
tcatgagcgg 6180
atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca
catttccccg 6240
aaaagtgcca cctgacgtc
6259

<210> 56
<211> 245
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos GFP.

<400> 56
Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1   5   10   15
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
            20   25   30
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
        35   40   45
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
    50   55   60
Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
65   70   75   80
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
                85   90   95
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
            100   105   110
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
        115   120   125
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
    130   135   140
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145   150   155   160
Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
                165   170   175
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
            180   185   190
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
        195   200   205
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
    210   215   220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Asn Ile Asp
225 230 235 240
Gly Gly Gly Gly Gly
245

<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Espaciador flexible G-espaciador

<400> 57
Gly Gly Gly Gly
1

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Espaciador flexible G-espaciador

<400> 58
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Espaciador flexible A-espaciador

<400> 59
Ala Ala Ala Ala
1

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Espaciador flexible A-espaciador

<400> 60
Ala Ala Ala Ala Val
1 5

<210> 61
<211> 3359
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 61
gtcgaggtgc tcatagtgga gccctggctc ccgggcggac ggagccgcac
ggtagtagat 60
gggggtgtgg ccgtggcccc cgactctgct cggcggggcc gttcctgctt
tgccatccgt 120
gtgggacttc cacgacagtg gaggcacgag agctgggccc catatgctgc
ttgcccagct 180
tgggaaagag gaggctgctg caaaggaccg atcggcggct tcgggctgcc
ggctcactcg 240
gctgctgcgt ctggtctggc gtctgctgag aagatcctct tctaccctgc
tctgcacctg 300
tgctcgactg ccagccggct gagggcgggg gtctccacgg tggtcccagc
tcccaaggag 360
gttgcagaag taccgtacag agtggatttg cagggcagtg gcatggagcc
cctcttcccc 420
gcgccgttct gggaggttat ctacggcagc caccttcagg gcaacctgtc
cctcctgagc 480
cccaaccaca gtctgctgcc cccgcatctg ctgctcaatg ccagccacgg
cgccttcctg 540
cccctcgggc tcaaggtcac catcgtgggg ctctacctgg ccgtgtgtgt
cggagggctc 600
ctggggaact gccttgtcat gtacgtcatc ctcaggcaca ccaaaatgaa
gacagccacc 660
aatatttaca tctttaacct ggccctggcc gacactctgg tcctgctgac
gctgcccttc 720
cagggcacgg acatcctcct gggcttctgg ccgtttggga atgcgctgtg
caagacagtc 780
attgccattg actactacaa catgttcacc agcaccttca ccctaactgc
catgagtgtg 840
gatcgctatg tagccatctg ccaccccatc cgtgccctcg acgtccgcac
gtccagcaaa 900
gcccaggctg tcaatgtggc catctgggcc ctggcctctg ttgtcggtgt
tcccgttgcc 960
atcatgggct cggcacaggt cgaggatgaa gagatcgagt gcctggtgga
gatccctacc 1020
cctcaggatt actggggccc ggtgtttgcc atctgcatct tcctcttctc
cttcatcgtc 1080
cccgtgctcg tcatctctgt ctgctacagc ctcatgatcc ggcggctccg
tggagtccgc 1140
ctgctctcgg gctcccgaga gaaggaccgg aacctgcggc gcatcactcg
gctggtgctg 1200
gtggtagtgg ctgtgttcgt gggctgctgg acgcctgtcc aggtcttcgt
gctggcccaa 1260
gggctggggg ttcagccgag cagcgagact gccgtggcca ttctgcgctt
ctgcacggcc 1320
ctgggctacg tcaacagctg cctcaacccc atcctctacg ccttcctgga
tgagaacttc 1380
aaggcctgct tccgcaagtt ctgctgtgca tctgccctgc gccgggacgt
gcaggtgtct 1440

gaccgcgtgc gcagcattgc caaggacgtg gccctggcct gcaagacctc
tgagacggta 1500
ccgcggcccg catgactagg cgtggacctg cccatggtgc ctgtcagccc
gcagagccca 1560
tctacgccca acacagagct cacacaggtc actgctctct aggcggacac
accctgggcc 1620
ctgagcatcc agagcctggg atgggctttt ccctgtgggc cagggatgct
cggtcccaga 1680
ggaggaccta gtgacatcat gggacaggtc aaagcattag ggccacctcc
atggccccag 1740
acagactaaa gctgccctcc tggtgcaggg ccgaggggac acaaggacct
acctggaagc 1800
agctgacatg ctggtggacg gccgtgactg gagcccgtgc ccctccctcc
ccgtgcttca 1860
tgtgactctt ggcctctctg ctgctgcgtt ggcagaaccc tgggtgggca
ggcacccgga 1920
ggaggagcag cagctgtgtc atcctgtgcc ccccatgtgc tgtgtgctgt
ttgcatggca 1980
gggctccagc tgccttcagc cctgtgacgt ctcctcaggg cagctggaca
ggcttggcac 2040
tgcccgggaa gtgcagcagg cagcttttct ttggggtggg acttgccctg
agcttggagc 2100
tgccacctgg aggacttgcc tgttccgact ccacctgtgc agccggggcc
accccaggag 2160
aaagtgtcca ggtgggggct ggcagtccct ggctgcagac cccgagctgg
ccctgggcca 2220
gccgcacctc tgaaggtttt ctgtgtgctg cacggtgcag gcctcatccc
tgactgcagc 2280
ttgactctgg gcccaacccc catttccctt caggagacca gcgagaggcc
ctggcccatt 2340
ccctccagcg gtgcaatgaa ctatcatgct gtggaccgtc aacccagccc
tgcttctcag 2400
tgtggggcag gtgtctcagg acgaaggcgc cgcgtgacca catgggcagc
tctgttcaca 2460
aagtggaggc ctcgttttcc tggtcttgac tgctctgttt gggtgggaga
agattctctg 2520
ggggtcccca catcctccca aggctccact cacagcctct cctttgcttg
aagccagagg 2580
tcagtggccg tgctgtgttg cgggggaagc tgtgtggaag gagaagctgg
tggccacagc 2640
agagtcctgc tctggggacg cctgcttcat ttacaagcct caagatggct
ctgtgtaggg 2700
cctgagcttg ctgcccaacg ggaggatggc ttcacagcag agccagcatg
aggggtgggg 2760
cctggcaggg cttgcttgag ccaaactgca aaggctgtgg tggctgtgag
gacactgcgg 2820
gggttggggg gggggcgtct gtacctcagg ggatgccccg ctgtggtcac
ccagagaatc 2880
acccttcctg gtctacagat ggaagctgca ggttggtgac tttgcaaatg
cacttcctac 2940
agatgaacta ttaaaagacc tgcaacattg aaaaaactca ttttttccac
caaaaccttg 3000
gccaggtaac ctaccttagg cacctgcaaa gaacaggaag tgatggctgt
ctcgcaacag 3060
agcctgggct gctcctcctg ctctggggag tctaggccgt ggggactgtt
ctggggaggc 3120

tcatgctgtc tccatgacgt ctgtggcagg agtccctgag gacgggagct
gcctagctac 3180
agttttcttg ccaaggcgag gtgttttgtg aatctgtgct gatgtaatgt
gcaccttcac 3240
gtatttatgc atgtggcaag cgttacttcc tgtgcacgta gccagccctg
ggtctgtctc 3300
tggggtaatg aaaaaggacc ctaataaaca cctgctcact ggctgggtat tcttcgtaa
3359

<210> 62
<211> 1134
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 62
ttgcagggca gtggcatgga gcccctcttc cccgcgccgt tctgggaggt
tatctacggc 60
agccaccttc agggcaacct gtccctcctg agccccaacc acagtctgct
gcccccgcat 120
ctgctgctca atgccagcca cggcgccttc ctgcccctcg ggctcaaggt
caccatcgtg 180
gggctctacc tggccgtgtg tgtcggaggg ctcctgggga actgccttgt
catgcacacc 240
aaaatgaaga cagccaccaa tatttacatc tttaacctgg ccctggccga
cactctggtc 300
ctgctgacgc tgcccttcca gggcacggac atcctcctgg gcttctggcc
gtttgggaat 360
gcgctgtgca agacagtcat tgccattgac tactacaaca tgttcaccag
caccttcacc 420
ctaactgcca tgagtgtgga tcgctatgta gccatctgcc accccatccg
tgccctcgac 480
gtccgcacgt ccagcaaagc ccaggctgtc aatgtggcca tctgggccct
ggcctctgtt 540
gtcggtgttc ccgttgccat catgggctcg gcacaggtcg aggatgaaga
gatcgagtgc 600
ctggtggaga tccctacccc tcaggattac tggggcccgg tgtttgccat
ctgcatcttc 660
ctcttctcct tcatcgtccc cgtgctcgtc atctctgtct gctacagcct
catgatccgg 720
cggctccgtg gagtccgcct gctctcgggc tcccgagaga aggaccggaa
cctgcggcgc 780
atcactcggc tggtgctggt ggtagtggct gtgttcgtgg gctgctggac
gcctgtccag 840
gtcttcgtgc tggcccaagg gctgggggtt cagccgagca gcgagactgc
cgtggccatt 900
ctgcgcttct gcacggccct gggctacgtc aacagctgcc tcaaccccat
cctctacgcc 960
ttcctggatg agaacttcaa ggcctgcttc cgcaagttct gctgtgcatc
tgccctgcgc 1020
cgggacgtgc aggtgtctga ccgcgtgcgc agcattgcca aggacgtggc
cctggcctgc 1080
aagacctctg agacggtacc gcggcccgca tgactaggcg tggacctgcc catg
1134

<210> 63
<211> 1774

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 63
ccgaggagcc tgcggctgct cctggctcac agcgctccgg gcgaggagag
cgggcggacg 60
ccgggggctg ggccggtgcg ggcggcgagg caggcggacg aggcgcagag
acagcggggc 120
ggccggggcg cggcagccgg cggcgtcggg gccgcggcct ctgccttgcc
gctcccctcg 180
cgtcggatcc ccgcgcccag ggcgcacggt ggagagggac gcggcggagc
cggccggcag 240
ccatggaacc ggcccctcc gccggcgccg agctgcagcc cccgctcttc
gccaacgcct 300
cggacgccta ccctagcgcc tgccccagcg ctggcgccaa tgcgtcgggg
ccgccaggcg 360
cgcggagcgc ctcgtccctc gccctggcaa tcgccatcac cgcgctctac
tcggccgtgt 420
gcgccgtggg gctgctgggc aacgtgcttg tcatgttcgg catcgtccgg
tacactaaga 480
tgaagacggc caccaacatc tacatcttca acctggcctt agccgatgcg
ctggccacca 540
gcacgctgcc tttccagagt gccaagtacc tgatggagac gtggcccttc
ggcgagctgc 600
tctgcaaggc tgtgctctcc atcgactact acaatatgtt caccagcatc
ttcacgctca 660
ccatgatgag tgttgaccgc tacatcgctg tctgccaccc tgtcaaggcc
ctggacttcc 720
gcacgcctgc caaggccaag ctgatcaaca tctgtatctg ggtcctggcc
tcaggcgttg 780
gcgtgcccat catggtcatg gctgtgaccc gtccccggga cggggcagtg
gtgtgcatgc 840
tccagttccc cagccccagc tggtactggg acacggtgac caagatctgc
gtgttcctct 900
tcgccttcgt ggtgcccatc ctcatcatca ccgtgtgcta tggcctcatg
ctgctgcgcc 960
tgcgcagtgt gcgcctgctg tcgggctcca aggagaagga ccgcagcctg
cggcgcatca 1020
cgcgcatggt gctggtggtt gtgggcgcct tcgtggtgtg ttgggcgccc
atccacatct 1080
tcgtcatcgt ctggacgctg gtggacatcg accggcgcga cccgctggtg
gtggctgcgc 1140
tgcacctgtg catcgcgctg ggctacgcca atagcagcct caaccccgtg
ctctacgctt 1200
tcctcgacga gaacttcaag cgctgcttcc gccagctctg ccgcaagccc
tgcggccgcc 1260
cagaccccag cagcttcagc cgcgcccgcg aagccacggc ccgcgagcgt
gtcaccgcct 1320
gcaccccgtc cgatggtccc ggcggtggcg ctgccgcctg accaggccat
ccggccccca 1380
gagcgccgct ccctagtgac ccggaggcca catgagtccc agtgggaggc
gcgagccatg 1440
atgtggagtg gggcagtaga aggtcggagg cttgggaccg ccagatgggg
cctctgtttc 1500
ggagacggga ccgggccgct agatgggcat ggggtgggcc tctggtttgg
ggcgaggcag 1560

aggacagatc aatggcgcag tgcctctggt ctgggtgccc cgtccacggc
tctaggtggg 1620
gcgggaaagc cagtgactcc aggagaggag cgggacctgt ggctctacaa
ctgagtcctt 1680
aaacagggca tctccaggaa ggcggggctt caaccttgag acagcttcgg
tttctaactt 1740
ggagccggac tttcggagtt gggggtccgg gccc
1774

<210> 64
<211> 1773
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 64
ccgaggagcc tgcgctgctc ctggctcaca gcgctccggg cgaggagagc
gggcggaccg 60
gggggctggg ccggtgcggg cggcgaggca ggcggacgag gcgcagagac
agcggggcgg 120
ccggggcgcg gcacgcggcg ggtcggggcc ggcctctgcc ttgccgctcc
cctcgcgtcg 180
gatccccgcg cccaggcagc cggtggagag ggacgcggcg gacgccggca
gccatggaac 240
cggccccctc cgccggcgcc gagctgcagc ccccgctctt cgccaacgcc
tcggacgcct 300
accctagcgc cttccccagc gctggcgcca atgcgtcggg gccgccaggc
gcgcggagcg 360
cctcgtccct cgccctggca atcgccatca ccgcgctcta ctcggccgtg
tgcgccgtgg 420
ggctgctggg caacgtgctt gtcatgttcg gcatcgtccg gtacactaag
atgaagacgg 480
ccaccaacat ctacatcttc aacctggcct tagccgatgc gctggccacc
agcacgctgc 540
ctttccagag tgccaagtac ctgatggaga cgtggccctt cggcgagctg
ctctgcaagg 600
ctgtgctctc catcgactac tacaatatgt tcaccagcat cttcacgctc
accatgatga 660
gtgttgaccg ctacatcgct gtctgccacc ctgtcaaggc cctggacttc
cgcacgcctg 720
ccaaggccaa gctgatcaac atctgtatct gggtcctggc ctcaggcgtt
ggcgtgccca 780
tcatggtcat ggctgtgacc cgtccccggg acggggcagt ggtgtgcatg
ctccagttcc 840
ccagccccag ctggtactgg gacacggtga ccaagatctg cgtgttcctc
ttcgccttcg 900
tggtgcccat cctcatcatc accgtgtgct atggcctcat gctgctgcgc
ctgcgcagtg 960
tgcgcctgct gtcgggctcc aaggagaagg accgcagcct gcggcgcatc
acgcgcatgg 1020
tgctggtggt tgtgggcgcc ttcgtggtgt gttgggcgcc catccacatc
ttcgtcatcg 1080
tctggacgct ggtggacatc gaccggcgcg acccgctggt ggtggctgcg
ctgcacctgt 1140
gcatcgcgct gggctacgcc aatagcagcc tcaaccccgt gctctacgct
ttcctcgacg 1200

agaacttcaa gcgctgcttc cgccagctct gccgcaagcc ctgcggccgc
ccagacccca 1260
gcagcttcag ccgcgcccgc gaagccacgg cccgcgagcg tgtcaccgcc
tgcaccccgt 1320
ccgatggtcc cggcggtggc gctgccgcct gaccaggcca tccggcccca
agacgccgct 1380
ccctagttgt acccggaggc cacatgagtc ccagtgggag gcgcgagcca
tgatgtggag 1440
tggggccagt agataggtcg gagggctttg ggaccgccag atggggcctc
tgtttcggag 1500
acgggaccgg gccgctagat gggcatgggg tgggcctctg gtttggggcg
aggcagagga 1560
cagatcaatg gcgcagtgcc tctggtctgg gtgcccccgt ccacggctct
aggtggggcg 1620
ggaaagccag tgactccagg agaggagcgg gacctgtggc tctacaactg
agtccttaaa 1680
cagggcatct ccaggaaggc ggggcttcaa ccttgagaca gcttcggttt
ctaacttgga 1740
gccggacttt cggagttggg gggtccgggg ccc
1773

<210> 65
<211> 1154
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 65
atggactccc cgatccagat cttccgcggg gagccgggcc ctacctgcgc
cccgagcgcc 60
tgcctgcccc ccaacagcag cgcctggttt cccggctggg ccgagcccga
cagcaacggc 120
agcgccggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc
catcccggtc 180
atcatcacgg cggtctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tggtgggcaa
ctcgctggtc 240
atgttcgtga tcatccgata cacaaagatg aagacagcaa ccaacattta
catatttaac 300
ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac
ggtctacttg 360
atgaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat
tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta
cattgccgtg 480
tgccaccccg tgaaggcttt ggacttccgc acacccttga aggcaaagat
catcaatatc 540
tgcatctggc tgctgtcgtc atctgttggc atctctgcaa tagtccttgg
aggcaccaaa 600
gtcagggaag acgtcgatgt cattgagtgc tccttgcagt tcccagatga
tgactactcc 660
tggtgggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcatctttg ccttcgtgat
ccctgtcctc 720
atcatcatcg tctgctacac cctgatgatc ctgcgtctca agagcgtccg
gctcctttct 780
ggctcccgag agaaagatcg caacctgcgt aggatcacca gactggtcct
ggtggtggtg 840

gcagtcttcg tcgtctgctg gactcccatt cacatattca tcctggtgga
ggctctgggg 900
agcacctccc acagcacagc tgctctctcc agctattact tctgcatcgc
cttaggctat 960
accaacagta gcctgaatcc cattctctac gcctttcttg atgaaaactt
caagcggtgt 1020
ttccgggact tctgctttcc actgaagatg aggatggagc ggcagagcac
tagcagagtc 1080
cgaaatacag ttcaggatcc tgcttacctg agggacatcg atgggatgaa
taaaccagta 1140
tgactagtcg tgga
1154

<210> 66
<211> 1143
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 66
atggaatccc cgattcagat cttccgcggg gagccgggcc ctacctgcgc
cccgagcgcc 60
tgcctgcccc ccaacagcag cgcctggttt cccggctggg ccgagcccga
cagcaacggc 120
agcgccggct cggaggacgc gcagctggag cccgcgcaca tctccccggc
catcccggtc 180
atcatcacgg cggtctactc cgtagtgttc gtcgtgggct tggtgggcaa
ctcgctggtc 240
atgttcgtga tcatccgata cacaaagatg aagacagcaa ccaacattta
catatttaac 300
ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct ttcagagtac
ggtctacttg 360
atgaattcct ggccttttgg ggatgtgctg tgcaagatag taatttccat
tgattactac 420
aacatgttca ccagcatctt caccttgacc atgatgagcg tggaccgcta
cattgccgtg 480
tgccaccccg tgaaggcttt ggacttccgc acacccttga aggcaaagat
catcaatatc 540
tgcatctggc tgctgtcgtc atctgttggc atctctgcaa tagtccttgg
aggcaccaaa 600
gtcagggaag acgtcgatgt cattgagtgc tccttgcagt tcccagatga
tgactactcc 660
tggtgggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttcatctttg ccttcgtgat
ccctgtcctc 720
atcatcatcg tctgctacac cctgatgatc ctgcgtctca agagcgtccg
gctccttttct 780
ggctcccgag agaaagatcg caacctgcgt aggatcacca gactggtcct
ggtggtggtg 840
gcagtcttcg tcgtctgctg gactcccatt cacatattca tcctggtgga
ggctctgggg 900
agcacctccc acagcacagc tgctctctcc agctattact tctgcatcgc
cttaggctat 960
accaacagta gcctgaatcc cattctctac gcctttcttg atgaaaactt
caagcggtgt 1020
ttccgggact tctgctttcc actgaagatg aggatggagc ggcagagcac
tagcagagtc 1080

cgaaatacag ttcaggatcc tgcttacctg agggacatcg atgggatgaa
taaaccagta 1140
tga
1143

<210> 67
<211> 2738
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 67
cctgtaaaga aaatgatgag ggctaaatcc atcagcacca aagctgggaa
gccctccagg 60
ttcatttgga agaaaatact cctctgagct caaaggaagt gtgatctgtc
acaatattgt 120
atgcctgcac taagtttgca tcctgaaaac tcactggaag ataggaaagc
aagcatgaaa 180
aagcagccgg gtcagacagg cttctggatt cagtgtgtgg acatgacttt
gcctgcatga 240
attgcccctt tctcctacaa acaagagaat tcggtcaagt ggatgtggca
gaactgggct 300
gctctgagat gatagaaaag ggctcctgct tttcctgtaa ttgcagcccc
ttgttcttgt 360
ggttgctaca tgcaataaat gtaattctat gagaaggacc agcccttaca
tcccatcaaa 420
atgtttcctg gaaacctgga gcacagaact ctgatatcct ctcacactgt
ggcaggagaa 480
gcagcacaag gcacaatgct gaaatagcat ggtccaggat gtgtttgcac
agaagagtgc 540
ccagtgaaga gacctactcc ttggatcgct ttgcgcaaaa tccacccctt
ttccctcctc 600
cctcccttcc agcctccgaa tcccgcatgg cccacgctcc cctcctgcag
cggtgcgggg 660
cagccaggac tggtttctgt aagaaacagc aggagctgtg gcagcggcga
aaggaagcgg 720
ctgaggcgct tggaacccga aaagtctcgg tgctcctggc tacctcgcac
agcggtgccc 780
gcccggccgt cagtaccatg gacagcagcg ctgcccccac gaacgccagc
aattgcactg 840
atgccttggc gtactcaagt tgctccccag cacccagccc cggttcctgg
gtcaacttgt 900
cccacttaga tggcaacctg tccgacccat gcggtccgaa ccgcaccgac
ctgggcggga 960
gagacagcct gtgccctccg accggcagtc cctccatgat cacggccatc
acgatcatgg 1020
ccctctactc catcgtgtgc gtggtggggc tcttcggaaa cttcctggtc
atgtatgtga 1080
ttgtcagata caccaagatg aagactgcca ccaacatcta cattttcaac
cttgctctgg 1140
cagatgcctt agccaccagt accctgccct tccagagtgt gaattaccta
atgggaacat 1200
ggccatttgg aaccatcctt tgcaagatag tgatctccat agattactat
aacatgttca 1260
ccagcatatt caccctctgc accatgagtg ttgatcgata cattgcagtc
tgccaccctg 1320

tcaaggcctt agatttccgt actccccgaa atgccaaaat tatcaatgtc
tgcaactgga 1380
tcctctcttc agccattggt cttcctgtaa tgttcatggc tacaacaaaa
tacaggcaag 1440
gttccataga ttgtacacta acattctctc atccaacctg gtactgggaa
aacctgctga 1500
agatctgtgt tttcatcttc gccttcatta tgccagtgct catcattacc
gtgtgctatg 1560
gactgatgat cttgcgcctc aagagtgtcc gcatgctctc tggctccaaa
gaaaaggaca 1620
ggaatcttcg aaggatcacc aggatggtgc tggtggtggt ggctgtgttc
atcgtctgct 1680
ggactcccat tcacatttac gtcatcatta aagccttggt tacaatccca
gaaactacgt 1740
tccagactgt ttcttggcac ttctgcattg ctctaggtta cacaaacagc
tgcctcaacc 1800
cagtccttta tgcatttctg gatgaaaact tcaaacgatg cttcagagag
ttctgtatcc 1860
caacctcttc caacattgag caacaaaact ccactcgaat tcgtcagaac
actagagacc 1920
acccctccac ggccaataca gtggatagaa ctaatcatca gctagaaaat
ctggaagcag 1980
aaactgctcc gttgccctaa cagggtctca tgccattccg accttcacca
agcttagaag 2040
ccaccatgta tgtggaagca ggttgcttca agaatgtgta ggaggctcta
attctctagg 2100
aaagtgcctg cttttaggtc atccaacctc tttcctctct ggccactctg
ctctgcacat 2160
tagagggaca gccaaaagta agtggagcat ttggaaggaa aggaatatac
cacaccgagg 2220
agtccagttt gtgcaagaca cccagtggaa ccaaaaccca tcgtggtatg
tgaattgaag 2280
tcatcataaa aggtgaccct tctgtctgta agattttatt ttcaagcaaa
tatttatgac 2340
ctcaacaaag aagaaccatc ttttgttaag ttcaccgtag taacacataa
agtaaatgct 2400
acctctgatc aaagcacctt gaatggaagg tccgagtctt tttagtgttt
tgcaagggaa 2460
tgaatccatt attctatttt agacttttaa cttcacctta aaattagcat
ctggctaagg 2520
catcattttc acctccattt cttggttttg tattgtttaa aaaaataaca
tctctttcat 2580
ctagctccat aattgcaagg gaagagatta gcatgaaagg taatctgaaa
cacagtcatg 2640
tgtcagctgt agaaaggttg attctcatgc actgcaaata cttccaaaga
gtcatcatgg 2700
gggatttttc attcttaggc tttcagtggt ttgttcct
2738

<210> 68
<211> 2053
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 68

catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg
gaggtcaggc 60
gctgtctttc cttccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct
gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacccgtcac
tgacccccca 180
gcccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac
atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg
gaaagcaccc 300
gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact
ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctcgatcgtg tcgaagaagg catgaaccat
atcaaccaag 420
acatgaagga ggctgagaaa aatttaaaag atttagggaa atgctgtggc
cttttcatat 480
gtccttgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc
aataatcagg 540
acggagtggt ggccagccag cctgctcgtg tagtggacga acgggagcag
atggccatca 600
gtggcggctt catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aaatgaaatg
gatgaaaacc 660
tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat
atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat
tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaagtggt
taagtgtgcc 840
cacccgtgtt ctcctccaaa tgctgtcggg caagatagct ccttcatgct
tttctcatgg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtcc acccccattg
tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct
cttggtctct 1020
ttctttccaa aggttgtaca tagtggtcat ttggtggctc taactccttg
atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcggtggc atttgctgaa taacaacaat
ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg
tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtcc tttgagtgtc aggctctgaa tctctcaaaa
tgtgccgtct 1260
ttggttcctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcatg attagacaat
gtggaattac 1320
ataacaggca ttgcactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag
aactaaatag 1380
atttttagat tcctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg
atgagacaac 1440
acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat
gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact
tttttcctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tccttttta aaaaaaagaa
ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatatgtt
tggctgaaat 1680

tatgtcaaat ggatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac
gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtgtggatg taaattttat aaggctgact
cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtac aattctttgt tgcttaatct
agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa
aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaatatt
aaattcctcc 1980
tgtctcctct gtcagtttgt gaagtgattg acattttgta gctagtttaa
aattattaaa 2040
aattatagac tcc
2053

<210> 69
<211> 2053
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 69
catctttgat gagggcagag ctcacgttgc attgaagacg aaacctcggg
gaggtcaggc 60
gctgtctttc cttccctccc tgctcggcgg ctccaccaca gttgcaacct
gcagaggccc 120
ggagaacaca accctcccga gaagcccagg tccagagcca aacccgtcac
tgacccccca 180
gcccaggcgc ccagccactc cccaccgcta ccatggccga agacgcagac
atgcgcaatg 240
agctggagga gatgcagcga agggctgacc agttggctga tgagtcgctg
gaaagcaccc 300
gtcgtatgct gcaactggtt gaagagagta aagatgctgg tatcaggact
ttggttatgt 360
tggatgaaca aggagaacaa ctggaacgca ttgaggaagg gatggaccaa
atcaataagg 420
acatgaaaga agcagaaaag aatttgacgg acctaggaaa attctgcggg
ctttgtgtgt 480
gtccctgtaa caagcttaaa tcaagtgatg cttacaaaaa agcctggggc
aataatcagg 540
acggagtggt ggccagccag cctgctcgtg tagtggacga acgggagcag
atggccatca 600
gtggcggctt catccgcagg gtaacaaatg atgcccgaga aaatgaaatg
gatgaaaacc 660
tagagcaggt gagcggcatc atcgggaacc tccgtcacat ggccctggat
atgggcaatg 720
agatcgatac acagaatcgc cagatcgaca ggatcatgga gaaggctgat
tccaacaaaa 780
ccagaattga tgaggccaac caacgtgcaa caaagatgct gggaagtggt
taagtgtgcc 840
cacccgtgtt ctcctccaaa tgctgtcggg caagatagct ccttcatgct
tttctcatgg 900
tattatctag taggtctgca cacataacac acatcagtcc acccccattg
tgaatgttgt 960
cctgtgtcat ctgtcagctt cccaacaata ctttgtgtct tttgttctct
cttggtctct 1020

ttctttccaa aggttgtaca tagtggtcat ttggtggctc taactccttg
atgtcttgag 1080
tttcattttt cattttctct cctcggtggc atttgctgaa taacaacaat
ttaggaatgc 1140
tcaatgtgct gttgattctt tcaatccaca gtattgttct tgtaaaactg
tgacattcca 1200
cagagttact gccacggtcc tttgagtgtc aggctctgaa tctctcaaaa
tgtgccgtct 1260
ttggttcctc atggctgtta tctgtcttta tgatttcatg attagacaat
gtggaattac 1320
ataacaggca ttgcactaaa agtgatgtga tttatgcatt tatgcatgag
aactaaatag 1380
atttttagat tcctacttaa acaaaaactt tccatgacag tagcatactg
atgagacaac 1440
acacacacac acaaaacaac agcaacaaca acagaacaac aacaaagcat
gctcagtatt 1500
gagacactgt caagattaag ttataccagc aaaagtgcag tagtgtcact
tttttcctgt 1560
caatatatag agacttctaa atcataatca tccttttta aaaaaaagaa
ttttaaaaaa 1620
gatggatttg acacactcac catttaatca tttccagcaa aatatatgtt
tggctgaaat 1680
tatgtcaaat ggatgtaata tagggtttgt ttgctgcttt tgatggctac
gttttggaga 1740
gagcaatctt gctgtgaaac agtgtggatg taaattttat aaggctgact
cttactaacc 1800
accatttccc ctgtggtttg ttatcagtac aattctttgt tgcttaatct
agagctatgc 1860
acaccaaatt gctgagatgt ttagtagctg ataaagaaac cttttaaaaa
aataatataa 1920
atgaatgaaa tataaactgt gagataaata tcattatagc atgtaatatt
aaattcctcc 1980
tgtctcctct gtcagtttgt gaagtgattg acattttgta gctagtttaa
aattattaaa 2040
aattatagac tcc
2053

<210> 70
<211> 266
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70
Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
 1   5   10   15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
            20   25   30
Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu
        35   40   45
Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
    50   55   60
Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
65   70   75   80
Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
                85   90   95
Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr

```
            100                 105                 110
Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
        115                 120                 125
Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
    130                 135                 140
Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
145                 150                 155                 160
Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys
                165                 170                 175
Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
            180                 185                 190
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
        195                 200                 205
Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
    210                 215                 220
Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
225                 230                 235                 240
Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Gly Glu Ser Ala Ser Pro Arg
                245                 250                 255
Val Ala Ala Ala Tyr Gln Pro Ile Leu Ala
            260                 265
```

<210> 71
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 71
caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc
agtgaagata 60
tcctgcaagg cttctggcta catcttcact gaccatgctc ttcactgggt
gaggcagaag 120
cctgaacagg gcctggaatg gattgggtat atttttcccg gaaatggtaa
tattgagtac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag
tactgcctac 240
atgcagctca acagcctgac atctggagat tctgcaatgt atttctgtaa
aaagatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca
336

<210> 72
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 72
```
Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His
            20                  25                  30
Ala Leu His Trp Val Arg Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60
```

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

<210> 73
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 73
caggtgaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc
agtgaagatc 60
tcctgcaagg cttctggtta caccttcact gaccattcta ttcactgggt
gaagcagaag 120
cctggacagg gcctagaatg gattggatat ctttttcccg gaaatggtaa
ttttgaatat 180
aatgagaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag
cactgcctac 240
atgcacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa
aaagatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca
336

<210> 74
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 74

```
Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
            20                  25                  30
Ser Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95
Lys Lys Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 75
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 75

caggttcagc tgcagcagtc cgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc
agtgaagata 60
tcctgcaggg cttctggcta caccttcact gaccattcta ttcactgggt
gaagcagcag 120
cctggccagg gcctggaatg gatcggatat atttttcccg gaaatggaaa
tattgaatac 180
aatgacaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccgg
cactgcctac 240
atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa
aaggatgggg 300
tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctca
336

<210> 76
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 76
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
            20   25   30
Ser Ile His Trp Val Lys Gln Gln Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35   40   45
Gly Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Asp Lys Phe
    50   55   60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Gly Thr Ala Tyr
65   70   75   80
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85   90   95
Lys Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
            100   105   110

<210> 77
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 77
caggtcaagc tgcaggagtc tggcgctgag ttggtgaaac ctggggcttc
agtgaagatc 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gaccattcta ttcactgggt
gaagcagaag 120
cctggacagg gcctagaatg gattggatat ctttttcccg gaaatggtaa
ttttgagtac 180
aatgaaaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag
cactgtctac 240
atgtacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa
aaggatgggg 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca
336

<210> 78

<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 78
Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
            20   25   30
Ser Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35   40   45
Gly Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
    50   55   60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65   70   75   80
Met Tyr Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85   90   95
Lys Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
            100   105   110

<210> 79
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 79
caggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc
agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt
gaagcaaaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg
ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag
cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc
aagaatggac 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca
336

<210> 80
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 80
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20   25   30
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35   40   45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
    50   55   60
Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

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

<210> 81
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 81
caggtcaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc
agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt
gaagcaaaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg
ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag
cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc
aagaatgggg 300
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca
336

<210> 82
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 82
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 83
<211> 342
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 83

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga
tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta
tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc
caaccgattt 180
tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac
actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc
acatgttcct 300
cctacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ct
342

<210> 84
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 84
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1   5   10   15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
            20   25   30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35   40   45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50   55   60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65   70   75   80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
                85   90   95
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100   105   110
Arg

<210> 85
<211> 324
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 85
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga
aactgtcacc 60
atcacatgtc gaacaactga aaatatttac agttattttg tatggtctca
gcagagacag 120
ggaaaatctc ctcagctccg ggtctataat gcaaaatcct tagcagaagg
tgtgccatca 180
agtttcaatg tcagtgtatc aggcacacag ttttctctga agatcaatag
cctgcagcct 240
gaagattttg ggacttatca ctgtcaacac cattatggta ctccgtacac
gttcggaggg 300
gggaccaggc tggaaataag acgg
324

<210> 86
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 86
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
            20   25   30
Phe Val Trp Ser Gln Gln Arg Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Arg Val
        35   40   45
Tyr Asn Ala Lys Ser Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Ser Phe Asn Val
    50   55   60
Ser Val Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65   70   75   80
Glu Asp Phe Gly Thr Tyr His Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr
                85   90   95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Arg Arg
            100   105

<210> 87
<211> 339
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 87
gatgttttg atgacccaaac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca
accagcttcc 60
atctcttgc aagtccagtca gagcctctta tatactaatg gaaaaaccta
tttgacttgg 120
ttattccag aggccaggcca gtctccaaaa cgcctaatct atctggtgtc
tgaattggac 180
tctggagtc cctgacaggtt cagtggcagt ggttcaggga cagatttcac
actggaaatc 240
accagagtg gaggctgagga tttgggagtt tattactgct tgcagagtgc
acattttcca 300
ttcacgttc ggctcgggcac caagctggaa atcaaacgg
339

<210> 88
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 88
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1   5   10   15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
            20   25   30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35   40   45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50   55   60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile

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

<210> 89
<211> 339
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 89
gatgttgtga tgacccaaac tccactcact ctgtcggtga ccattggaca
accagcgttc 60
atctcttgca agtccagtca gagcctcttt aacactaatg gcaaaaccta
tttgacttgg 120
ttaattcaga ggccaggcca gtctccacag cgcctgatct atctggtgtc
caaattggac 180
tctggcgtcc cggacaggtt cagtggcagt ggctcaggga cagatttcac
actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgcc tgcagagtag
ccattttccg 300
tttacgttcg gctcgggcac caagctggaa atcaaacgg
339

<210> 90
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 90
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Ile Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95
Ser His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 91
<211> 327
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 91
gatgttgtgc taactcagtc tcctgccacc ctgtctgtga ctccaggaga
tagagtcagt 60
ctttcctgca gggccagcca aaatattggc aactacctac actggtatca
acagaaatca 120
catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg
gatcccctcc 180
aggttcagtg gcagtggatc agtcacagat ttcactctca atatcaacag
tgtggagact 240
gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtgacacct ggcctctcac
gttcggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa acgggct
327

<210> 92
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 92
Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Asn Tyr
            20   25   30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
        35   40   45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Thr
65   70   75   80
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Thr Trp Pro Leu
                85   90   95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
            100   105

<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 93
Thr Phe Thr Asp His Ser Ile His
 1   5

<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 94
Thr Phe Thr Asn Tyr Val Ile His
 1   5

<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 95
Ile Phe Thr Asp His Ala Leu His
1 5

<210> 96
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 96
Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Asp Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 97
Tyr Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 98
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 98
Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 99
Tyr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 100
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 100
Lys Arg Met Gly Tyr
1 5

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 101
Lys Lys Met Asp Tyr
1 5

<210> 102
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 102
Ala Arg Met Asp Tyr
1 5

<210> 103
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 103
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 104
Arg Thr Thr Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Phe Val
1 5 10

<210> 105
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 105
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 106
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 106
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 107
Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Asn Tyr Leu His
1 5 10

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 108
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 109
Asn Ala Lys Ser Leu Ala Glu
1 5

<210> 110
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 110
Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser
1 5

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 111
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 112
Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 113
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 114
Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 115
Leu Gln Ser Ala His Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 116

Leu Gln Ser Ser His Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 117
Gln Gln Ser Asp Thr Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 118
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 118
Asp His Ser Ile His
1 5

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 119
Asn Tyr Val Ile His
1 5

<210> 120
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 120
Asp His Ala Leu His
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 121
Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ile Glu
1 5

<210> 122
<211> 9

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 122
Leu Phe Pro Gly Asn Gly Asn Phe Glu
 1   5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 123
Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys
 1   5

<210> 124
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 124
His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1   5   10

<210> 125
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 125
Ser Asn Gly Asn Thr
 1   5

<210> 126
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 126
Glu Asn Ile Tyr Ser
 1   5

<210> 127
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 127
Thr Ser Gly Tyr Ser
 1   5

<210> 128
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 128
Gln Asp Ile Lys Ser
1 5

<210> 129
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 129
Gln Asn Ile Gly Asn
1 5

<210> 130
<211> 911
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Endopeptidasa redirigida

<400> 130
Ile Ser Glu Phe Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr
1 5 10 15
Lys Asp Pro Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn
20 25 30
Ala Gly Gln Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile
35 40 45
Trp Val Ile Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp
50 55 60
Leu Asn Pro Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp
65 70 75 80
Ser Thr Tyr Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly
85 90 95
Val Thr Lys Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met
100 105 110
Leu Leu Thr Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr
115 120 125
Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile
130 135 140
Gln Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile
145 150 155 160
Gly Pro Ser Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His
165 170 175
Glu Val Leu Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile
180 185 190
Arg Phe Ser Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val

```
        195                 200                 205
Asp Thr Asn Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala
    210                 215                 220
Val Thr Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly
225                 230                 235                 240
Ile Ala Ile Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr
                245                 250                 255
Tyr Glu Met Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe
            260                 265                 270
Gly Gly His Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe
        275                 280                 285
Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn
    290                 295                 300
Lys Ala Lys Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys
305                 310                 315                 320
Asn Val Phe Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys
                325                 330                 335
Phe Ser Val Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr
            340                 345                 350
Glu Ile Tyr Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn
        355                 360                 365
Arg Lys Thr Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile
    370                 375                 380
Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn
385                 390                 395                 400
Thr Asn Leu Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn
                405                 410                 415
Met Asn Phe Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr
            420                 425                 430
Lys Leu Leu Cys Val Asp Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu
        435                 440                 445
Ile Glu Gly Arg Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg
    450                 455                 460
Lys Arg Lys Asn Gln Ala Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
465                 470                 475                 480
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val
                485                 490                 495
Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn
            500                 505                 510
Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala
        515                 520                 525
Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr
    530                 535                 540
Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser
545                 550                 555                 560
Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe
                565                 570                 575
Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr
            580                 585                 590
Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr
        595                 600                 605
Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe
    610                 615                 620
Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala
625                 630                 635                 640
Met Phe Leu Gly Trp Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu
```

645 650 655
Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile
660 665 670
Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys
675 680 685
Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu
690 695 700
Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu
705 710 715 720
Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn
725 730 735
Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile
740 745 750
Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg
755 760 765
Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala
770 775 780
Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn
785 790 795 800
Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile
805 810 815
Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val
820 825 830
Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu
835 840 845
Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp
850 855 860
Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val
865 870 875 880
Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val
885 890 895
Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
900 905 910

<210> 131
<211> 904
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Endopeptidasa redirigida

<400> 131
Met Gly Ser Met Glu Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro
1 5 10 15
Val Asn Gly Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln
20 25 30
Met Gln Pro Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile
35 40 45
Pro Glu Arg Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro
50 55 60
Pro Pro Glu Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Leu Ser Thr Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys
85 90 95

```
Leu Phe Glu Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr
            100                 105                 110
Ser Ile Val Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr
        115                 120                 125
Glu Leu Lys Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp
    130                 135                 140
Gly Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser
145                 150                 155                 160
Ala Asp Ile Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu
                165                 170                 175
Asn Leu Thr Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser
            180                 185                 190
Pro Asp Phe Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn
        195                 200                 205
Pro Leu Leu Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu
    210                 215                 220
Ala His Glu Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile
225                 230                 235                 240
Asn Pro Asn Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met
                245                 250                 255
Ser Gly Leu Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His
            260                 265                 270
Asp Ala Lys Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr
        275                 280                 285
Tyr Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys
    290                 295                 300
Ser Ile Val Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe
305                 310                 315                 320
Lys Glu Lys Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val
                325                 330                 335
Asp Lys Leu Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr
            340                 345                 350
Thr Glu Asp Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr
        355                 360                 365
Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys
    370                 375                 380
Val Asn Tyr Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu
385                 390                 395                 400
Ala Ala Asn Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe
                405                 410                 415
Thr Lys Leu Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu
            420                 425                 430
Cys Val Asp Gly Gly Gly Gly Ser Ala Asp Asp Asp Asp Lys Gly Trp
        435                 440                 445
Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Val Ala Leu
    450                 455                 460
Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
465                 470                 475                 480
Ala Leu Val Leu Gln Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe
                485                 490                 495
Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu
            500                 505                 510
Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu
        515                 520                 525
Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro
    530                 535                 540
```

```
Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu
545                 550                 555                 560
Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu
                565                 570                 575
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu
            580                 585                 590
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu
        595                 600                 605
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys
    610                 615                 620
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu
625                 630                 635                 640
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr
                645                 650                 655
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala
            660                 665                 670
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu
        675                 680                 685
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala
    690                 695                 700
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys
705                 710                 715                 720
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu
                725                 730                 735
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys
            740                 745                 750
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu
        755                 760                 765
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn
    770                 775                 780
Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp
785                 790                 795                 800
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile
                805                 810                 815
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
            820                 825                 830
Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
        835                 840                 845
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
    850                 855                 860
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
865                 870                 875                 880
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
                885                 890                 895
Thr Leu Glu Ala Leu Ala Ser Gly
            900
```

<210> 132
<211> 360
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 132
caggtgaagc tgcaggagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc
agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt
gaagcaaaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg
ctctaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggcctcactg acttcagaca aatcctccag
cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc
aagacatctc 300
gctaatacct actactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac
agtctcctca 360

<210> 133
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 133
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20   25   30
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35   40   45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
    50   55   60
Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65   70   75   80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100   105   110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 134
Ala Arg Met Gly Tyr
 1   5

<210> 135
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 135
Ala Arg His Leu Ala Asn Thr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1   5   10

<210> 136

<211> 349
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136
Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Trp Pro
 1   5   10   15
Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
            20   25   30
Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
        35   40   45
Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
    50   55   60
Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
65   70   75   80
Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
                85   90   95
Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
            100   105   110
Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
        115   120   125
Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
    130   135   140
Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp
145   150   155   160
Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu
                165   170   175
Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro
            180   185   190
Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly
        195   200   205
Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu
    210   215   220
Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala
225   230   235   240
Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Val Phe
                245   250   255
Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe
            260   265   270
Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala
        275   280   285
His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala
    290   295   300
Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys
305   310   315   320
His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu Asn Lys Ser
                325   330   335
Arg Ile Asp Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val
            340   345

<210> 137
<211> 349
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 137
Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Trp Pro
 1   5   10   15
Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu
            20   25   30
Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
        35   40   45
Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
    50   55   60
Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
65   70   75   80
Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
                85   90   95
Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
            100   105   110
Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
        115   120   125
Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
    130   135   140
Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp
145   150   155   160
Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu
                165   170   175
Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro
            180   185   190
Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly
        195   200   205
Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu
    210   215   220
Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala
225   230   235   240
Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Val Phe
                245   250   255
Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe
            260   265   270
Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala
        275   280   285
His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala
    290   295   300
Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys
305   310   315   320
His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu Ser Lys Ser
                325   330   335
Arg Ile Asp Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val
            340   345

<210> 138
<211> 349
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138
Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser Cys Pro
 1   5   10   15
Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu

```
            20                  25                  30
Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val
        35                  40                  45
Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly
    50                  55                  60
Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala
65                  70                  75                  80
Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr
                85                  90                  95
Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
            100                 105                 110
Tyr Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala
        115                 120                 125
Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser
    130                 135                 140
Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys Ile Trp
145                 150                 155                 160
Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln Gly Leu
                165                 170                 175
Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln Trp Pro
            180                 185                 190
Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly
        195                 200                 205
Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu
    210                 215                 220
Asn His Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala
225                 230                 235                 240
Ser Lys Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Val Phe
                245                 250                 255
Gly Ile Ser Trp Leu Pro His His Ile Ile His Leu Trp Ala Glu Phe
            260                 265                 270
Gly Val Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Leu Phe Arg Ile Thr Ala
        275                 280                 285
His Cys Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala
    290                 295                 300
Phe Leu Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys
305                 310                 315                 320
His Ile Arg Lys Asp Ser His Leu Ser Asp Thr Lys Glu Asn Lys Ser
                325                 330                 335
Arg Ile Asp Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val
            340                 345
```

<210> 139
<211> 387
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 139

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

```
    50                  55                  60
Leu Asn Leu Gly Val Ala Asp Leu Cys Phe Ile Leu Cys Cys Val Pro
65                  70                  75                  80
Phe Gln Ala Thr Ile Tyr Thr Leu Asp Gly Trp Val Phe Gly Ser Leu
                85                  90                  95
Leu Cys Lys Ala Val His Phe Leu Ile Phe Leu Thr Met His Ala Ser
            100                 105                 110
Ser Phe Thr Leu Ala Ala Val Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Arg
        115                 120                 125
Tyr Pro Leu His Ser Arg Glu Leu Arg Thr Pro Arg Asn Ala Leu Ala
    130                 135                 140
Ala Ile Gly Leu Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Phe Ser Gly Pro Tyr
145                 150                 155                 160
Leu Ser Tyr Tyr Arg Gln Ser Gln Leu Ala Asn Leu Thr Val Cys His
                165                 170                 175
Pro Ala Trp Ser Ala Pro Arg Arg Arg Ala Met Asp Ile Cys Thr Phe
            180                 185                 190
Val Phe Ser Tyr Leu Leu Pro Val Leu Val Leu Gly Leu Thr Tyr Ala
        195                 200                 205
Arg Thr Leu Arg Tyr Leu Trp Arg Ala Val Asp Pro Val Ala Ala Gly
    210                 215                 220
Ser Gly Ala Arg Arg Ala Lys Arg Lys Val Thr Arg Met Ile Leu Ile
225                 230                 235                 240
Val Ala Ala Leu Phe Cys Leu Cys Trp Met Pro His His Ala Leu Ile
                245                 250                 255
Leu Cys Val Trp Phe Gly Gln Phe Pro Leu Thr Arg Ala Thr Tyr Ala
            260                 265                 270
Leu Arg Ile Leu Ser His Leu Val Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Val Asn
        275                 280                 285
Pro Ile Val Tyr Ala Leu Val Ser Lys His Phe Arg Lys Gly Phe Arg
    290                 295                 300
Thr Ile Cys Ala Gly Leu Leu Gly Arg Ala Pro Gly Arg Ala Ser Gly
305                 310                 315                 320
Arg Val Cys Ala Ala Ala Arg Gly Thr His Ser Gly Ser Val Leu Glu
                325                 330                 335
Arg Glu Ser Ser Asp Leu Leu His Met Ser Glu Ala Ala Gly Ala Leu
            340                 345                 350
Arg Pro Cys Pro Gly Ala Ser Gln Pro Cys Ile Leu Glu Pro Cys Pro
        355                 360                 365
Gly Pro Ser Trp Gln Gly Pro Lys Ala Gly Asp Ser Ile Leu Thr Val
    370                 375                 380
Asp Val Ala
385
```

<210> 140
<211> 368
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 140

```
Met Ala Asp Ala Gln Asn Ile Ser Leu Asp Ser Pro Gly Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Ala Val Ala Val Pro Val Val Phe Ala Leu Ile Phe Leu Leu Gly Thr
            20                  25                  30
Val Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala Val Leu Leu Gln Pro Gly Pro Ser
```

```
        35                  40                  45
Ala Trp Gln Glu Pro Gly Ser Thr Thr Asp Leu Phe Ile Leu Asn Leu
    50                  55                  60
Ala Val Ala Asp Leu Cys Phe Ile Leu Cys Cys Val Pro Phe Gln Ala
65                  70                  75                  80
Thr Ile Tyr Thr Leu Asp Ala Trp Leu Phe Gly Ala Leu Val Cys Lys
                85                  90                  95
Ala Val His Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Met Tyr Ala Ser Ser Phe Thr
            100                 105                 110
Leu Ala Ala Val Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Arg His Pro Leu
        115                 120                 125
Arg Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Arg Asn Ala Arg Ala Ala Val Gly
    130                 135                 140
Leu Val Trp Leu Leu Ala Ala Leu Phe Ser Ala Pro Tyr Leu Ser Tyr
145                 150                 155                 160
Tyr Gly Thr Val Arg Tyr Gly Ala Leu Glu Leu Cys Val Pro Ala Trp
                165                 170                 175
Glu Asp Ala Arg Arg Arg Ala Leu Asp Val Ala Thr Phe Ala Ala Gly
            180                 185                 190
Tyr Leu Leu Pro Val Ala Val Val Ser Leu Ala Tyr Gly Arg Thr Leu
        195                 200                 205
Arg Phe Leu Trp Ala Ala Val Gly Pro Ala Gly Ala Ala Ala Ala Glu
    210                 215                 220
Ala Arg Arg Arg Ala Thr Gly Arg Ala Gly Arg Ala Met Leu Ala Val
225                 230                 235                 240
Ala Ala Leu Tyr Ala Leu Cys Trp Gly Pro His His Ala Leu Ile Leu
                245                 250                 255
Cys Phe Trp Tyr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Pro Ala Thr Tyr Ala Cys
            260                 265                 270
Arg Leu Ala Ser His Cys Leu Ala Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro
        275                 280                 285
Leu Val Tyr Ala Leu Ala Ser Arg His Phe Arg Ala Arg Phe Arg Arg
    290                 295                 300
Leu Trp Pro Cys Gly Arg Arg Arg Arg His Arg Ala Arg Arg Ala Leu
305                 310                 315                 320
Arg Arg Val Arg Pro Ala Ser Ser Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Asp
                325                 330                 335
Ala Arg Pro Ser Gly Arg Leu Leu Ala Gly Gly Gly Gln Gly Pro Glu
            340                 345                 350
Pro Arg Glu Gly Pro Val His Gly Gly Glu Ala Ala Arg Gly Pro Glu
        355                 360                 365
```

<210> 141
<211> 1050
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 141
atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga
gccccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct
ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt
gctggcgcgc 180

agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct
gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc
gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt
gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat
cgtgcactcg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg
ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctcgcccgtg gcctaccacc agggcctctt
ccacccgcgc 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctcgccacaa
gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg
cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa
gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tggtgtttgg
aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgct
gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaca gcaattcctc
cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt
gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaaagtcg
aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga
1050

<210> 142
<211> 1050
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 142
atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctggccgga
gccccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct
ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg tgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt
gctggcgcgc 180
agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct
gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc
gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt
gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat
cgtgcactcg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg
ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctcgcccgtg gcctaccacc agggcctctt
ccacccgcgc 540

gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctcgccacaa
gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg
cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa
gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tggtgtttgg
aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgct
gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaca gcaattcctc
cgtgaatcct 900
atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt
gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa gtaaaagtcg
aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga
1050

<210> 143
<211> 1050
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 143
atggagctgg cggtcgggaa cctcagcgag ggcaacgcga gctgtccgga
gccccccgcc 60
ccggagcccg ggccgctgtt cggcatcggc gtggagaact tcgtcacgct
ggtggtgttc 120
ggcctgatct tcgcgctggg cgtgctgggc aacagcctag tgatcaccgt
gctggcgcgc 180
agcaagccgg gcaagccgcg gagcaccacc aacctgttca tcctcaacct
gagcatcgcc 240
gacctggcct acctgctctt ctgcatcccc ttccaggcca ccgtgtacgc
gctgcccacc 300
tgggtgctgg gcgccttcat ctgcaagttc atccactact tcttcaccgt
gtccatgctg 360
gtgagcatct tcaccctggc cgcgatgtcc gtggaccgct acgtggccat
cgtgcactcg 420
cggcgctcct cctccctcag ggtgtcccgc aacgcgctgc tgggcgtggg
ctgcatctgg 480
gcgctgtcca ttgccatggc ctcgcccgtg gcctaccacc agggcctctt
ccacccgcgc 540
gccagcaacc agaccttctg ctgggagcag tggcccgacc ctcgccacaa
gaaggcctac 600
gtggtgtgca ccttcgtctt cggctacctg ctgccgctcc tgctcatctg
cttctgctat 660
gccaaggtcc ttaatcactt gcataaaaag ttgaagaaca tgtcaaagaa
gtctgaagca 720
tccaagaaaa agactgcaca gacagttctg gtggtggttg tggtgtttgg
aatctcctgg 780
ctgccgcacc acatcatcca tctctgggct gagtttggag ttttcccgct
gacgccggct 840
tccttcctct tcagaatcac cgcccactgc ctggcgtaca gcaattcctc
cgtgaatcct 900

atcatttatg catttctctc tgaaaatttc aggaaggcct ataaacaagt
gttcaagtgt 960
cacattcgca aagattcaca cctgagtgat actaaagaaa ataaaagtcg
aatagacacc 1020
ccaccatcaa ccaattgtac tcatgtgtga
1050

<210> 144
<211> 1164
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 144
atgaacgtct cgggctgccc aggggccggg aacgcgagcc aggcgggcgg
cgggggaggc 60
tggcaccccg aggcggtcat cgtgcccctg ctcttcgcgc tcatcttcct
cgtgggcacc 120
gtgggcaaca cgctggtgct ggcggtgctg ctgcgcggcg gccaggcggt
cagcactacc 180
aacctgttca tccttaacct gggcgtggcc gacctgtgtt tcatcctgtg
ctgcgtgccc 240
ttccaggcca ccatctacac cctggacggc tgggtgttcg gctcgctgct
gtgcaaggcg 300
gtgcacttcc tcatcttcct caccatgcac gccagcagct tcacgctggc
cgccgtctcc 360
ctggacaggt atctggccat ccgctacccg ctgcactccc gcgagctgcg
cacgcctcga 420
aacgcgctgg cagccatcgg gctcatctgg gggctgtcgc tgctcttctc
cgggccctac 480
ctgagctact accgccagtc gcagctggcc aacctgaccg tgtgccatcc
cgcgtggagc 540
gcccctcgcc gccgcgccat ggacatctgc accttcgtct tcagctacct
gcttcctgtg 600
ctggttctcg gcctgaccta cgcgcgcacc ttgcgctacc tctggcgcgc
cgtcgacccg 660
gtggccgcgg gctcgggtgc ccggcgcgcc aagcgcaagg tgacacgcat
gatcctcatc 720
gtggccgcgc tcttctgcct ctgctggatg ccccaccacg cgctcatcct
ctgcgtgtgg 780
ttcggccagt tcccgctcac gcgcgccact tatgcgcttc gcatcctctc
gcacctggtc 840
tcctacgcca actcctgcgt caaccccatc gtttacgcgc tggtctccaa
gcacttccgc 900
aaaggcttcc gcacgatctg cgcgggcctg ctgggccgtg ccccaggccg
agcctcgggc 960
cgtgtgtgcg ctgccgcgcg gggcacccac agtggcagcg tgttggagcg
cgagtccagc 1020
gacctgttgc acatgagcga ggcggcgggg gcccttcgtc cctgccccgg
cgcttcccag 1080
ccatgcatcc tcgagccctg tcctggcccg tcctggcagg gcccaaaggc
aggcgacagc 1140
atcctgacgg ttgatgtggc ctga
1164

<210> 145
<211> 1107
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 145
atggctgatg cccagaacat ttcactggac agcccaggga gtgtgggggc
cgtggcagtg 60
cctgtggtct ttgccctaat cttcctgctg ggcacagtgg gcaatgggct
ggtgctggca 120
gtgctcctgc agcctggccc gagtgcctgg caggagcctg gcagcaccac
ggacctgttc 180
atcctcaacc tggcggtggc tgacctctgc ttcatcctgt gctgcgtgcc
cttccaggcc 240
accatctaca cgctggatgc ctggctcttt ggggccctcg tctgcaaggc
cgtgcacctg 300
ctcatctacc tcaccatgta cgccagcagc tttacgctgg ctgctgtctc
cgtggacagg 360
tacctggccg tgcggcaccc gctgcgctcg cgcgccctgc gcacgccgcg
taacgcccgc 420
gccgcagtgg ggctggtgtg gctgctggcg gcgctcttct cggcgcccta
cctcagctac 480
tacggcaccg tgcgctacgg cgcgctggag ctctgcgtgc ccgcctggga
ggacgcgcgc 540
cgccgcgccc tggacgtggc caccttcgct gccggctacc tgctgcccgt
ggctgtggtg 600
agcctggcct acgggcgcac gctgcgcttc ctgtgggccg ccgtgggtcc
cgcgggcgcg 660
gcggcggccg aggcgcggcg gagggcgacg ggccgcgcgg ggcgcgccat
gctggcggtg 720
gccgcgctct acgcgctctg ctggggtccg caccacgcgc tcatcctgtg
cttctggtac 780
ggccgcttcg ccttcagccc ggccacctac gcctgccgcc tggcctcaca
ctgcctggcc 840
tacgccaact cctgcctcaa cccgctcgtc tacgcgctcg cctcgcgcca
cttccgcgcg 900
cgcttccgcc gcctgtggcc gtgcggccgc cgacgccgcc accgtgcccg
ccgcgccttg 960
cgtcgcgtcc gccccgcgtc ctcgggccca cccggctgcc ccggagacgc
ccggcctagc 1020
gggaggctgc tggctggtgg cggccagggc ccggagccca gggagggacc
cgtccacggc 1080
ggagaggctg cccgaggacc ggaataa
1107

<210> 146
<211> 889
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Fragmento LHn/A

<221> VARIANTE
<222> (453)...(455)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 146

```
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 Gly Gly Gly Gly Glu Asn
        435                 440                 445
Leu Tyr Phe Gln Xaa Xaa Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Gly Tyr
    450                 455                 460
Asn Lys Ala Phe Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu
465                 470                 475                 480
Phe Phe Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly
                485                 490                 495
Glu Glu Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile
            500                 505                 510
Ser Leu Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn
        515                 520                 525
Glu Pro Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly
    530                 535                 540
Gln Leu Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys
545                 550                 555                 560
Tyr Glu Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu
                565                 570                 575
Phe Glu His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu
            580                 585                 590
Ala Leu Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr
        595                 600                 605
Val Lys Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp
    610                 615                 620
Val Glu Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser
625                 630                 635                 640
Thr Thr Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Ile Pro Tyr Ile Gly
                645                 650                 655
Pro Ala Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly
            660                 665                 670
Ala Leu Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu
        675                 680                 685
Ile Ala Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala
    690                 695                 700
Asn Lys Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg
705                 710                 715                 720
Asn Glu Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu
                725                 730                 735
Ala Lys Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu
            740                 745                 750
Ala Leu Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln
        755                 760                 765
Tyr Asn Gln Tyr Thr Glu Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile
    770                 775                 780
Asp Asp Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile
785                 790                 795                 800
Asn Ile Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn
                805                 810                 815
Ser Met Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser
            820                 825                 830
Leu Lys Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu
        835                 840                 845
Ile Gly Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser
    850                 855                 860
Thr Asp Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu
```

865 870 875 880
Leu Ser Thr His His His His His His
885

<210> 147
<211> 2661
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Fragmento LHn/A

<400> 147
atgccgttcg taaacaaaca gttcaactat aaagacccag tcaacggcgt
ggacattgcc 60
tatatcaaaa tcccgaatgc gggtcaaatg cagcccgtga aagcatttaa
aatccataac 120
aaaatttggg tgatcccgga gcgcgatacg ttcacgaacc cggaagaagg
agatttaaac 180
ccaccgcctg aggctaaaca ggtcccggtg tcttactatg atagcacata
cctgagtacc 240
gacaatgaaa aggacaacta cctgaaaggt gttaccaaac tgttcgagcg
catttattcg 300
acagatctcg gtcgcatgtt gctgacttct attgtgcgcg gcattccgtt
ttggggtggt 360
agcaccatcg atacagaact caaagtgatt gacaccaact gcatcaatgt
gattcagcct 420
gatgggagct accggtccga agagcttaac ctcgtaatca ttggcccgag
cgcggatatt 480
atccaattcg aatgtaaatc ttttgggcat gaagtcctga atctgacgcg
gaatggctat 540
ggatcgacgc agtatattcg tttttctcca gatttcacat ttggatttga
agaaagcctc 600
gaagttgata cgaaccctct tttaggcgcg ggaaaattcg cgacggaccc
agcggtgacc 660
ttggcacatg aacttattca tgccgggcat cgcttgtatg gaatcgccat
taacccgaac 720
cgtgttttca aggtgaatac gaacgcgtat tacgagatgt cgggcttaga
agtgtccttt 780
gaagaactgc gcacgtttgg cggtcatgat gcaaaattta ttgatagtct
gcaagaaaac 840
gaatttcggc tgtactatta caataaattc aaagacattg catcaacctt
aaacaaggcg 900
aaaagcattg tgggtaccac ggctagctta caatatatga aaaacgtttt
caaagaaaaa 960
tacctcctta gcgaagacac ttccggcaaa ttctctgtcg ataaactgaa
atttgataaa 1020
ctgtataaaa tgctcaccga gatctacaca gaggataact ttgtcaaatt
cttcaaggtc 1080
ttgaatcgga aaacctatct gaacttcgat aaagccgtct ttaagatcaa
catcgtaccg 1140
aaagttaact acaccatcta tgatggcttt aatctgcgca atacgaatct
ggcggcgaac 1200
tttaacggcc agaacaccga aatcaacaac atgaacttta ctaaactgaa
aaattttacc 1260

ggcttgtttg aattctataa gctcctgtgt gtccgcggta ttatcaccag
caaaaccaaa 1320
tccttgggcg gtggtggcga aaacctgtac ttccagggcg gtggcggtgg
tgataagggc 1380
tataacaagg ccttcaatga tttatgcatc aaggtgaaca actgggactt
gtttttctct 1440
ccatctgaag ataattttac taacgacttg aacaaaggag aggaaattac
ttccgatacc 1500
aacatcgaag cagcggaaga gaatattagt ctagatctta ttcaacaata
ttacctgacc 1560
tttaattttg ataacgagcc tgagaacatt tccattgaga atctcagctc
tgacatcatc 1620
ggccagctgg aactgatgcc gaatatcgaa cgctttccta atggaaagaa
atatgaattg 1680
gacaaataca ccatgttcca ctatctccgc gcgcaggagt ttgagcacgg
caagtctcgt 1740
attgctctga ccaattcggt aaacgaagcc cttttaaatc cttcgcgtgt
gtacaccttt 1800
ttctcaagcg attatgttaa aaaagtgaac aaggcgaccg aagcggcgat
gtttttggga 1860
tgggtggaac aactggtata tgactttacg gatgaaactt ctgaagtctc
gaccaccgac 1920
aaaattgccg atattaccat tatcattccc tatattggcc ctgcactgaa
cattggtaac 1980
atgctgtata aagatgattt tgtgggcgcc ctgatctttt caggcgctgt
tatcctgctg 2040
gaatttatcc cggaaatcgc cattccagta ctcggtacct ttgcgctggt
gtcctatatc 2100
gcaaacaaag ttttgactgt ccagacgatc gacaacgcgc tcagtaaacg
taacgaaaaa 2160
tgggatgagg tgtataagta tattgttacc aactggctcg ctaaagtaaa
cacccagatt 2220
gacctgattc gcaagaagat gaaagaagcg ctggaaaacc aagcagaagc
gaccaaagct 2280
attatcaact atcaatataa ccagtacaca gaggaagaaa agaataacat
caacttcaac 2340
atcgacgact tatcttcaaa gctgaatgaa tctattaaca aagcgatgat
taatattaac 2400
aagttcttga accaatgtag tgtcagctat ctgatgaact cgatgatccc
ttacggtgtg 2460
aaacgtctgg aagacttcga tgcaagcctt aaagatgccc ttctgaagta
tatttacgat 2520
aatcgcggaa ctcttattgg ccaagtggat cgcttaaaag ataaagtcaa
caacacgctg 2580
agtacagaca tccctttca gctgtctaaa tatgtggaca atcagcgcct
gctgtccacg 2640
caccatcacc atcaccacta a
2661

<210> 148
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo de oligonucleótidos ORL-1

<400> 148
cactcggctg gtgctggtgg
20

<210> 149
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso de oligonucleótidos ORL-1

<400> 149
aatggccacg gcagtctcgc
20

<210> 150
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo de oligonucleótidos del receptor de galanina 1
<400> 150
ccccatcatg tcatccacct
20

<210> 151
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso de oligonucleótidos del receptor de galanina 1

<400> 151
atggggttca ccgaggagtt
20

<210> 152
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo de oligonucleótidos del receptor de galanina 2

<400> 152
catcgtggcg gtgctttt
18

<210> 153
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso de oligonucleótidos del receptor de galanina 2

<400> 153
agcgggaagc gaccaaac
18

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0099033

Bogotá D.C., Octubre 07 de 2011 - 15:59:30

RECIBIDO DE : CASTILLO PINEDA & ASOCIADOS NI 800.253.423

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	425029640	07/10/2011	1.142.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	571.000.00	571.000.00
				$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-133183- -00000-0000
Fecha: 2011-10-07 16:16:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 722

Act. 411 PRESENTACION Folios 719

719

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-133183- -00000-0000

Fecha: 2011-10-07 16:16:41 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 722

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DI

Act. 411 PRESENTACION Folios: 719

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☑ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☑ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐