

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-100304

(P2013-100304A)

(43) 公開日 平成25年5月23日(2013.5.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02 1 O 3	

審査請求 有 請求項の数 11 O L 外国語出願 (全 218 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-279973 (P2012-279973)	(71) 出願人	591018268
(22) 出願日	平成24年12月21日 (2012.12.21)		アラーガン、インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2010-550881 (P2010-550881) の分割		A L L E R G A N , I N C O R P O R A T E D
原出願日	平成21年3月13日 (2009.3.13)		アメリカ合衆国92612カリフォルニア
(31) 優先権主張番号	61/036, 723		州アーヴィン、デュポン・ドライブ252
(32) 優先日	平成20年3月14日 (2008.3.14)		5番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100081422
			弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(74) 代理人	100127638
			弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫基盤ボツリヌス毒素血清A型活性アッセイ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ボツリヌス神経毒血清A型 (B o N T / A) を含んでなる医薬組成物の提供。

【解決手段】S N A P - 2 5 組成物、S N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A 切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合するα-S N A P - 2 5 抗体を作成する方法、S N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A 切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合するα-S N A P - 2 5 抗体、B o N T / A 活性を検出する方法、およびα-B o N T / A 中和抗体を検出する方法により該医薬におけるB o N T / A の量が多いことと相関する工程によって決定される、医薬組成物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

担体、少なくとも 3 個のアミノ酸を含んでなる可動性リンカーおよび配列番号：148 を含んでなる SNAP-25 抗原を含んでなる組成物。

【請求項 2】

可動性リンカーおよび SNAP-25 抗原アミノ酸配列が配列番号：38 である請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 3】

単離された α -SNAP-25 抗体が SNAP-25 切断生成物からの BONT/A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し

10

；
 α -SNAP-25 抗体が SNAP-25 切断生成物からの BONT/A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含まないエピトープに関して $1 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満の会合速度定数を有し；そして

α -SNAP-25 抗体がそのエピトープに関して 0.450 nM 未満の平衡解離定数を有する；

単離された α -SNAP-25 抗体。

【請求項 4】

エピトープが配列番号：32 である請求項 3 に記載の単離された α -SNAP-25 抗体。

20

【請求項 5】

a) 配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：80 または配列番号：82 を含んでなる重鎖可変領域；および

b) 配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90 または配列番号：92 を含んでなる軽鎖可変領域；
 を含んでなる単離された α -SNAP-25 抗体。

【請求項 6】

a) 配列番号：93、配列番号：121 または配列番号：100 を含んでなる重鎖可変領域；および

b) 配列番号：105、配列番号：110 または配列番号：115 を含んでなる軽鎖可変領域；
 を含んでなる単離された α -SNAP-25 抗体。

30

【請求項 7】

少なくとも配列番号：100 の V_H CDR3、配列番号：101 の V_H CDR3 または配列番号：102 の V_H CDR3 を含んでなる単離された α -SNAP-25 抗体。

【請求項 8】

a) 確立された細胞株からの細胞を BONT/A を含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は約 500 pM 以下の BONT/A による BONT/A 中毒に感受性が高い；

b) 処理された細胞から BONT/A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを有する SNAP-25 切断生成物を含んでなる SNAP-25 構成要素を単離すること；

40

c) SNAP-25 構成要素を固相支持体に連結された α -SNAP-25 抗体と接触させること、

ここで α -SNAP-25 抗体は SNAP-25 切断生成物からの BONT/A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し、 α -SNAP-25 抗体は SNAP-25 切断生成物からの BONT/A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含まない SNAP-25 からのエピトープに関して $1 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満の会合速度定数を有し；そして α -SNAP-25 抗体はエピトープに関して 0.450 nM 未満の平衡解離定数を有する；

50

d) α -SNAP-25 抗体および BONT/A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する SNAP-25 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること、
ここで抗体-抗原複合体による検出は BONT/A 活性の指標である；
の工程を含んでなる BONT/A 活性を検出する方法。

【請求項 9】

SNAP-25 切断生成物が SNAP-25₁₉₇ である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

抗体-抗原複合体の存在がサンドイッチ ELISA を使用して検出される請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 11】

方法が下の漸近線で少なくとも 3 : 1 のシグナル対ノイズ比および上の漸近線で少なくとも 10 : 1 のシグナル対ノイズ比を有する請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

試料が多くても 100 pM の BONT/A を含んでなる請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

確立された細胞株からの細胞が約 100 pM 以下の BONT/A による BONT/A 中毒に感受性が高い請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

方法がシングルプレックス様式またはマルチプレックス様式で実施される請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 15】

a) α -BONT/A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料に BONT/A を添加すること；

b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は BONT/A 中毒に感受性が高い；

c) 処理された細胞から BONT/A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する SNAP-25 切断生成物を含んでなる SNAP-25 構成要素を単離すること；

d) SNAP-25 構成要素を固相支持体に連結された α -SNAP-25 抗体に接触させること、ここで α -SNAP-25 抗体は；

ここで α -SNAP-25 抗体は SNAP-25 切断生成物からの BONT/A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し、 α -SNAP-25 抗体は SNAP-25 切断生成物からの BONT/A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含まない SNAP-25 からのエピトープに関して $1 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満の会合速度定数を有し；そして α -SNAP-25 抗体はそのエピトープに関して 0.450 nM 未満の平衡解離定数を有する；

30

e) α -SNAP-25 抗体および BONT/A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する SNAP-25 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；

40

f) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b-e を繰り返すこと、陰性対照試料は BONT/A、および α -BONT/A 中和抗体を含有しないことが解っている血清を含んでなる；ならびに

g) 工程 e で検出された抗体-抗原複合体の量を工程 f で検出された抗体-抗原複合体の量と比較すること、

ここで工程 f で検出された抗体-抗原複合体の量に相対して工程 e で検出された抗体-抗原複合体のより少ない検出量は α -BONT/A 中和抗体の存在の指標である；

の工程を含んでなる哺乳動物における BONT/A 免疫抵抗性を決定する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本特許出願は35 U.S.C. § 119 (e) に準じて2008年3月14日出願の米国仮特許出願第61/036723号に対する優先権を主張し、それをその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする。

【背景技術】

【0002】

例えばボツリヌス神経毒 (B o N T)、B o N T / A、B o N T / B、B o N T / C 1、B o N T / D、B o N T / E、B o N T / F および B o N T / G ならびに破傷風神経毒 (T e N T) のようなクロストリジウム毒素がニューロン伝達を阻止する能力は多様な治療的および美容的適用において活用されており、例えばWilliam J. Lipham, *Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin* (Slack, Inc., 2004) を参照されたい。10
医薬組成物として市販により入手可能なクロストリジウム毒素には、例えばBOTOX (登録商標) (Allergan, Inc., Irvine, CA)、DYSPORT (登録商標) / RELOXIN (登録商標)、(Ipsen Ltd., Slough, England)、PURTOX (登録商標) (Mentor Corp., Santa Barbara, CA)、XEOMIN (登録商標) (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Germany)、N EURONOX (登録商標) (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, South Korea)、B T X - A (Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China) のようなB o N T / A 調製物；および例えばMYOBLOC (登録商標) / NEUROBLOC (登録商標) (Solstice Neuroscienc 20
es, Inc., South San Francisco, CA) のようなB o N T / B 調製物が含まれる。実例としてはBOTOX (登録商標) は現在米国において痙攣性斜頸に関連する頭部位置異常および頸部疼痛の重篤度を低下させるための成人の痙攣性斜頸の処置；局所薬で十分に管理がされない重篤な原発性腋窩多汗症の処置；ならびに12歳以上の患者における良性本態性眼瞼痙攣または第V I I 神経傷害を含むジストニアに関連する斜視および眼瞼痙攣の処置に関して承認されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

現在のところ致死試験であるマウスLD₅₀ バイオアッセイは依然その調製物の効力を表現するために全ての製薬業者により使用される「ゴールドスタンダード」である。S. S. Arnon et al., *JAMA* 285:1059-1070 (2001)。実際に、医薬製剤のラベルの単位はマウスLD₅₀ 単位であり、そして統計的に有用なLD₅₀ データを生成するために必要な動物の数は多い。マウスLD₅₀ バイオアッセイの有利な点は、例えば軽鎖酵素活性のみを測定するインビトロアッセイのような単にこの中毒過程の一部のみに関する活性を決定する代わりに、ボツリヌス毒素取り込みに必要な工程を全て測定するという点である (例えば細胞表面受容体への毒素結合、毒素-受容体複合体の内部移行、細胞質への軽鎖転位置、基質の軽鎖切断)。不幸にもマウスLD₅₀ バイオアッセイは、多数の実験動物が必要とされるための高い操作コスト、全てのB o N T 血清型が同じ測定可能なエンドポイントを引き起こすであろうから、特異性の欠如、および大きな動物群を使用しない場合の不正確さの潜在を含む多くの欠点に悩まされる。加えて動物保護団体が動物試験を低減し、そしてさらに重要なことには製品リリースのためのマウスLD₅₀ バイオアッセイを替 40
えるように米国 (F D A / N I C E A T M / I C C V A M) および欧州 (M H R A および E D Q M) の監督官庁、ならびにボツリヌス神経毒生成物を製造する製薬会社に圧力をかけている。監督官庁は製薬会社に、ボツリヌス神経毒の効力試験に対する3つの「R」原理：低減する (Reduce)、洗練する (Refine)、置き換える (Replace)；を適用するように約束させている。「ボツリヌス毒素A型の効力試験に対する3つのRの適用における進歩」D. Straughan, *Altern. Lab. Anim.* 34 (3) :305-313 (2006)。近年では、プロトコルを標準化し、そしてアッセイあたりにより少ない動物を使用してさらに一貫したデータを生成するために、マウスLD₅₀ バイオアッセイを低減および洗練するいくつかの工程が既に採用されている。

【課題を解決するための手段】

【0004】

故に、かかる非動物基盤のアッセイにより動物試験の必要性が軽減され、そしてこの型の動物基盤のアッセイに随伴される全ての不利な点、経費および倫理的な問題が軽減されるので、ボツリヌス毒素取り込みに必要な全ての工程の完全性を評価することができる、簡単で、信頼性のある、検証された、そして行政機関が受け入れ可能なボツリヌス毒素活性アッセイは有意に価値のあるものであろう。本明細書は例えば医薬品および食品産業のような種々の産業に有用なボツリヌス毒素Aの活性を検定するための新規組成物、細胞および方法を提供し、そして同様に関係する有利な点を提供する。かかる組成物、細胞および方法は生存動物または生存動物から取られた組織を使用しないが、神経毒作用に必要な工程を全て評価することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1A】図1は中枢および抹消ニューロンにおける神経伝達物質放出およびクロストリジウム毒素中毒の現行のパラダイムの概略図を示す。図1Aは中枢および抹消ニューロンの神経伝達物質放出メカニズムに関する概略図を示す。放出過程を2つの工程を含んでなるように記載することができる：1) 小胞ドッキング、ここで神経伝達物質分子を含有する小胞結合SNAREタンパク質は細胞膜に位置する膜結合SNAREタンパク質と会合する；および2) 神経伝達物質放出、ここで小胞は細胞膜と融合し、そして神経伝達物質分子はエキソサイトシスによって排出される。

【図1B】図1Bは中枢および抹消ニューロンにおける破傷風およびボツリヌス毒素活性の中毒メカニズムの概略図を示す。この中毒過程を4つの工程を含んでなるように記載することができる：1) 受容体結合、ここでクロストリジウム毒素はクロストリジウム受容体複合体に結合し、そして中毒過程を開始する；2) 複合体内部移行、ここで毒素結合後、毒素／受容体系複合体を含有する小胞はエンドサイトシスにより細胞に取り込まれる；3) 軽鎖転位置、ここで小胞の内部pHの変化、クロストリジウム毒素重鎖のH_Nドメインを含んでなるチャネルポアの形成、クロストリジウム毒素重鎖からの軽鎖の分離、および軽鎖の放出を含む複数の事象が生じると考えられる；ならびに4) 酵素による標的修飾、ここでクロストリジウム毒素の軽鎖は例えばSNAP-25、VAMPまたはシンタキシンのようなその標的SNARE基質をタンパク質分解により切断し、それにより小胞ドッキングおよび神経伝達物質放出を防御する。

20

【図2】図2はウェスタンブロット分析による4つの細胞株におけるBoNT/A取り込みの比較を示す。図2Aは細胞株を処理するために使用されたBoNT/Aの量に基づいて検出されたSNAP-25切断生成物のグラフを示す。4パラメーターロジスティックモデルを用いてSigmaPlotでデータを分析し、そして各細胞株に関してEC₅₀値を得た。検出されたSNAP-25切断生成物シグナルのランキングは：SiMa>>Neuro-2a>LA1-55n>PC12であった。図2Bは300pM対0pMおよび1.2pM対0pMでの生シグナルのシグナル対ノイズ比がアッセイに関して計算されたことを示す。SiMa細胞は最高のシグナル対ノイズ比および最低のEC₅₀値を生じた。

30

【図3】図3は本明細書において開示されるBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法において有用な確立された細胞株のための細胞分化培地の最適化を示す。

40

【図4】図4は本明細書において開示されるBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法において有用な確立された細胞株を含んでなる細胞のための細胞分化時間の最適化を示す。

【図5】図5は本明細書において開示されるBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法において有用な確立された細胞株を含んでなる細胞のBoNT/A処理の最適化を示す。結果により、試験されたいずれかのBoNT/A処理で2pM未満のEC₅₀が達成されたことが示される。

【図6】図6は本明細書において開示されるBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法の感度を示す。結果により、細胞によるBoNT/Aの取り込みには、バックグラウンドを超えた有意量のSNAP-25切断生成物を生成する前に1分未満しかかからなかった

50

ことが示される。

【図 7】図 7 は本明細書において開示される B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法の特異性を示す。結果により、本明細書において開示される B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法は B o N T / A 中毒に関与する全ての工程を測定できることが示される。

【図 8】図 8 は本明細書において開示される B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法を用いて B o N T / A 複合体で処理された分化型 S i M a 細胞の用量応答曲線を示す。

【図 9】図 9 は本明細書において開示される B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法を用いて B o N T / A の医薬品を処方するための免疫基盤 B o N T / A 活性アッセイの結果を示す。

【図 10】図 10 は本明細書において開示される B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法を用いたヒト血清中の α -B o N T / A 中和抗体の検出を示す。

【発明を実施するための形態】

【0006】

[詳細な説明]

本明細書は試料中の活性な B o N T / A の存在または不在を決定するため、および B o N T / A 調製物の活性/効力を決定するための新規アッセイを提供する。本明細書にて開示される新規の細胞基盤のアッセイは、アッセイが試料中のピコモル濃度の B o N T / A を検出することを可能にする細胞、試薬および検出方法に頼る。本明細書に開示される細胞基盤のアッセイは動物毒性研究に関する必要性を低減し、しかも多機能 B o N T / A 、すなわち毒素の結合および細胞取り込み、細胞サイトゾルへの転位置、およびプロテアーゼ活性を分析するのに役立つ。さらに後記で論じるように、新規方法および組成物は粗製およびバルク試料ならびに高度に精製された二鎖毒素および処方された毒素生成物を分析するために使用することができ、そしてさらに自動ハイスループットアッセイ形式で扱いやすい。

【0007】

故に本明細書に開示される 1 つの態様は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる α -S N A P - 2 5 抗体を生成するための組成物を提供する。組成物はアジュバントおよび S N A P - 2 5 抗原、S N A P - 2 5 抗原に連結された担体または S N A P - 2 5 抗原に連結された可動性スパーサーに連結された担体を含む組成物を含んでなることができ、ここで可動性リンカーは S N A P - 2 5 抗原と担体の間に介在する。S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる α -S N A P - 2 5 抗体を生成する免疫応答を誘発する任意のおよび全ての S N A P - 2 5 抗原が、限定するものではないが、天然発生 S N A P - 2 5 から誘導される S N A P - 2 5 抗原、非天然発生 S N A P - 2 5 から誘導される S N A P - 2 5 抗原、および S N A P - 2 5 、天然発生 S N A P - 2 5 または非天然発生 S N A P - 2 5 からの S N A P - 2 5 の免疫反応生フラグメントを含んでなる S N A P - 2 5 抗原を含む S N A P - 2 5 抗原として有用であり得ることが想定される。S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる α -S N A P - 2 5 抗体を生成するために有用な S N A P - 2 5 抗原には限定するものではないが、限定するものではないが配列番号：38を含む担体ペプチドに連結されたカルボキシル化された C 末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 ペプチドを含んでなる S N A P - 2 5 抗原が含まれる。S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる α -S N A P - 2 5 抗体を作成するために有用なその他の組成物には限定するものではないが、カルボキシル化された C 末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 抗原に連結された可動性リンカーに連結された担体を含んでなる組成物が含まれ、ここで可動性リンカーは S N A P - 2 5 抗原と担体の間に介在する。限定するものではないが、ポリエチレングリコール (P E G)、モノメトキシポリエチレングリコール (m P E G)、ポリビニルアルコール

(PVA)、フロイント完全および不完全アジュバントを含む任意のおよび全てのアジュバントがかかる組成物において有用であり得ることが想定される。

【0008】

本明細書に開示される別の態様は、SNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができるα-SNAP-25抗体を生成する方法を提供する。この方法の態様は(a)本明細書において開示される組成物を動物に投与すること；(b)α-SNAP-25抗体またはα-SNAP-25抗体生成細胞を含有する試料を動物から収集すること；および(c)試料からα-SNAP-25抗体を単離すること；の工程を含んでなる。開示された方法はSNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合することができるα-SNAP-25モノクローナル抗体、またはSNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合することができるα-SNAP-25ポリクローナル抗体のいずれかを作成するために有用である。

10

【0009】

本明細書に開示されるさらに別の態様はSNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができるα-SNAP-25抗体を提供する。かかるα-SNAP-25抗体は天然発生および非天然発生抗体、ならびにモノクローナルα-SNAP-25抗体またはポリクローナルα-SNAP-25抗体の双方を含む。SNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合するα-SNAP-25抗体として有用なモノクローナルα-SNAP-25抗体には限定するものではないが、ハイブリドーマ細胞株1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5および3C3E2から生成されたモノクローナルα-SNAP-25抗体が含まれる。

20

【0010】

本明細書に開示されるなお別の態様はBONT/A活性を検出する方法を提供する。この方法の態様は(a)確立された細胞株からの細胞をBONT/Aを含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞はBONT/A中毒に感受性が高い；(b)処理された細胞からBONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25切断生成物を含んでなるSNAP-25構成要素を単離すること；(c)SNAP-25構成要素を、SNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができるα-SNAP-25抗体と接触させること；ならびに(d)α-SNAP-25抗体およびSNAP-25切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体-抗原複合体による検出はBONT/A活性の指標である；の工程を含んでなる。工程cのα-SNAP-25抗体は場合によっては固相支持体に連結され得る。

30

【0011】

本明細書に開示されるなお別の態様はBONT/A活性を検出する方法を提供する。この方法の態様は(a)確立された細胞株からの細胞をBONT/Aを含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞はBONT/Aを取り込むことができる；(b)処理された細胞からBONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25を含んでなるSNAP-25構成要素を単離すること；(c)SNAP-25構成要素を、SNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができるα-SNAP-25抗体と接触させること；ならびに(d)α-SNAP-25抗体およびSNAP-25切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体-抗原複合体による検出はBONT/A活性の指標である；の工程を含ん

40

50

でなる。工程 c の α -S N A P-25 抗体は場合によっては固相支持体に連結され得る。

【0012】

本明細書に開示されるさらなる態様は哺乳動物における B o N T / A 免疫抵抗性を決定する方法を提供する。この方法の態様は (a) α -B o N T / A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料に B o N T / A を添加すること; (b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T / A 中毒に感受性が高い; (c) 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-25 切断生成物を含んでなる S N A P-25 構成要素を単離すること; (d) S N A P-25 構成要素を、S N A P-25 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる α -S N A P-25 抗体と接触させること; (e) α -S N A P-25 抗体および S N A P-25 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること; (f) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程 a-e を繰り返すこと; ならびに (g) 工程 (e) で検出された抗体-抗原複合体の量を工程 (f) で検出された抗体-抗原複合体の量と比較すること、ここで工程 (f) で検出された抗体-抗原複合体の量に相対して工程 (e) で検出された抗体-抗原複合体のより少ない検出量は α -B o N T / A 中和抗体の存在の指標である; の工程を含んでなる。工程 d の α -S N A P-25 抗体は場合によっては固相支持体に連結されていてよい。工程 f における対照試料はまた陰性対照試料に加えて陽性対照試料を含むこともできる。

10

20

【0013】

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、クロストリジウム・バラティ (*Clostridium baratii*) およびクロストリジウム・ブチリクム (*Clostridium butyricum*) により生成されるクロストリジウム毒素はヒトおよびその他の哺乳動物の治療的および美容的処置において最も広く用いられているものである。ボツリヌス菌の株は7つの抗原的に区別されるボツリヌス毒素の血清型 (B o N T) を生成し、それはヒト (B o N T / A、B o N T / B、B o N T / E および B o N T / F)、動物 (B o N T / C1 および B o N T / D) または土壌から単離されたもの (B o N T / G) におけるボツリヌス症激増を調査することにより同定されている。7つ全てのボツリヌス毒素血清型は類似の構造および生物学的特性を有するが、各々はまた例えば異なる薬理学的特性のような異種性の特徴をも表示する。対照的に、破傷風毒素 (T e N T) は破傷風菌の均一の群により生成される。クロストリジウムの2つのその他の種、クロストリジウム・バラティおよびクロストリジウム・ブチリクムもまた各々 B o N T / F および B o N T / E に類似する毒素を生成する。

30

【0014】

クロストリジウム毒素は各々およそ 150 kD の一本鎖ポリペプチドとして翻訳され、それは引き続いて例えば内因性クロストリジウム毒素プロテアーゼまたは環境において生成される天然発生プロテアーゼのような天然発生プロテアーゼによりジスルフィドループ内でタンパク質分解切断により切断される。この翻訳後プロセッシングにより、単一のジスルフィド結合および非共有結合性相互作用により一緒に維持されるおよそ 50 kDa の軽鎖 (L C) およびおよそ 100 kDa の重鎖 (H C) を含んでなる二鎖分子を生じる。各成熟二鎖分子は3つの機能的に区別されるドメイン: 1) 神経伝達物質放出装置のコア構成要素を特異的にターゲティングする亜鉛依存性エンドペプチダーゼ活性を含有するメタロプロテアーゼ領域を含む L C に位置する酵素ドメイン; 2) 細胞内小胞から標的細胞の細胞質への L C の放出を促進する H C (H_N) のアミノ末端側の半分内に含有される転位置ドメイン; および 3) 標的細胞の表面に位置する受容体複合体に対する毒素の結合活性および結合特異性を決定する H C (H_C) のカルボキシル末端側の半分内に見出される結合ドメイン; を含んでなる。

40

【0015】

3つの機能的ドメインの結合、転位置および酵素活性は全て毒性のために必要である。

50

この過程の全ての詳細は依然正確には解っていないが、クロストリジウム毒素がニューロンに侵入し、そして神経伝達物質放出を阻止する全体的な細胞中毒メカニズムは血清型またはサブタイプに関わらず類似する。出願人は以下の記載により限定されることを決して望まないが、中毒メカニズムを少なくとも4つの工程を含んでなるように記載することができる：1) 受容体結合；2) 複合体内部移行；3) 軽鎖転位置；および4) 酵素による標的修飾（図1）。クロストリジウム毒素のHCドメインが、標的細胞の細胞膜表面に位置する毒素特異的受容体系に結合したときにその過程は開始される。受容体複合体の結合特異性は、明確にクロストリジウム毒素受容体複合体を含んでなると思われるガングリオシドおよびタンパク質受容体の具体的な組み合わせにより一部では達成され则认为られる。一度結合すると、毒素／受容体複合体はエンドサイトーシスにより内部移行し、そして内部移行した小胞は特異的な細胞内経路に分類される。転位置工程は小胞区画の酸性化により誘発され则认为られる。この工程は疎水性を増大し、ポア形成を促進し、そして毒素の重および軽鎖の分離を促進する重要なpH依存性構造再構成を開始するようである。一度分離されると、毒素の軽鎖エンドペプチダーゼは細胞内小胞からサイトゾルへ放出され、そこでそれは神経伝達物質放出装置のコア構成要素を特異的にターゲティングすると思われる。これらのコアタンパク質、小胞随伴膜タンパク質（VAMP）／シナプトブレビン、25 kDaのシナプトソーム随伴タンパク質（SNAP-25）およびシンタキシンはシナプス小胞ドッキングおよび神経末端での融合に必要であり、そして可溶性N-エチルマレイミド感受性因子付着タンパク質受容体（SNARE）ファミリーのメンバーを構成する。BoNT/AおよびBoNT/Eはカルボキシル末端領域でSNAP-25を切断して、各々9個または26個のアミノ酸フラグメントを放出し、そしてBoNT/C1はまたカルボキシル末端近くでSNAP-25を切断して8個のアミノ酸フラグメントを放出する。ボツリヌス血清型BoNT/B、BoNT/D、BoNT/FおよびBoNT/G、ならびに破傷風毒素はVAMPの保存された中心部分で作用し、そしてVAMPのアミノ末端部分をサイトゾルに放出する。BoNT/C1は細胞質膜表面近くの単一の部位でシンタキシンを切断する。シナプス性SNAREの選択的タンパク質分解はクロストリジウム毒素によりインビボで引き起こされる神経伝達物質放出の遮断を説明する。クロストリジウム毒素のSNAREタンパク質標的は種々の非ニューロン型のエキソサイトーシスに共通する；これらの細胞では、ニューロンと同様に軽鎖ペプチダーゼ活性はエキソサイトーシスを阻止し、例えば「どのようにボツリヌスおよび破傷風神経毒が神経伝達物質放出を遮断するか」Yann Humeau et al., *Biochimie*. 82 (5) : 427-446 (2000) ; 「ボツリヌスおよび破傷風神経毒：構造、機能および治療的利用性」Kathryn Turton et al., *Trends Biochem. Sci.* 27 (11) : 552-558 (2002) ; 「ニューロンにおける破傷風およびボツリヌス神経毒の行程」Giovanna Lalli et al. *Trends Microbiol.* 11 (9) : 431-437 (2003) を参照されたい。

【0016】

本開示の態様は一部ではSNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができるα-SNAP-25抗体を生成するための組成物を含んでなる。本開示のその他の態様は一部ではSNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができるα-SNAP-25抗体を生成するための免疫応答誘起組成物を含んでなる。本明細書で使用される際には「免疫応答誘起組成物」なる用語はSNAP-25抗原を含んでなる組成物を指し、それは動物に投与された場合、SNAP-25抗原に対する免疫応答を刺激し、それによりSNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができるα-SNAP-25抗体を生成する。「免疫応答」なる用語は動物の免疫系による免疫応答誘起組成物に対する任意の応答を指す。免疫応答の実例には、限定するものではないが、例えばCD8+CTLの抗原特異的誘起を含むCTL応答、T細胞増殖応答およびサイトカイン放出を含むヘルパーT細胞応答、ならびに例えば抗体生成応答を含むB細胞応答のような、細胞ならび

に局所性および全身性液性免疫が含まれる。「免疫応答を誘起する」なる用語は免疫応答誘起組成物または免疫応答誘起組成物をコードするポリヌクレオチドの投与をさし、ここで免疫応答は影響を受ける、すなわち刺激、開始または誘起される。

【0017】

組成物はSNA P-25抗原を含んでなる。本明細書で使用される際には「抗原」なる用語は免疫応答を引き出す分子を指し、そして限定するものではないが、ペプチド、多糖類および例えばリポタンパク質および糖脂質のような脂質の抱合体を含む。本明細書で使用される際には「SNA P-25抗原」なる用語は免疫応答を引き出すことができるBONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有する任意の抗原を指す。免疫応答誘起組成物において使用されるSNA P-25抗原は配列が実質的に独特であるために十分に大きくなければならず、故にSNA P-25以外の抗原に対して交差反応性である抗体を生成する可能性を低減する。加えて免疫応答誘起組成物において使用されるSNA P-25抗原は実質的にBONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNA P-25に対してのみ免疫応答を誘発するために十分に小型でなければならず、故にBONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNA P-25をBONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を欠如するSNA P-25と区別することができるα-SNA P-25抗体を生成する可能性が増大する。さらに再現性よく選択的である良好な収率で、そしてそれは高度に感受性のアッセイの設計を可能にするために許容されるアビディティーで結合する単一のアミノ酸配列のα-SNA P-25抗体を作成することも非常に望ましい。

【0018】

SNA P-25に存在するBONT/A切断部位を取り囲む配列はP₅-P₄-P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅'として示され、P₁-P₁'は切断可能結合を表す。BONT/Aによる切断時に、生成された得られた切断生成物はP₅-P₄-P₃-P₂-P₁配列を含むフラグメントおよびP₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅'を含むフラグメントを含んでなる。故に本明細書で使用される際には「BONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNA P-25」なる用語はそのカルボキシル末端アミノ酸としてP₁残基を有する任意のSNA P-25を指す。例えばヒトSNA P-25（配列番号：5）のQ₁₉₇-R₁₉₈はBONT/A切断部位に関するP₁-P₁'切断可能結合を表す。そのように「BONT/A切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを有するSNA P-25」はそのカルボキシル末端アミノ酸でグルタミンを有する任意のSNA P-25切断生成物であり、ここでグルタミンは切断可能結合のQ₁₉₇を表す。別の事例として、トルペド・マルモラータ（Torpedo marmorata）SNA P-25のK₂₀₄-H₂₀₅（配列番号：16）はBONT/A切断部位に関するP₁-P₁'切断可能結合を表す。そのように「BONT/A切断部位切断可能結合のカルボキシル末端リジンに有するSNA P-25」はそのカルボキシル末端アミノ酸でリジンに有する任意のSNA P-25切断生成物であり、ここでリジンは切断可能結合のK₂₀₄を表す。

【0019】

BONT/A切断部位からのBONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNA P-25抗原を修飾して、SNA P-25抗原、ハプテンまたは、修飾を随伴しない場合に免疫原性、非免疫原性もしくは弱い免疫原性である任意のその他の抗原性化合物の免疫原性を増強することができる。この実施態様の態様では、SNA P-25抗原の切断可能結合からのカルボキシル末端P₁残基をカルボキシル化することができる。カルボキシル化により2つの点でSNA P-25抗原の望ましい免疫原特性が増大する。第1に荷電したアミノ酸は免疫原性を増強するので、カルボキシル末端残基へのCOO⁻基の付加はSNA P-25抗原の全体的な免疫原性を増大するであろう。第2に、BONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基は切断時に荷電した状態であるので、カルボキシル末端残基へのCOO⁻基の付加は、本明細書に開示されるα-SNA P-25抗体が結合するように設計された実際の抗原をより良好に擬似するであろう。

【0020】

この実施態様の態様では、SNA P-25 抗原を例えばキーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、卵白アルブミン (OVA)、サイログロブリン (THY)、ウシ血清アルブミン (BSA)、ダイズトリプシン阻害剤 (STI) または多重付着ペプチド (multiple attachment peptide) (MAP) のような担体タンパク質に付着させるのに適合したアミノ酸の付加により、SNA P-25 抗原からのアミノ末端残基を修飾することができる。例えば担体タンパク質 KLH を抱合するためにシステイン残基をアミノ末端で置き換えることができる。

【0021】

故に実施態様では、BONT/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する SNA P-25 抗原は例えば少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 25 または少なくとも 30 アミノ酸長でよい。別の実施態様では、BONT/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する SNA P-25 抗原は例えば多くても 5、多くても 6、多くても 7、多くても 8、多くても 9、多くても 10、多くても 11、多くても 12、多くても 13、多くても 14、多くても 15、多くても 16、多くても 17、多くても 18、多くても 19、多くても 20、多くても 25 または多くても 30 アミノ酸長でよい。さらに別の実施態様では、BONT/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する SNA P-25 抗原は例えば 7-12 アミノ酸の間、10-15 アミノ酸の間または 13-18 アミノ酸の間でよい。

【0022】

別の実施態様では、BONT/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する SNA P-25 抗原は配列番号：32 を含んでなる。この実施態様の態様では、BONT/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する SNA P-25 抗原は配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：147 または配列番号：148 を含んでなる。さらなる実施態様では、BONT/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する SNA P-25 抗原は配列番号：38 を含んでなる。

【0023】

なお別の実施態様では、BONT/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する SNA P-25 抗原は配列番号：39 を含んでなる。この実施態様の態様では、BONT/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する SNA P-25 抗原は配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43 または配列番号：44 を含んでなる。さらなる実施態様では、BONT/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する SNA P-25 抗原は配列番号：45 を含んでなる。

【0024】

SNA P-25 切断生成物からの BONT/A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -SNA P-25 抗体を生成する免疫応答を誘発する任意のおよび全ての SNA P-25 抗原が SNA P-25 抗原として有用であり得ると想定される。故に配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：147 または配列番号：148 を含んでなるアミノ酸配列バリエーションは、SNA P-25 切断生成物からの BONT/A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -SNA P-25 抗体を生成する免疫応答を誘発するための SNA P-25 抗原として有用であり得る。故に実施態様では、SNA P-25 抗原は配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、

配列番号：37、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：147または配列番号：148を含んでなるSNAP-25抗原に対する少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4または少なくとも5個のアミノ酸置換、欠失または付加を置換することができる。さらに別の実施態様では、SNAP-25抗原は配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、配列番号：147または配列番号：148を含んでなるSNAP-25抗原に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有し得る。

10

【0025】

担体を随伴しない場合に免疫原性、非免疫原性または弱い免疫原性であるSNAP-25抗原の免疫原性を増強するために、1つまたはそれより多い担体をSNAP-25抗原に連結できるということは想定される。非限定例には例えばキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、卵白アルブミン(OVA)、サイログロブリン(THY)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ダイズトリプシン阻害剤(STI)または多重付着ペプチド(MAP)が含まれる。当分野において周知であるように、抗原を担体に結合することにより非抗原性または弱い抗原性の抗原を抗原性にすることができる。種々のその他の担体および抗原を担体に結合する方法は当分野において周知である。例えばHarlow and Lane, *supra*, 1998a; Harlow and Lane, *supra*, 1998b; およびDavid W. Waggoner, Jr.ら、「免疫原性増強担体およびその組成物ならびに同一物を使用する方法」米国特許出願公開第2004/0057958号(2004年3月25日)参照。エピトープを融合タンパク質として発現することによりエピトープを作成することもできる。ポリペプチド融合体を発現するための方法は、例えばAusubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999)に記載されるように当業者に周知である。SNAP-25抗原のカルボキシル末端はBONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でなければならないので、担体はSNAP-25抗原のアミノ端に連結されていなければならない。

20

【0026】

可動性リンカーを随伴しない場合に免疫原性、非免疫原性または弱い免疫原性であるSNAP-25抗原の免疫原性を増強するために、1つまたはそれより多い可動性スペーサーをSNAP-25抗原に連結できるということは想定される。可動性スペーサーはSNAP-25抗原の全体的なペプチド長を増大し、そして可動性を提供し、それによりSNAP-25抗原の免疫細胞への適切な提示を促進する。非限定例としては、組成物はSNAP-25抗原を免疫細胞により良好に提示するために1つまたはそれより多い可動性スペーサーに直列に連結されたSNAP-25抗原を含んでなることができ、それにより免疫応答を促進する。

30

【0027】

ペプチドを含んでなる可動性スペーサーは少なくとも1アミノ酸長であり、そして例えばグリシン、アラニン、バリン、ロイシンまたはセリンのような短い側鎖R基を伴う非荷電アミノ酸を含んでなる。故に実施態様では、可動性スペーサーは例えば少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9または少なくとも10アミノ酸長でよい。別の実施態様では、可動性スペーサーは例えば少なくとも1、多くても2、多くても3、多くても4、多くても5、多くても6、多くても7、多くても8、多くても9または多くても10アミノ酸長でよい。さらに別の実施態様では、可動性スペーサーは例えば1-3アミノ酸の間、2-4アミノ酸の間、3-5アミノ酸の間、4-6アミノ酸の間または5-7アミノ酸の間でよい。可動性スペーサーの非限定例には、例えばGGG、GGGG(配列番号：55)およびGGGGS(配列番号：56)のようなGスペーサーまたはAAA、AAAA(配列番号：57)およびAAAAV(配列番号：58)のようなAスペーサーが含まれ

40

50

る。可動性スペーサーは融合タンパク質として S N A P - 2 5 抗原にフレーム内で連結される。

【0028】

前記で論じたように、可動性スペーサーを一部では S N A P - 2 5 抗原の全体的なペプチド長を増大するために使用する。例えば 5 - 1 0 アミノ酸 S N A P - 2 5 抗原は、3 - 5 アミノ酸可動性スペーサーを S N A P - 2 5 抗原のアミノ端に連結することにより増大したその全体的な長さを有し得る。別の事例としては、5 - 1 0 アミノ酸 S N A P - 2 5 抗原は 4 - 6 アミノ酸可動性スペーサーを S N A P - 2 5 抗原のアミノ端に連結することにより増大したその全体的な長さを有し得る。別の事例としては、5 - 1 0 アミノ酸 S N A P - 2 5 抗原は 7 - 1 0 アミノ酸可動性スペーサーを S N A P - 2 5 抗原のアミノ端に連結することにより増大したその全体的な長さを有し得る。別の事例としては、7 - 1 2 アミノ酸 S N A P - 2 5 抗原は 1 - 3 アミノ酸可動性スペーサーを S N A P - 2 5 抗原のアミノ端に連結することにより増大したその全体的な長さを有し得る。別の事例としては、7 - 1 2 アミノ酸 S N A P - 2 5 抗原は 4 - 6 アミノ酸可動性スペーサーを S N A P - 2 5 抗原のアミノ端に連結することにより増大したその全体的な長さを有し得る。可動性スペーサーにより提供された増大した長さにより、小型サイズの S N A P - 2 5 抗原の選択が可能になり、それにより S N A P - 2 5 抗原が実質的に B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 に対してのみ免疫応答を誘発する見込みが増大し、故に B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 を B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を欠如する S N A P - 2 5 と区別することができる α - S N A P - 2 5 抗体を生成する可能性が増大する。

【0029】

本明細書に開示される組成物は場合によっては本明細書に開示される S N A P - 2 5 抗原および 1 つまたはそれより多いアジュバントを含んでなることができるということは想定される。本明細書で使用される際には「アジュバント」なる用語は、S N A P - 2 5 組成物を参照して使用される場合、S N A P - 2 5 抗原に対する免疫応答を増大または多様化する任意の物質または物質の混合物を指す。アジュバントは例えば免疫化の数または保護免疫に必要な抗原の量を低減するために役立つ。免疫応答誘起組成物におけるアジュバントの使用は周知である。これらのアジュバントの主な目的は免疫応答の増大を可能にすることである。非限定的なアジュバントには、例えばリボソーム、限定するものではないが、例えばフロイント完全アジュバント (F C A) ; フロイント不完全アジュバント (F I A) のようなフロイント型のアジュバントを含む油相; 例えばサポニン類のようなサポゲニン配糖体; カルボポール; N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン (ムラミルジペプチドまたは「M D P」として一般的に公知); およびリポ多糖類 (L P S) が含まれる。かかるアジュバントは一般には水相を伴うエマルジョンの形態で使用されるか、またはさらに一般的には水不溶性無機塩からなっておりよい。これらの無機塩は例えば水酸化アルミニウム、硫酸亜鉛、水酸化鉄コロイド、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムからなっておりよい。水酸化アルミニウム (A l (O H)₃) は一般的に使用されるアジュバントである。現在では、ヒトにおいて使用するための唯一の F D A 承認アジュバントはアルミニウム塩 (アラム) であり、それは抗原の沈澱により抗原を「貯留する」ために使用される。前記で提供されたアジュバントは単に事例である。実際にはアジュバントが免疫応答を誘起するために欠くことができない特徴を満足する限り、任意のアジュバントを本明細書に開示される S N A P - 2 5 組成物において使用できる。

【0030】

本明細書に開示される担体はまたアジュバントとしても作用し得る。特異的アジュバントならびに作成および使用の方法が例えば Gupta et al. Vaccine, 11: 993-306 (1993); Arnon, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1: 83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., (1987); および「免疫原性増強担体およびその組成物ならびに同一物を使用する方法」David W. Waggoner, Jr.ら、米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 0 5 7 9 5 8 号 (2 0 0

10

20

30

40

50

4年3月25日)に記載される。さらなるアジュバントにはChapter 7 (pp 141-227)

「Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach」(eds. Powell, M. F. and Newman, M. J.) Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Plenum Press (New York)に記載される任意の化合物が含まれる。この概論からの実例には、ムラミルジペプチド(MDP)およびMontanide 720が含まれる。ポリイノシン：シトシン(ポリI：C)のような分子またはCpGモチーフを含有するプラスミドDNAをアジュバントとしてマイクロ粒子に被包された抗原と組み合わせて投与することもできる。別の実例では、アジュバントはリステリオリシン、ストレプトリシンまたはその混合物のような、抗原性化合物の細胞の細胞質への侵入を促進する薬剤である。

【0031】

10

故に実施態様では、SNAP-25組成物は担体ペプチドに連結されたカルボキシル化されたカルボキシル末端グルタミンを有するSNAP-25抗原を含んでなる。この実施態様の態様では、カルボキシル化されたカルボキシル末端グルタミンを有するSNAP-25抗原は配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：147または配列番号：148を含んでなる。この実施態様の別の態様では、SNAP-25抗原は配列番号：38を含んでなる。この実施態様の態様では、担体ペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、卵白アルブミン(OVA)、サイログロブリン(THY)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ダイズトリプシン阻害剤(STI)または多重付着ペプチド(MAP)である。

【0032】

20

別の実施態様では、SNAP-25組成物は担体ペプチドに連結されたカルボキシル化されたカルボキシル末端リジンを有するSNAP-25抗原を含んでなる。この実施態様の態様では、カルボキシル化されたカルボキシル末端リジンを有するSNAP-25抗原は配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43または配列番号：44を含んでなる。この実施態様の別の態様では、SNAP-25抗原は配列番号：45を含んでなる。この実施態様の態様では担体ペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、卵白アルブミン(OVA)、サイログロブリン(THY)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ダイズトリプシン阻害剤(STI)または多重付着ペプチド(MAP)である。

【0033】

30

なお別の実施態様では、SNAP-25組成物は1つまたはそれより多い可動性リンカーおよび担体ペプチドに連結されたカルボキシル化されたC末端グルタミンを有するSNAP-25抗原を含んでなり、ここで可動性リンカーはSNAP-25抗原と担体ペプチドの間に介在する。この実施態様の態様では、カルボキシル化されたカルボキシル末端グルタミンを有するSNAP-25抗原は配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：147または配列番号：148を含んでなる。別の実施態様では、SNAP-25抗原は配列番号：46を含んでなる。この実施態様の態様では担体ペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、卵白アルブミン(OVA)、サイログロブリン(THY)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ダイズトリプシン阻害剤(STI)または多重付着ペプチド(MAP)である。この実施態様の態様では、可動性リンカーはGスパーサーまたはAスパーサーである。

40

【0034】

さらに別の実施態様では、SNAP-25組成物は可動性リンカーおよび担体ペプチドに連結されたカルボキシル化されたC末端リジンを有するSNAP-25抗原を含んでなり、ここで可動性リンカーはSNAP-25抗原と担体ペプチドの間に介在する。この実施態様の態様では、カルボキシル化されたカルボキシル末端リジンを有するSNAP-25抗原は配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43または配列番号：44を含んでなる。この実施態様の別の態様ではSNAP-25抗原は配列番号：47を含んでなる。この実施態様の態様では担体ペプチドはキーホール

50

リンペットヘモシアニン (K L H)、卵白アルブミン (O V A)、サイログロブリン (T H Y)、ウシ血清アルブミン (B S A)、ダイズトリプシン阻害剤 (S T I) または多重付着ペプチド (M A P) である。この実施態様の態様では可動性リンカーは G スペーサーまたは A スペーサーである。

【0035】

本開示の態様は一部では S N A P-25 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α-S N A P-25 抗体を生成するための方法を含んでなる。S N A P-25 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α-S N A P-25 抗体を当分野において周知である多様な方法により生成することができる。抗体を作成および使用し、ならびに検出し、そして抗体結合特異性、結合アフィニティーおよび結合アビディティーを測定するための具体的なプロトコールは当分野において公知である。例えば ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998a) ; および U S I N G A N T I B O D I E S : A L A B O R A T O R Y M A N U A L : P O R A B L E P R O T O C O L N o . I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b) ; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001 ; および Current Protocols in Molecular Biology, 2004 ; 「治療用ポリペプチド、同一物をコードする核酸および使用の方法」David Andersonら、米国特許第 7 0 3 4 1 3 2 号 (2 0 0 5 年 4 月 2 5 日) ; および「C T L A 4 に対する抗体」Beatriz M. Carrenoら、米国特許第 7 0 3 4 1 2 1 号 (2 0 0 6 年 4 月 2 5 日) 参照。

【0036】

非限定例としては、例えばウサギ、ヤギ、マウスまたは別の哺乳動物のような動物に本明細書において開示される組成物の 1 回またはそれより多い注射で注射することにより、S N A P-25 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α-S N A P-25 ポリクローナル抗体を生成することができる。別の非限定例としては、本明細書において開示される組成物の 1 回またはそれより多い注射で例えば鶏卵のような卵を注射することにより、S N A P-25 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α-S N A P-25 ポリクローナル抗体を生成することができる。固定された抗原を使用する酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) または細胞基盤の活性アッセイを用いるような標準的な技術により免疫された動物における抗体価を経時的にモニタリングすることができる。所望により S N A P-25 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α-S N A P-25 抗体に関するポリクローナル抗体を哺乳動物 (例えば血液から) 単離し、そして I g G 分画を得るためにプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーのような周知の技術により、または抗体を生成するために使用されるペプチドに対するアフィニティー精製によりさらに精製することができる。

【0037】

別の非限定例としては、ハイブリドーマ法を用いて S N A P-25 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α-S N A P-25 モノクローナル抗体を生成することができる。例えば Chapter 6 Monoclonal Antibodies, pp. 196-244, Harlow & Lane, supra, 1998a ; および Chapter 7 Growing Hybridomas, pp. 245-282, Harlow & Lane, supra, 1998a ; および Goding, pp. 59-103, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) 参照。この方法では、例えばマウス、ハムスターまたは別の適切な宿主動物のような宿主動物は、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-25 に特異的に結合するであろう α-S N A P-25 抗体を生成するかまたは生成することが可能であるリンパ球を引き出すために、典型的には本明細書に開示される S N A P-25 抗原の 1 回またはそれより多い注射を経験する。固定された抗原または細胞基盤の活性アッセイを使用する酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) を

用いるような標準的な技術により、免疫された動物における抗体力価を経時的にモニタリングすることができる。これに代えて、適当な細胞培養系を用いてリンパ球をインビトロで免疫することができる。免疫後の適切な時間に、例えば抗体力価が最高であるときに、抗体生成細胞を動物から単離する。一般には、ヒト起源の細胞が望ましい場合は抹消血リンパ球を、または非ヒト哺乳動物原が望ましい場合は脾臓細胞もしくはリンパ節細胞を使用する。ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を使用して単離された抗体生成細胞を不死細胞株と融合してハイブリドーマ細胞を形成する。不死化細胞株は通常形質転換された哺乳動物細胞、とりわけげっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髓腫細胞である。典型的にはネズミ骨髓腫細胞株を適切に免疫されたマウスから採取された脾細胞と融合してハイブリドーマを生成する。好ましい不死細胞株はヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン（HAT）を含有する培養培地に鋭敏であるマウス骨髓腫細胞株である。多くの骨髓腫細胞株、例えばP3-N3/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653またはSp2/O-Ag14骨髓腫系のいずれかを標準的な技術により融合パートナーとして使用することができる。次いで未融合のまたは非生産的に融合された骨髓腫細胞を死滅させる（未融合脾細胞は形質転換されていないので、数日後に死亡する）HAT培地を使用して融合の結果であるハイブリドーマ細胞を選択する。次いでハイブリドーマ細胞が成長する培養培地をSNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合するα-SNAP-25モノクローナル抗体の存在に関して検定することができる。例えば免疫沈降アッセイ、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）のようなインビボ結合アッセイにおいて、または細胞基盤の活性アッセイにおいてα-SNAP-25陽性培地を使用してハイブリドーマ上澄を、スクリーニングすることができる。かかる技術およびアッセイは当分野において公知である。例えば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参照。次いでさらなる研究を行って、抗体はまたBoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を欠如するSNAP-25に対して非反応性であるかどうかを決定することができる。α-SNAP-25モノクローナル抗体の結合アフィニティーを例えばScatchard分析により決定することもできる。例えば「リガンド：リガンド結合系の特徴付けのための多目的コンピューター研究法」Peter J. Munson and David Rodbard, Anal. Biochem. 107 (1) : 220-239 (1980) 参照。望ましいハイブリドーマ細胞を同定した後、限界希釈手順を用いて望ましいモノクローナル抗体を発現するクローンの細胞株が得られるまで、単一細胞に由来するクローンを単離する。BoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25に関して十分に選択的であり、そして十分に高いアビディティーで結合するこれらの抗体を選び、さらに特徴付けおよび研究する。

【0038】

SNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合するα-SNAP-25モノクローナル抗体を調製するための別の代替は、例えば抗体ファージディスプレイライブラリーのような組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーをSNAP-25ペプチドでスクリーニングすることにより、そしてBoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25に結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離する。ファージディスプレイライブラリーを作成およびスクリーニングするためのキットは例えば組換えファージ抗体系（Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ）；およびSurfZAP（商標）ファージディスプレイキット（Stratagene, La Jolla, CA）のように市販により入手可能である。加えて、抗体ディスプレイライブラリーの作成およびスクリーニングに有用な方法および試薬の実例を例えばLadnerら、米国特許第5223409号；Borrebaeckら、米国特許第5712089号；Griffithsら、米国特許第5885793号；Griffithsら、米国特許第5962255号；McCaffertyら、米国特許第5969

10

20

30

40

50

108号; Griffithsら、米国特許第6010884号; Jespersら、米国特許第6017732号; Borrebaeckら、米国特許第6027930号; Johnsonら、米国特許第6140471号; McCaffertyら、米国特許第6172197号(その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする)において見出すことができる。

【0039】

本開示の態様は一部では α -SNAP-25抗体または α -SNAP-25抗体生成細胞を含有する試料を収集することを含んでなる。本明細書で使用される際には「 α -SNAP-25抗体または α -SNAP-25抗体生成細胞を含有する試料」なる用語はSNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する少なくとも1つの α -SNAP-25抗体を含有するか、または潜在的に含有する任意の生物学的物質を指す。SNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -SNAP-25抗体を含有できる、限定するものではないが、血液、血漿、血清およびリンパ液を含む任意のおよび全ての試料を、この方法において使用することができるということは想定される。SNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -SNAP-25抗体を生成することが可能な、限定するものではないが、CD8細胞、CTL細胞、ヘルパーT細胞およびB細胞を含む任意の細胞を、この方法において使用することができるということも想定される。種々の周知の方法を用いて α -SNAP-25抗体または α -SNAP-25抗体生成細胞を含有する試料を個体から収集することができ、例えばHarlow & Lane, supra, 1998a; およびHarlow & Lane, supra, 1998bを参照されたい。類似して、種々の周知の方法を用いて、SNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -SNAP-25抗体を単離するために試料を加工することができる。単離されるべき抗体の型に基づいて試料を収集するための手順を選択することができる。非限定例としては、SNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -SNAP-25ポリクローナル抗体を単離する場合、適切な試料はかかる α -SNAP-25抗体を含有する血液試料でよいが、SNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -SNAP-25モノクローナル抗体を単離する場合、適切な試料は脾臓細胞またはハイブリドーマのような α -SNAP-25抗体生成細胞でよい。

【0040】

本開示の態様は一部ではSNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -SNAP-25抗体を試料から単離することを含んでなる。例えばSNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -SNAP-25ポリクローナル抗体またはSNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -SNAP-25モノクローナル抗体のようなかかる α -SNAP-25抗体を単離する方法は当業者に周知である。例えばHarlow and Lane, supra, 1998a; およびHarlow and Lane, supra, 1998b参照。例えばかかる α -SNAP-25ポリクローナル抗体を例えば一次的には免疫血清のIgG分画を提供する、プロテインAまたはプロテインGを使用するアフィニティークロマトグラフィーのような周知の技術により試料から単離することができる。引き続いて、またはこれに代えて、特異的なSNAP-25抗原をカラムまたは磁性ビーズに固定してSNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -SNAP-25ポリクローナル抗体を免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。SNAP-25切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合

する α -S N A P-25モノクローナル抗体を培養培地または腹水から、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティークロマトグラフィーのような従来の免疫グロブリン精製手順により単離することができる。

【0041】

故に実施態様では、S N A P-25切断生成物からのB o N T/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -S N A P-25抗体を生成する方法は工程(a)担体ペプチドに連結されたカルボキシル化されたC末端グルタミンを有するS N A P-25抗原を含んでなる組成物を動物に投与すること；

(b) α -S N A P-25抗体または α -S N A P-25抗体生成細胞を含有する試料を動物から収集すること；および(c)試料から α -S N A P-25抗体構成要素を単離すること；を含んでなる。この実施態様の態様では、S N A P-25切断生成物からのB o N T/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -S N A P-25抗体はポリクローナル抗体である。この実施態様の別の態様では、S N A P-25切断生成物からのB o N T/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -S N A P-25抗体はモノクローナル抗体である。この実施態様のさらなる態様では、生成されるS N A P-25切断生成物からのB o N T/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -S N A P-25モノクローナル抗体はI g Gサブタイプである。この実施態様のその他の態様では、S N A P-25組成物はさらに例えばポリエチレングリコール(P E G)、モノメトキシポリエチレングリコール(m P E G)またはポリビニルアルコール(P V A)のようなアジュバントを含んでなる。

【0042】

別の実施態様では、S N A P-25切断生成物からのB o N T/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -S N A P-25抗体を生成する方法は工程(a)可動性リンカーおよび担体ペプチドに連結されたカルボキシル化されたC末端グルタミンを有するS N A P-25ペプチドを含んでなる組成物を動物に投与すること、ここで可動性リンカーはS N A P-25ペプチドと担体ペプチドの間に介在する；(b) α -S N A P-25抗体または α -S N A P-25抗体生成細胞を含有する試料を動物から収集すること；ならびに(c)試料から α -S N A P-25抗体を単離すること；を含んでなる。この実施態様の態様では、S N A P-25切断生成物からのB o N T/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -S N A P-25抗体はポリクローナル抗体である。この実施態様の別の態様では、S N A P-25切断生成物からのB o N T/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -S N A P-25抗体はモノクローナル抗体である。この実施態様のさらなる態様では、生成されるS N A P-25切断生成物からのB o N T/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -S N A P-25モノクローナル抗体はI g Gサブタイプである。この実施態様のその他の態様では、S N A P-25組成物はさらに例えばポリエチレングリコール(P E G)、モノメトキシポリエチレングリコール(m P E G)またはポリビニルアルコール(P V A)のようなアジュバントを含んでなる。

【0043】

本開示の態様は一部ではB o N T/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P-25エピトープに選択的に結合する単離された α -S N A P-25抗体を含んでなる。本明細書で使用される際には「単離された」なる用語はヒトの介入を用いることによりその天然の環境から分子を分離することを指す。本明細書で使用される際には「抗体」なる用語は特定の抗原に応答して作られた免疫系により作成された、その抗原に特異的に結合する分子を指し、そして天然発生抗体および非天然発生抗体の双方を含む。本明細書で使用される際には「 α -S N A P-25」なる用語は「抗S N A P-

25」と同義であり、そしてSNA-25抗原に結合する抗体を指す。例えば抗体は、フラグメントが望ましい生物学的活性を呈する限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ダイマー、マルチマー、多特異的抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、二機能性抗体、Ig受容体様の細胞結合抗体、線状抗体、ダイアボディーまたはミニボディー、および同一物の一本鎖誘導体でよい。抗体は V_H および V_L ドメイン、ならびに軽鎖定常ドメイン(C_L)および重鎖定常ドメイン、 C_{H1} 、 C_{H2} および C_{H3} 、または例えばFabフラグメント、 $F(ab')_2$ フラグメント、Fcフラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメントのような、全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメントを含んでなる全長免疫グロブリン分子でよい。抗体を任意の脊椎動物種(例えばヒト、ヤギ、ウマ、ロバ、ネズミ、ラット、ウサギまたはニワトリ)から誘導することができ、そして任意の型(例えばIgG、IgE、IgM、IgDおよびIgA)、クラス(例えばIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM)またはサブクラス(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)のものでよい。天然発生抗体、非天然発生抗体およびその抗原性化合物-結合フラグメントの構造に関する一般の開示に関しては、例えば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) (その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする)を参照されたい。

【0044】

天然発生抗体は通常約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、2つの同一の軽(L)鎖および2つの同一の重(H)鎖から構成される。各軽鎖は1つの共有結合性ジスルフィド結合により重鎖に連結されるが、ジスルフィド連結の数は様々な免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で異なる。各重鎖および軽鎖はまた規則的に間隔をあけて配置された鎖内ジスルフィド橋を有する。各重鎖は一方の端で可変ドメイン(V_H)、続いて多数の定常ドメインを有する。各軽鎖は一方の端で可変ドメイン(V_L)およびそのもう一方の端で定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメインと並び、そして軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並ぶ。特定のアミノ酸残基が軽鎖と重鎖可変ドメインとの間のインターフェースを形成すると考えられる。

【0045】

完全な抗原認識および抗原結合部位は抗体の可変ドメイン、すなわちFvフラグメント内に含有される。このフラグメントは堅固な非共有結合性会合の1つの重鎖可変ドメイン(V_H)および1つの軽鎖可変ドメイン(V_L)のダイマーを含む。各ドメインは4つのフレームワーク領域(FR)を含んでなり、それは大部分は β シート立体配置をとり、3つの超可変領域により接続され、それは β シート構造を接続するループを形成し、そして β シート構造の一部を形成する場合もある。各超可変領域は相補性決定領域(CDR)に相当するアミノ酸配列を含んでなる。集合的にはそれは抗原-結合特異性を付与する V_H - V_L ダイマーの表面上の抗原結合部位を定義する6つのCDR領域の三次元立体配置である。例えば「免疫グロブリン超可変領域の立体構造」Cyrus Chothia, et al., Nature 342 (6252): 877-883 (1989); 「免疫学的に興味深いタンパク質の配列」Elvin A. Kabat, et al, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする)。抗体の定常ドメインは直接的に抗体を抗原に結合するのに関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与のような種々のエフェクター機能を呈する。

【0046】

標的抗原は一般にはエピトープとも称される1つまたはそれより多い結合部位を有し、それはCDRにより形成される抗原結合部位により認識される。本明細書で使用される際には「エピトープ」は「抗原性決定基」と同義であり、そして免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することが可能な、またはそうでなければ分子と相互作用する例えばペプチド、多糖類または脂質含有分子のような標的抗原上の部位を指す。異なるエピトープに特異的に結合する各抗体は異なる構造を有する。故に1つの抗原は1を超える対

応する抗体を有し得る。

【0047】

ポリクローナル抗体とは特定の抗原に結合することが可能な少なくとも2種の抗体を含有する抗体分子の異種性集団を指す。定義によれば、ポリクローナル抗体は少なくとも2つの異なるエピトープに結合する2つの異なる抗体を含む。本明細書で使用される際には「(複数の)モノクローナル抗体」なる用語は特定の抗原に結合することが可能な1種のみの抗体含有する、抗体分子の実質的に同種性の集団を指し、すなわち集団を含んでなる個々の抗体は微量で存在し得る可能な天然発生変異体を除いて同一である。定義によれば、モノクローナル抗体は単一のエピトープに結合する。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対して指向する。さらにポリクローナル抗体とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して指向する。その特異性に加えて、モノクローナル抗体はその他の抗体と夾雑しないで合成され得るという点で有利である。「モノクローナル」なる修飾語句は、実質的に同種の抗体の集団から得られているような抗体の特徴を示し、そして任意の特定の方法による抗体の生成を必要とするとは解釈されるべきではない。例えば本開示に従って使用するためのモノクローナル抗体を、最初に Kohler et al., Nature 256:495 (1975) により記載されたハイブリドーマ法により作成できるか、または組換えDNA法により作成できる(例えば:米国特許第4816567号;米国特許第5807715号参照)。例えばClackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) に記載される技術を用いてモノクローナル抗体をファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

10

20

【0048】

故に実施態様では、 α -SNAP-25抗体はB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25に選択的に結合する重鎖可変ドメイン(V_H)および軽鎖可変ドメイン(V_L)を含んでなる。この実施態様の態様では、重鎖可変ドメイン(V_H)は配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:80または配列番号:82である。この実施態様の別の態様では、軽鎖可変ドメイン(V_L)は配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90または配列番号:92である。

【0049】

別の実施態様では、 α -SNAP-25抗体はB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25に選択的に結合する重鎖可変ドメイン(V_H)CDR1領域、CDR2領域、CDR3領域または任意のその組み合わせを含んでなる。この実施態様の態様では、重鎖可変ドメイン(V_H)CDR1領域は配列番号:93、配列番号:94、配列番号:95、配列番号:118、配列番号:119または配列番号:120である。この実施態様の別の態様では、重鎖可変ドメイン(V_H)CDR2領域は配列番号:96、配列番号:97、配列番号:98、配列番号:99、配列番号:121、配列番号:122または配列番号:123である。この実施態様のなお別の態様では、重鎖可変ドメイン(V_H)CDR3領域は配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102または配列番号:124である。

30

【0050】

別の実施態様では α -SNAP-25抗体は、B o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25に選択的に結合する軽鎖可変ドメイン(V_L)CDR1領域、CDR2領域、CDR3領域、またはその任意の組み合わせを含んでなる。この実施態様の態様では、軽鎖可変ドメイン(V_L)CDR1領域は配列番号:103、配列番号:104、配列番号:105、配列番号:106、配列番号:107、配列番号:125、配列番号:126、配列番号:127、配列番号:128または配列番号:129である。この実施態様の別の態様では、軽鎖可変ドメイン(V_L)CDR2領域は配列番号:108、配列番号:109、配列番号:110、配列番号:111または配列番号:112である。この実施態様のなお別の態様では、軽鎖可変ドメイン(V_L)CDR3領域は配列番号:113、配列番号:114、配列番号:115、配列番号

40

50

： 1 1 6 または配列番号： 1 1 7 である。

【 0 0 5 1 】

なお別の実施態様では、 α -S N A P-2 5 抗体は B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-2 5 を含んでなるエピトープに特異的に結合する。この実施態様の態様では、エピトープは配列番号： 3 2、配列番号： 3 3、配列番号： 3 4、配列番号： 3 5、配列番号： 3 6、配列番号： 3 7、配列番号： 1 4 7 または配列番号： 1 4 8 を含んでなる。この実施態様の態様では、エピトープは配列番号： 3 9、配列番号： 4 0、配列番号： 4 1、配列番号： 4 2、配列番号： 4 3 または配列番号： 4 4 を含んでなる。

【 0 0 5 2 】

前記で開示されるように、S N A P-2 5 に存在する B o N T / A 切断部位を取り囲む配列は P₅-P₄-P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅' と示され、P₁-P₁' は切断可能結合を表す。B o N T / A による切断時に、結果的に生成された切断生成物は P₅-P₄-P₃-P₂-P₁ 配列を含むフラグメントおよび P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅' を含むフラグメントを含んでなる。本明細書で使用される際には「S N A P-2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する α -S N A P-2 5 抗体」なる用語は P₅-P₄-P₃-P₂-P₁ 配列を含んでなる任意の S N A P-2 5 切断生成物フラグメントに選択的に結合するが、P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅' 配列を含んでなる任意の S N A P-2 5 切断生成物フラグメントまたは B o N T / A 切断部位のインタクトな P₁-P₁' 切断可能結合を有する任意の S N A P-2 5 には結合しない α -S N A P-2 5 抗体を指す。本明細書で使用される際には「 α -S N A P-2 5₁₉₇ 抗体」なる用語は配列番号： 5 のグルタミン 1 9 7 に相当するカルボキシル末端 P₁ 残基を有する S N A P-2 5 に選択的に結合する抗体を指す。本明細書で使用される際には「 α -S N A P-2 5₂₀₄ 抗体」なる用語は配列番号： 1 6 のリジン 2 0 4 に相当するカルボキシル末端 P₁ 残基を有する S N A P-2 5 に選択的に結合する抗体を指す。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用される際には「選択的」なる用語は唯一の方式でまたは唯一のものの独特な効果または影響または反応を有することを指す。本明細書で使用される際には「選択的に結合する」なる用語は、抗体を参照する場合、抗体が非標的エピトープと実質的に交差反応しないような、指示された標的エピトープへの抗体の識別力のある結合を指す。本明細書で定義されるような最小サイズのペプチドエピトープは約 5 個のアミノ酸であり、そしてペプチドエピトープは典型的には少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 5 または少なくとも 2 0 個のアミノ酸を含んでなる。ペプチドエピトープは非連続的によく、すなわちそれはペプチドの一次構造において隣接しないが、ペプチドの二次、三次または四次構造により一緒にエピトープになるアミノ酸残基を含んでなる。さらにエピトープは例えば炭水化物部分、リポタンパク質もしくは糖脂質様の脂質部分、またはリン酸化されたアミノ酸様の化学的に修飾されたアミノ酸部分のようなアミノ酸配列以外の分子の一部を含んでなり得ることも留意される。この実施態様の態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-2 5 エピトープに選択的に結合する α -S N A P-2 5 抗体は、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 5 または少なくとも 2 0 個のアミノ酸を含んでなる、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-2 5 エピトープに選択的に結合することができる。この実施態様のその他の態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-2 5 エピトープに選択的に結合する α -S N A P-2 5 抗体は、多くても 5、多くても 6、多くても 7、多くても 8、多くても 9、多くても 1 0、多くても 1 5 または多くても 2 0 個のアミノ酸を含んでなる、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-2 5 エピトープに選択的に結合することができる。

【0054】

選択的結合には例えば結合アフィニティー、結合特異性および結合アビディティーのような結合特性が含まれる。David J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, pp. 240 (1998) 参照。結合アフィニティーとは、抗体がそのエピトープ結合部位に留まる時間の長さを指し、そして抗体がそのエピトープに結合する強さと見なすことができる。結合アフィニティーを抗体の平衡解離定数 (K_D) と記載することができ、それは平衡時の K_d/K_a 比として定義される。ここで K_a は抗体の会合速度定数であり、そして k_d は抗体の解離速度定数である。結合アフィニティーは会合および解離双方により決定され、そして高い会合でも低い解離でも単独では高アフィニティーを確実にすることはできない。会合速度定数 (K_a) または結合速度定数 (on-rate constant)

(K_{on}) は単位時間あたりの結合事象の数、または抗体および抗原がその抗体-抗原複合体に可逆的に会合する傾向を測定する。会合速度定数は $M^{-1} s^{-1}$ で表現され、そして以下のとおりに記号で表される: $[Ab] \times [Ag] \times K_{on}$ 。会合速度定数が多いほど、抗体はその抗原により迅速に結合するか、または抗体と抗原との間の結合アフィニティーがより高くなる。解離速度定数 (K_d) または分離速度定数 (off-rate constant) (K_{off}) は単位時間あたりの解離事象の数、抗体-抗原複合体がその構成分子、すなわち抗体および抗原に可逆的に分離 (解離) する傾向を測定する。解離速度定数は s^{-1} で表現され、そして以下のとおりに記号で表される: $[Ab + Ag] \times K_{off}$ 。解離速度定数が小さいほど、抗体はその抗原により強固に結合するか、または抗体と抗原との間の結合アフィニティーがより高くなる。平衡解離定数 (K_D) は、形成された新しい抗体-抗原複合体が、抗体-抗原複合体が平衡して解離する速度に等しいその速度を測定する。平衡解離定数は M で表現され、そして $K_{off}/K_{on} = [Ab] \times [Ag] / [Ab + Ag]$ (式中、 $[Ab]$ は抗体のモル濃度であり、 $[Ag]$ は抗原のモル濃度であり、そして $[Ab + Ag]$ は抗体-抗原複合体のモル濃度であり、ここで全ての濃度は、系が平衡にある場合のかかる構成要素のものである。平衡解離定数が小さいほど、抗体はその抗原により強固に結合するか、または抗体と抗原との間の結合アフィニティーがより高くなる。

【0055】

故に実施態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは例えば $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 未満、または $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 未満の会合速度定数を有し得る。別の実施態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは例えば $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ を超える、 $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ を超える、 $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ を超える、または $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ を超える会合速度定数を有し得る。別の態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ から $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ から $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、または $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ から $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の間の会合速度定数を有し得る。

【0056】

別の実施態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満または $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ 未満の解離速度定数を有し得る。この実施態様のその他の態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは例えば $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $2.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $3.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 4.0×10

10^{-4} s^{-1} 未満、 $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $6.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $7.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満または $9.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満の解離速度定数を有し得る。別の実施態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは例えば $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ を超える、 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を超えるまたは $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ を超える解離速度定数を有し得る。この実施態様のその他の態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは例えば $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を超える、 $2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を超える、 $3.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を超える、 $4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を超える、 $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を超える、 $6.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を超える、 $7.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を超える、 $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を超える、または $9.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を超える解離速度定数を有し得る。

【0057】

別の実施態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは 0.500 nM 未満の平衡解離定数を有し得る。この実施態様の態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは例えば 0.500 nM 未満、 0.450 nM 未満、 0.400 nM 未満、 0.350 nM 未満、 0.300 nM 未満、 0.250 nM 未満、 0.200 nM 未満、 0.150 nM 未満、 0.100 nM 未満または 0.050 nM 未満の平衡解離定数を有し得る。別の実施態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは 0.500 nM を超える平衡解離定数を有し得る。この実施態様の態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは例えば 0.500 nM を超える、 0.450 nM を超える、 0.400 nM を超える、 0.350 nM を超える、 0.300 nM を超える、 0.250 nM を超える、 0.200 nM を超える、 0.150 nM を超える、 0.100 nM を超える、または 0.050 nM を超える平衡解離定数を有し得る。

【0058】

なお別の実施態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーは、インタクトな S N A P - 2 5 に関して例えば $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、または $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満の会合速度定数を有し得る。別の実施態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体の結合アフィニティーはインタクトな S N A P - 2 5 に関して例えば多くても $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、多くても $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、多くても $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、多くても $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ または多くても $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の会合速度定数を有し得る。

【0059】

結合特異性はそのエピトープを含有する分子と、そのエピトープを含有しない分子との間で識別する抗体の能力である。結合特異性を測定する1つの方式は、そのエピトープを含有しない分子に関する抗体の K o n 会合速度に相対して、そのエピトープを含有する分子に関する抗体の K o n 会合速度を比較することである。例えば B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに関する α - S N A P - 2 5 抗体の会合速度定数 (K a) を、例えば B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を欠如する S N A P - 2 5 エピトープまたは B o N T

／A切断部位のインタクトな P_1 ’切断可能結合を有するSNAP-25エピトープのような、そのエピトープを含まないSNAP-25に相対して比較することである。この実施態様の態様では、BONT／A切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する α -SNAP-25抗体は、その（複数の）エピトープを含まないSNAP-25に関して例えば $1 \times 10^0 M^{-1} s^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^1 M^{-1} s^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^2 M^{-1} s^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$ 未満、または $1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 未満の、会合速度定数（Ka）を有する。この実施態様のその他の態様では、BONT／A切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する α -SNAP-25抗体は、その（複数の）エピトープを含まないSNAP-25に関して例えば多くても $1 \times 10^0 M^{-1} s^{-1}$ 、多くても $1 \times 10^1 M^{-1} s^{-1}$ 、多くても $1 \times 10^2 M^{-1} s^{-1}$ 、多くても $1 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$ または多くても $1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、会合速度定数（Ka）を有する。

10

【0060】

この実施態様のなおさらなる態様では、BONT／A切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する α -SNAP-25抗体は、そのエピトープを含まないSNAP-25に相対して、そのエピトープに関して例えば少なくとも2倍多い、少なくとも3倍多い、少なくとも4倍多い、少なくとも5倍多い、少なくとも6倍多い、少なくとも7倍多い、少なくとも8倍多い、または少なくとも9倍多い会合速度定数（Ka）を有する。この実施態様のさらなる態様では、BONT／A切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する α -SNAP-25抗体は、そのエピトープを含まないSNAP-25に相対して、そのエピトープに関して例えば少なくとも10倍多い、少なくとも100倍多い、少なくとも1,000倍多いまたは少なくとも10,000倍多い会合速度定数（Ka）を有する。この実施態様のなおその他の態様では、BONT／A切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する α -SNAP-25抗体は、そのエピトープを含まないSNAP-25に相対して、そのエピトープに関して例えば多くても1倍多い、多くても2倍多い、多くても3倍多い、多くても4倍多い、多くても5倍多い、多くても6倍多い、多くても7倍多い、多くても8倍多い、または多くても9倍多い会合速度定数（Ka）を有する。この実施態様のなおその他の態様では、BONT／A切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する α -SNAP-25抗体は、そのエピトープを含まないSNAP-25に相対して、そのエピトープに関して例えば多くても10倍多い、多くても100倍多い、多くても1,000倍多い、または多くても10,000倍多い会合速度定数（Ka）を有する。

20

30

【0061】

BONT／A切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する α -SNAP-25抗体の結合特異性を、例えばBONT／A切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を欠如するSNAP-25エピトープまたはBONT／A切断部位のインタクトな P_1 - P_1 ’切断可能結合を有するSNAP-25エピトープのような、そのエピトープを含まないSNAP-25に相対して、かかる α -SNAP-25抗体がそのSNAP-25エピトープを識別することができる比として特徴付けすることもできる。この実施態様の態様では、BONT／A切断部位切断可能結合の P_1 残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する α -SNAP-25抗体は、そのエピトープを含まないSNAP-25に相対して、そのSNAP-25エピトープに関して例えば少なくとも2：1、少なくとも3：1、少なくとも4：1、少なくとも5：1、少なくとも64：1、少なくとも7：1、少なくとも8：1、少なくとも9：1、少なくとも10：1、少なくとも15：1、少なくとも20：1、少なくとも25：1、少なくとも30：1、少なくとも35：1または少なくとも40：1の結合特異性比を有する。この実施態様のなおその他の態様では、

40

50

B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体は、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を欠如する S N A P - 2 5 に相対して、その S N A P - 2 5 エピトープに関して例えば少なくとも 2 : 1、少なくとも 3 : 1、少なくとも 4 : 1、少なくとも 5 : 1、少なくとも 6 : 1、少なくとも 7 : 1、少なくとも 8 : 1、少なくとも 9 : 1、少なくとも 10 : 1、少なくとも 15 : 1、少なくとも 20 : 1、少なくとも 25 : 1、少なくとも 30 : 1、少なくとも 35 : 1 または少なくとも 40 : 1 の結合特異性比を有する。この実施態様のさらにその他の態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体は、B o N T / A 切断部位のインタクトな P₁ - P₁ ' 切断可能結合を有する S N A P - 2 5 に相対して、その S N A P - 2 5 エピトープに関して例えば少なくとも 2 : 1、少なくとも 3 : 1、少なくとも 4 : 1、少なくとも 5 : 1、少なくとも 6 : 1、少なくとも 7 : 1、少なくとも 8 : 1、少なくとも 9 : 1、少なくとも 10 : 1、少なくとも 15 : 1、少なくとも 20 : 1、少なくとも 25 : 1、少なくとも 30 : 1、少なくとも 35 : 1 または少なくとも 40 : 1 の結合特異性比を有する。

10

【0062】

結合アビディティは機能的アフィニティとしても公知であり、多価抗体とその抗原との間の機能的結合力の合計を指す。抗体分子は 1 を超える結合部位を有し得て（例えば I g G に関して 2 個、I g M に関して 10 個）、そして多くの抗原は 1 を超える抗原性部位を含有する。抗体の結合アビディティは個々の抗体結合部位の結合アフィニティに依存するが、全ての抗体-抗原相互作用は抗体が完全に解離するために同時に破壊されなければならないので、結合アビディティは結合アフィニティよりも大きい。B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体はその抗体に関する任意のおよび全てのエピトープに選択的に結合することができるということは想定される。

20

【0063】

故に実施態様では、α - S N A P - 2 5 抗体は B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体である。この実施態様の態様では、α - S N A P - 2 5 抗体は、カルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体、またはカルボキシル末端リジンに相当するカルボキシル末端 P₁ 残基を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体である。この実施態様のその他の態様では α - S N A P - 2 5 抗体は、配列番号：5 のグルタミン 197 に相当するカルボキシル末端 P₁ 残基を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体、または配列番号：16 のリジン 204 に相当するカルボキシル末端 P₁ 残基を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体である。この実施態様のさらにその他の態様では、α - S N A P - 2 5 抗体は、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43 または配列番号：44、配列番号：147 または配列番号：148 のカルボキシル末端アミノ酸配列を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体である。

30

40

【0064】

本開示の態様は一部では B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法を含んでなる。本明細書に開示される免疫基盤の方法を、例えば真度、精度、検出限界（L O D）、定量限界（L O Q）、範囲、特異性、選択性、直線性、耐久性および系の適合性を含むいくつかのパラメーターにより評価することができる。方法の真度は分析方法の正確さ、または測定された値と従来の真の値として認められた値もしくは認められた参照値との間の一致の近似性の測定である。方法の精度は均一な試料の複数回のサンプリングに手順を繰り返し適用した場合の、個々の試験結果の間の一致の程度である。そのように、精度は 1）アッ

50

セイ内変動性；2) 日内変動性（併行精度）；および3) 日間変動性（室内再現精度）；および4) 研究室間変動性（室間再現精度）；を評価する。変動係数（CV%）は観察されたまたは理論的平均値に相対して表現される精度の定量的測定値である。

【0065】

本明細書に開示される免疫基盤の方法は、バックグラウンドを超えてBoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25を含んでなるα-SNAP-25抗体-抗原複合体の存在を検出できなければならない。方法の検出限界（LOD）とは陰性対照またはブランクとは有意に異なるシグナルを上昇させる分析物の濃度を指し、バックグラウンドから区別することができる分析物の最低濃度を表す。

【0066】

故に実施態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は、陰性対照またはブランクとは有意に異なる量でBoNT/AのLODを検出することができる。この実施態様の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば10 ng以下、9 ng以下、8 ng以下、7 ng以下、6 ng以下、5 ng以下、4 ng以下、3 ng以下、2 ng以下、1 ng以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば900 pg以下、800 pg以下、700 pg以下、600 pg以下、500 pg以下、400 pg以下、300 pg以下、200 pg以下、100 pg以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のさらなる態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば90 pg以下、80 pg以下、70 pg以下、60 pg以下、50 pg以下、40 pg以下、30 pg以下、20 pg以下、10 pg以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば9 pg以下、8 pg以下、7 pg以下、6 pg以下、5 pg以下、4 pg以下、3 pg以下、2 pg以下、1 pg以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のなおその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば0.9 pg以下、0.8 pg以下、0.7 pg以下、0.6 pg以下、0.5 pg以下、0.4 pg以下、0.3 pg以下、0.2 pg以下、0.1 pg以下のBoNT/AのLODを有する。

【0067】

この実施態様の別の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば10 nM以下、9 nM以下、8 nM以下、7 nM以下、6 nM以下、5 nM以下、4 nM以下、3 nM以下、2 nM以下または1 nM以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば900 pM以下、800 pM以下、700 pM以下、600 pM以下、500 pM以下、400 pM以下、300 pM以下、200 pM以下または100 pM以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば100 pM以下、90 pM以下、80 pM以下、70 pM以下、60 pM以下、50 pM以下、40 pM以下、30 pM以下、20 pM以下または10 pM以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のなおその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は10 pM以下のBoNT/A、9 pM以下、8 pM以下、7 pM以下、6 pM以下、5 pM以下、4 pM以下、3 pM以下、2 pM以下または1 pM以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば1,000 fM以下、900 fM以下、800 fM以下、700 fM以下、600 fM以下、500 fM以下、400 fM以下、300 fM以下、200 fM以下または100 fM以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば100 fM以下、90 fM以下、80 fM以下、70 fM以下、60 fM以下、50 fM以下、40 fM以下、30 fM以下、20 fM以下または10 fM以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば10 fM以下、9 fM以下、8 fM以下、7 fM以下、6 fM以下、5 fM以下、4 fM以下、3 fM以下、2 fM以下または1 fM以下のボツリヌス神経毒AのLODを有する。

10

20

30

40

50

【0068】

定量限界（LOQ）は許容できるレベルの真度および精度で測定することができる試料または標本中の分析物の最低および最高濃度である。下の定量限界とは検出方法がバックグラウンドから一貫して測定することができる最低用量を指す。上の定量限界とは、シグナルの飽和を生じる前に、検出方法がバックグラウンドから一貫して測定することができる最高用量である。方法の直線性の範囲は下の定量限界と上の定量限界との間の区域である。直線性の範囲は上の定量限界から下の定量限界を減じることにより計算される。本明細書で使用される際には「下の漸近線に関するシグナル対ノイズ比」なる用語は、バックグラウンドシグナルにより除された、下の検出限界で方法において検出されたシグナルを指す。本明細書で使用される際には「上の漸近線に関するシグナル対ノイズ比」なる用語は、バックグラウンドシグナルにより除された、上の検出限界で方法において検出されたシグナルを指す。

10

【0069】

故に実施態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は陰性対照またはブランクとは有意に異なる量でB o N T / A のLOQを検出することができる。この実施態様の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば10 ng 以下、9 ng 以下、8 ng 以下、7 ng 以下、6 ng 以下、5 ng 以下、4 ng 以下、3 ng 以下、2 ng 以下、1 ng 以下のB o N T / A のLOQを有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば900 pg 以下、800 pg 以下、700 pg 以下、600 pg 以下、500 pg 以下、400 pg 以下、300 pg 以下、200 pg 以下、100 pg 以下のB o N T / A のLOQを有する。この実施態様のさらなる態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば90 pg 以下、80 pg 以下、70 pg 以下、60 pg 以下、50 pg 以下、40 pg 以下、30 pg 以下、20 pg 以下、10 pg 以下のB o N T / A のLOQを有する。この実施態様のその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば9 pg 以下、8 pg 以下、7 pg 以下、6 pg 以下、5 pg 以下、4 pg 以下、3 pg 以下、2 pg 以下、1 pg 以下のB o N T / A のLOQを有する。この実施態様のなおその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば0.9 pg 以下、0.8 pg 以下、0.7 pg 以下、0.6 pg 以下、0.5 pg 以下、0.4 pg 以下、0.3 pg 以下、0.2 pg 以下、0.1 pg 以下のB o N T / A のLOQを有する。

20

30

【0070】

この実施態様の別の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば10 nM 以下、9 nM 以下、8 nM 以下、7 nM 以下、6 nM 以下、5 nM 以下、4 nM 以下、3 nM 以下、2 nM 以下または1 nM 以下のB o N T / A のLOQを有する。この実施態様のその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば900 pM 以下、800 pM 以下、700 pM 以下、600 pM 以下、500 pM 以下、400 pM 以下、300 pM 以下、200 pM 以下または100 pM 以下のB o N T / A のLOQを有する。この実施態様のその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば100 pM 以下、90 pM 以下、80 pM 以下、70 pM 以下、60 pM 以下、50 pM 以下、40 pM 以下、30 pM 以下、20 pM 以下または10 pM 以下のB o N T / A のLOQを有する。この実施態様のなおその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば10 pM 以下のB o N T / A 、9 pM 以下、8 pM 以下、7 pM 以下、6 pM 以下、5 pM 以下、4 pM 以下、3 pM 以下、2 pM 以下または1 pM 以下のB o N T / A のLOQを有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば1,000 fM 以下、900 fM 以下、800 fM 以下、700 fM 以下、600 fM 以下、500 fM 以下、400 fM 以下、300 fM 以下、200 fM 以下または100 fM 以下のB o N T / A のLOQを有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば100 fM 以下、90 fM 以下、80 fM 以下、70 fM 以下、60 fM 以下、50 fM 以下、40 fM 以下、30 fM 以下、20 fM 以下または10 fM 以下のB o N T / A のLOQを有する。この実施

40

50

態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば10 fM以下、9 fM以下、8 fM以下、7 fM以下、6 fM以下、5 fM以下、4 fM以下、3 fM以下、2 fM以下または1 fM以下のB o N T / A の L O Q を有する。

【0071】

開示された方法の態様を実行するために有用な免疫基盤のアッセイはわずか50%の精度を有さなければならない。この実施態様の態様では、免疫基盤のアッセイはわずか50%、わずか40%、わずか30%またはわずか20%の精度を有する。この実施態様のその他の態様では、免疫基盤のアッセイはわずか15%、わずか10%またはわずか5%の精度を有する。この実施態様のその他の態様では、免疫基盤のアッセイはわずか4%、わずか3%、わずか2%またはわずか1%の精度を有する。

10

【0072】

開示された方法の態様を実行するために有用な免疫基盤のアッセイは少なくとも50%の正確性を有さなければならない。この実施態様の態様では、免疫基盤のアッセイは少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%または少なくとも80%の正確性を有する。この実施態様のその他の態様では、免疫基盤のアッセイは少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の正確性を有する。この実施態様のその他の態様では、免疫基盤のアッセイは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の正確性を有する。

【0073】

本明細書に開示される免疫基盤の方法は統計的に有意である下の漸近線に関するシグナル対ノイズ比および統計的に有意である上の漸近線に関するシグナル対ノイズ比を有さなければならない。この実施態様の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は下の漸近線に関して例えば少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1、少なくとも6:1、少なくとも7:1、少なくとも8:1、少なくとも9:1、少なくとも10:1、少なくとも15:1または少なくとも20:1のシグナル対ノイズ比を有する。この実施態様のその他の態様では、免疫基盤の方法は上の漸近線に関して例えば少なくとも10:1、少なくとも15:1、少なくとも20:1、少なくとも25:1、少なくとも30:1、少なくとも35:1、少なくとも40:1、少なくとも45:1、少なくとも50:1、少なくとも60:1、少なくとも70:1、少なくとも80:1、少なくとも90:1または少なくとも100:1、少なくとも150:1、少なくとも200:1、少なくとも250:1、少なくとも300:1、少なくとも350:1、少なくとも400:1、少なくとも450:1、少なくとも500:1、少なくとも550:1または少なくとも600:1のシグナル対ノイズ比を有する。

20

30

【0074】

方法の特異性は、例えば部分的に活性な、または不活性な分析物のようなその他の関連する構成要素の排除に重要な分析物を方法が測定する能力を定義する。方法の選択性は、分析方法が試料中の種々の物質を差別化する能力を記載する。方法の直線性は、試料中の分析物の濃度に比例して直接的であるか、または十分に定義された数学的変換により結果を引き出すその能力である。故に実施態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は十分に活性なB o N T / A を、十分に活性なB o N T / A の活性の例えば70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下または10%以下を有する部分的に活性なB o N T / A と区別することができる。

40

【0075】

方法の耐久性は、正常な（しかし変動する）試験条件下で同一の試料に関して得られた試験結果の室間再現精度である。手順の頑健性は、方法パラメーターにおける小さいが、慎重な変動により影響を受けずにあるその受容力の測定値であり、そして正常な利用におけるその信頼性の指標を提供する。故に耐久性は回避し難い変化を評価するが、頑健性は慎重な変化を評価する。耐久性および頑健性により評価される典型的なパラメーターには、凍結／解凍、インキュベーション時間、インキュベーション温度、試薬の寿命、試料調製物、試料貯蔵、細胞継代数、多くの毒素、精製間の変動性およびニッキング反応間の変

50

動性の影響が含まれる。細胞基盤のアッセイに関する頑健性パラメーターには、細胞バンク（凍結の始め、中間および終わり）、細胞継代レベル、細胞播種密度、細胞ストック密度（培養何日か）、フラスコ中の細胞齢（播種までの待ち時間）、インキュベーション時間、様々なプレート、過量の血清、および試薬の供給源が含まれる。方法の系適合性は参照標準の分析による経時的な、試薬および装置の性能を含むアッセイ性能の決定である。設備、電子工学、アッセイ性能および分析されるべき試料が統合された系を構成するという事実を参照してFDAの指導では系適合性が強調される。用量対応答の対数をプロットする場合、参照物質の連続希釈および試料の連続希釈が併行曲線を生じさせるはずである平行性に関して試験することにより、系適合性を評価することができる。

【0076】

本開示の態様は一部では確立された細胞株からの細胞を含んでなる。本明細書で使用される際には「細胞」なる用語は、BONT/AによるBONT/A中毒に感受性が高い任意の真核細胞、またはBONT/Aを取り込むことができる任意の真核細胞を指す。細胞なる用語は例えばネズミ、ラット、ブタ、ウシ、ウマ、霊長類およびヒト細胞のような種々の生物からの；例えばニューロン性および非ニューロン性のような種々の細胞型からの；細胞を包含し、そして同種の細胞集団、組織または生物から単離できるか、またはその一部でよい。本明細書で使用される際には「確立された細胞株」なる用語は「不死細胞株」または「形質転換された細胞株」と同義であり、そして生物、組織または器官供給源から誘導される細胞集団からの無制限な繁殖に関して選択された細胞の細胞培養物を指す。定義によれば、確立された細胞株は初代細胞の細胞培養物を除外する。本明細書で使用される際には「初代細胞」なる用語は新鮮な組織または器官から直接採取された細胞であり、そして無制限に繁殖する潜在能力を有さない。確立された細胞株は細胞の異種性集団または細胞の均一な集団を含んでなることができる。単一の細胞から誘導される確立された細胞株はクローン細胞株と称される。確立された細胞株は、その細胞が全体的な細胞メカニズム（それによりBONT/Aがタンパク質分解によりSNAP-25基質を切断し、そしてBONT/AのBONT/A受容体への結合、神経毒/受容体複合体の内部移行、BONT/A軽鎖の細胞内小胞から細胞質への転位置およびSNAP-25のタンパク質分解による切断を包含する）を行うために細胞に必要な全ての構成要素を内因的に発現するものでよい。それに代えて、確立された細胞株は、その細胞が全体的な細胞メカニズム（それによりBONT/Aがタンパク質分解によりSNAP-25基質を切断し、そしてBONT/AのBONT/A受容体への結合、神経毒/受容体複合体の内部移行、BONT/A軽鎖の細胞内小胞から細胞質への転位置およびSNAP-25のタンパク質分解による切断を包含する）を行うために外因性供給源から少なくとも1つの構成要素を導入されてしまっているものでよい。遺伝子操作された細胞株とも称されるかかる確立された細胞株からの細胞は例えば外因性FGFR2、外因性FGFR3、外因性SV2、外因性SNAP-25または任意のその組み合わせを発現できる。

【0077】

本開示の態様は一部ではBONT/A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞を含んでなる。本明細書で使用される際には「BONT/A中毒に感受性が高い（複数の）細胞」、「BONT/AによるBONT/A中毒に感受性が高い（複数の）細胞」または「BONT/AによるBONT/A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの（複数の）細胞」なる用語は全体的な細胞メカニズム（それによりBONT/Aがタンパク質分解によりSNAP-25基質を切断し、そしてBONT/AのBONT/A受容体への結合、神経毒/受容体複合体の内部移行、BONT/A軽鎖の細胞内小胞から細胞質への転位置およびSNAP-25のタンパク質分解による切断を包含する）を行うことができる（複数の）細胞を指す。定義によれば、BONT/A中毒に感受性が高い（複数の）細胞は少なくとも1つのBONT/A受容体および少なくとも1つのSNAP-25基質を発現するか、または発現するように操作されなければならない。本明細書で使用される際には「BONT/Aを取り込むことができる（複数の）細胞」または「BONT/Aを取り込むことができる確立された細胞株を含んでなる（複数の）細胞」なる用語は全体的な細胞

10

20

30

40

50

胞メカニズム（それによりB o N T / Aがタンパク質分解によりS N A P - 2 5基質を切断し、そしてB o N T / AのB o N T / A受容体への結合、神経毒／受容体複合体の内部移行、B o N T / A軽鎖の細胞内小胞から細胞質への転位置およびS N A P - 2 5のタンパク質分解による切断を包含する）を行うことができる細胞を指す。定義によれば、B o N T / Aを取り込むことができる（複数の）細胞は少なくとも1つのB o N T / A受容体および少なくとも1つのS N A P - 2 5基質を発現するか、または発現するように操作されなければならない。

【0078】

故に実施態様では、確立された細胞株からの細胞はB o N T / A中毒に感受性が高い。この実施態様の態様では、確立された細胞株からの細胞は例えば約500 pM以下、約400 pM以下、約300 pM以下、約200 pM以下または約100 pM以下のB o N T / AによるB o N T / A中毒に感受性が高い。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は例えば約90 pM以下、約80 pM以下、約70 pM以下、約60 pM以下、約50 pM以下、約40 pM以下、約30 pM以下、約20 pM以下または約10 pM以下のB o N T / AによるB o N T / A中毒に感受性が高い。さらにその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は例えば約9 pM以下、約8 pM以下、約7 pM以下、約6 pM以下、約5 pM以下、約4 pM以下、約3 pM以下、約2 pM以下または約1 pM以下のB o N T / AによるB o N T / A中毒に感受性が高い。なおその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は例えば約0.9 pM以下、約0.8 pM以下、約0.7 pM以下、約0.6 pM以下、約0.5 pM以下、約0.4 pM以下、約0.3 pM以下、約0.2 pMまたは約0.1 pM以下のB o N T / AによるB o N T / A中毒に感受性が高い。本明細書で使用される際には「約」なる用語は、記述された項目、数、パーセンテージもしくは用語の値を適したものにする場合、記述された項目、パーセンテージ、パラメーターもしくは用語の値の+または-10%の範囲を指す。

【0079】

別の実施態様では、確立された細胞株を含んでなる細胞はB o N T / Aを取り込むことができる。この実施態様の態様では、確立された細胞株を含んでなる細胞は例えば約500 pM以下、約400 pM以下、約300 pM以下、約200 pM以下または約100 pM以下のB o N T / Aを取り込むことができる。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株を含んでなる細胞は約90 pM以下、約80 pM以下、約70 pM以下、約60 pM以下、約50 pM以下、約40 pM以下、約30 pM以下、約20 pM以下または約10 pM以下のB o N T / Aを取り込む能力を保有する。さらにその他の態様では、確立された細胞株を含んでなる細胞は約9 pM以下、約8 pM以下、約7 pM以下、約6 pM以下、約5 pM以下、約4 pM以下、約3 pM以下、約2 pM以下または約1 pM以下のB o N T / Aを取り込む能力を保有する。なおその他の態様では、確立された細胞株を含んでなる細胞は約0.9 pM以下、約0.8 pM以下、約0.7 pM以下、約0.6 pM以下、約0.5 pM以下、約0.4 pM以下、約0.3 pM以下、約0.2 pM以下または約0.1 pM以下のB o N T / Aを取り込む能力を保有する。

【0080】

本開示の態様は一部ではB o N T / Aを含んでなる。本明細書で使用される際には「B o N T / A」なる用語は「ボツリヌス神経毒血清A型」または「ボツリヌス神経毒A型」と同義であり、そして天然発生B o N T / Aまたはその非天然発生B o N T / Aの双方を指し、そして約150 kDaのB o N T / A神経毒および関連する非毒素関連タンパク質（NAP）、ならびに約150 kDaのB o N T / A神経毒単独を含んでなるB o N T / A複合体を含む。B o N T / A複合体の非限定例には、例えば900 kDaのB o N T / A複合体、500 kDaのB o N T / A複合体、300 kDaのB o N T / A複合体が含まれる。約150 kDaのB o N T / A神経毒の非限定例には例えば配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4が含まれる。

【0081】

本明細書で使用される際には「天然発生B o N T / A」なる用語は、限定するものでは

ないが、翻訳後修飾、選択的スプライシングされた転写物または自然突然変異から生成される B o N T / A アイソフォームならびに例えば B o N T / A 1 サブタイプ、B o N T / A 2 サブタイプ、B o N T / A 3 サブタイプ、B o N T / A 4 サブタイプおよび B o N T / A 5 サブタイプのような B o N T / A サブタイプを含む天然発生過程により生成される任意の B o N T / A を指す。天然発生 B o N T / A には、限定するものではないが、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、または配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 もしくは配列番号：4 から例えば 1 個以上、2 個以上、3 個以上、4 個以上、5 個以上、6 個以上、7 個以上、8 個以上、9 個以上、10 個以上、20 個以上、30 個以上、40 個以上、50 個以上または 100 個のアミノ酸を置換、欠失もしくは付加したものが含まれる。天然発生 B o N T / A の市販により入手可能な医薬組成物には、限定するものではないが、BOTOX（登録商標）（Allergan, Inc., Irvine, CA）、DYSPORT（登録商標）／RELOXIN（登録商標）、（Ipsen Ltd., Slough, England）、PURTOX（登録商標）（Mentor Corp., Santa Barbara, CA）、XEOMIN（登録商標）（Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Germany）、NEURONOX（登録商標）（Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, South Korea）、B T X - A が含まれる。

10

【0082】

本明細書で使用される際には「非天然発生 B o N T / A」なる用語は、限定するものではないが、無作為変異誘発または合理的設計を用いて遺伝子操作により生成された改変されたアミノ酸配列を伴う B o N T / A、およびインビトロ化学合成により生成された B o N T / A を含む、その構造がヒトの用手操作を援用して修飾された任意の B o N T / A を指す。非天然発生 B o N T / A の非限定例は例えば「翻訳後修飾およびクロストリジウム神経毒」Steward, L.E.ら、米国特許第 7 2 2 3 5 7 7 号；「活性化可能なクロストリジウム毒素」Dolly, J.O.ら、米国特許第 7 4 1 9 6 7 6 号；「クロストリジウム神経毒組成物および修飾クロストリジウム神経毒」Steward, L.E.ら、米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 2 2 0 3 8 6 号；「内因性クロストリジウム毒素受容体系に関して増強されたターゲティング能力を有する修飾クロストリジウム毒素」Steward, L.E.ら、米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 9 6 2 4 8 号；「クロストリジウム毒素標的細胞に関して改変されたターゲティング能力を有する修飾クロストリジウム毒素」Steward, L.E.ら、米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 1 6 1 5 4 3 号；「クロストリジウム毒素標的細胞に関して増強された転位能力および改変されたターゲティング活性を有する修飾クロストリジウム毒素」Steward, L.E.ら、米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 2 4 1 8 8 1 号（その各々をその

20

30

【0083】

故に実施態様では、検出されている B o N T / A 活性は天然発生 B o N T / A に由来する。この実施態様の態様では、検出されている B o N T / A 活性は B o N T / A アイソフォームまたは B o N T / A サブタイプに由来する。この実施態様の態様では、検出されている B o N T / A 活性は配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：4 の B o N T / A に由来する。この実施態様のその他の態様では、検出されている B o N T / A 活性は配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：4 と例えば少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を有する B o N T / A に由来する。この実施態様のその他の態様では、検出されている B o N T / A 活性は BOTOX（登録商標）、DYSPORT（登録商標）／RELOXIN（登録商標）、PURTOX（登録商標）、XEOMIN（登録商標）、NEURONOX（登録商標）または B T X - A に由来する。

40

【0084】

別の実施態様では、検出されている B o N T / A 活性は非天然発生 B o N T / A に由来する。この実施態様のその他の態様では、検出されている B o N T / A 活性は配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：4 と例えば少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を有する非天然発生 B o N T / A バリエーションに由来する。この実

50

施態様のその他の態様では検出されている B o N T / A 活性は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：4に相対して例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の非隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生 B o N T / A バリエーションに由来する。この実施態様のなおその他の態様では検出されている B o N T / A 活性は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：4に相対して例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生 B o N T / A バリエーションに由来する。

10

【0085】

本開示の態様は一部では S N A P - 2 5 を含んでなる。本明細書で使用される際には「S N A P - 2 5」なる用語は B o N T / A により優先的に切断される天然発生 S N A P - 2 5 または非天然発生 S N A P - 2 5 を指す。本明細書で使用される際には「優先的に切断される」なる用語は、B o N T / A による B o N T / A 基質の切断速度が、B o N T / A による任意のその他の基質の切断速度よりも少なくとも1桁高いことを指す。この実施態様の態様では、B o N T / A による B o N T / A 基質の切断速度は B o N T / A による任意のその他の基質の切断速度よりも少なくとも2桁高い、少なくとも3桁高い、少なくとも4桁高い、または少なくとも5桁高い。

【0086】

本明細書で使用される際には「天然発生 S N A P - 2 5」なる用語は、限定するものではないが、翻訳後修飾、選択的スプライシングされた転写物または自然突然変異から生成される S N A P - 2 5 アイソフォームおよび S N A P - 2 5 サブタイプを含む天然発生過程により生成される任意の S N A P - 2 5 を指す。天然発生 S N A P - 2 5 には限定するものではないが、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23もしくは配列番号：24、または配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23もしくは配列番号：24から例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上のアミノ酸を置換、欠失または付加するものが含まれる。

20

30

【0087】

本明細書で使用される際には「非天然発生 S N A P - 2 5」なる用語は、限定するものではないが、無作為変異誘発または合理的設計を用いて遺伝子操作により生成された S N A P - 2 5、およびインビトロ化学合成により生成された S N A P - 2 5 を含む、その構造がヒトの用手操作を援用して修飾された任意の S N A P - 2 5 を指す。非天然発生 S N A P - 2 5 の非限定例は例えば「クロストリジウム毒素に関する F R E T プロテアーゼアッセイ」Steward, L.E.ら、米国特許第7332567号；「クロストリジウム毒素活性に関する親油性色素基盤の F R E T アッセイ」Fernandez-Salasら、米国特許出願公開第2008/0160561号（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。非天然発生 S N A P - 2 5 は配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24から例えば1個以上、2個以上、3個以上

40

50

、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上のアミノ酸を置換、欠失または付加できる。

【0088】

故に実施態様では、SNAP-25は天然発生SNAP-25である。この実施態様の態様では、SNAP-25はSNAP-25アイソフォームまたはSNAP-25サブタイプである。この実施態様の態様では、天然発生SNAP-25は配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24の天然発生SNAP-25である。この実施態様のその他の態様では、SNAP-25は、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24と例えば少なくとも70%のアミノ酸同一性、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する天然発生SNAP-25である。

10

【0089】

別の実施態様では、SNAP-25は非天然発生SNAP-25である。この実施態様のその他の態様では、SNAP-25は配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：4と例えば少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する非天然発生SNAP-25である。この実施態様のその他の態様では、SNAP-25は配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24に相対して例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の非隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生SNAP-25である。この実施態様のなおその他の態様では、SNAP-25は配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24に相対して例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生SNAP-25である。

20

30

【0090】

SNAP-25は内因性SNAP-25または外因性SNAP-25でよい。本明細書で使用される際には「内因性SNAP-25」なる用語は、それが細胞のゲノム内で天然にコードされるので、SNAP-25の外部供給源またはSNAP-25をコードする遺伝材料の外部供給源を必要とせずに細胞が生来的にSNAP-25を発現するように細胞に天然に存在するSNAP-25を指す。内因性SNAP-25の発現は例えば細胞分化のような環境刺激を伴っても、または伴わなくてもよい。定義によれば、内因性SNAP-25は天然発生SNAP-25またはそのバリエーションのみでよい。例えば以下の確立された細胞株は内因性SNAP-25を発現する：BE(2)-M17、Kelly、LA1-55n、N1E-115、N4TG3、N18、Neuro-2a、NG108-15、PC12、SH-SY5Y、SiMaおよびSK-N-BE(2)-C。

40

50

【0091】

本明細書で使用される際には「外因性SNAP-25」なる用語は、ヒトの用手操作によりSNAP-25の外部供給源またはSNAP-25をコードする遺伝材料の外部供給源の導入を介して細胞において発現されるSNAP-25を指す。外因性SNAP-25の発現は例えば細胞分化のような環境刺激を伴っても、または伴わなくてもよい。非限定例としては、確立された細胞株からの細胞はSNAP-25の一過性の、または安定したトランスフェクションにより外因性SNAP-25を発現することができる。別の非限定例としては、確立された細胞株からの細胞はSNAP-25のタンパク質トランスフェクションにより外因性SNAP-25を発現することができる。外因性SNAP-25は天然発生SNAP-25もしくはそのバリエーション、または非天然発生SNAP-25もしくはそのバリエーションでよい。

10

【0092】

故に実施態様では、確立された細胞株からの細胞は内因性SNAP-25を発現する。この実施態様の態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性SNAP-25は天然発生SNAP-25である。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性SNAP-25は配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24である。この実施態様のなおさらなる態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性SNAP-25は例えばSNAP-25アイソフォームまたはSNAP-25サブタイプのような天然発生SNAP-25である。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性SNAP-25は、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24と例えば少なくとも70%のアミノ酸同一性、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する天然発生SNAP-25である。

20

30

【0093】

別の実施態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して外因性SNAP-25を発現するために操作される。この実施態様の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して天然発生SNAP-25を発現するために操作される。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24の天然発生SNAP-25を発現するために操作される。この実施態様のなおその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して例えばSNAP-25アイソフォームまたはSNAP-25サブタイプのような天然発生SNAP-25を発現するために操作される。この実施態様のさらにその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24と例えば少なくとも70%のアミノ酸同一性、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する天然発生SNAP-25を発現するために操作される。

40

50

【0094】

実施態様の別の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して非天然発生 S N A P-25 を発現するために操作される。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 または配列番号：24 と例えば少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する非天然発生 S N A P-25 を発現するために操作される。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 または配列番号：24 に相対して、例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の非隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生 S N A P-25 を発現するために操作される。この実施態様のなおその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 または配列番号：24 に相対して、例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生 S N A P-25 を発現するために操作される。

【0095】

B o N T / A への暴露の後に B o N T / A 基質の切断を検出するアッセイを用いて、細胞が内因性または外因性 S N A P-25 を発現しているかどうかを評価することができる。これらのアッセイでは S N A P-25 を発現する細胞において B o N T / A 処理の後に S N A P-25 切断生成物の作成を検出する。特異的ウェスタンブロット分析の非限定例、ならびに十分に特徴付けされた試薬、条件およびプロトコールを、限定するものではないが、Amersham Biosciences, Piscataway, NJ ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA ; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL ; Promega Corporation, Madison, WI ; および Stratagene, Inc., La Jolla, CA. を含む商業用の製造供給元から容易に入手可能である。S N A P-25 切断に関するこれらのおよび類似のアッセイは、内因性または外因性 S N A P-25 を発現する細胞を同定するのに有用であり得る。

【0096】

非限定例としては、B o N T / A S N A P-25 切断生成物または S N A P-25 の切断および未切断双方の形態を認識する抗体を使用するウェスタンブロット分析を用いて B o N T / A の取り込みに関して検定することができる。これらのアッセイに有用な α -S N A P-25 抗体の実例には、限定するものではないが、 α -S N A P-25 マウスモノクローナル抗体 S M I-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD)、マウス α -S N A P-25 モノクローナル抗体 C I 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、 α -S N A P-25 マウスモノクローナル抗体 C I 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、 α -S N A P-25 マウスモノクローナル抗体 S P 12 (Abcam, Cambridge, MA)、 α -S N A P-25 ウサギポリクローナル抗血清 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、 α -S N A P-25 ウサギポリクローナル抗血清

(Abcam, Cambridge, MA) および α -S N A P-25 ウサギポリクローナル抗血清 S 9 6 8 4 (Sigma, St Louis, MO) が含まれる。

【0097】

本開示の態様は一部では B o N T / A 受容体を含んでなる。本明細書で使用される際には「B o N T / A 受容体」なる用語は、B o N T / A 中毒応答を引き出す様式で B o N T / A と優先的に相互作用する天然発生 B o N T / A 受容体または非天然発生 B o N T / A 受容体のいずれかを指す。本明細書で使用される際には「優先的に相互作用する」なる用語は、B o N T / A 受容体に関する B o N T / A の平衡解離定数 (K D) が、細胞表面の任意のその他の受容体に関する B o N T / A のものよりも少なくとも 1 桁小さいことを指す。B o N T / A - B o N T / A 受容体複合体がその構成要素分子、すなわち B o N T / A および B o N T / A 受容体に可逆的に分離 (解離) する傾向を測定する平衡定数の具体的な型である平衡解離定数は、平衡時の $K D = K a / K d$ として定義される。会合定数 (K a) は $K a = [C] / [L] [R]$ として定義され、そして解離定数 (K d) は $K d = [L] [R] / [C]$ として定義され、ここで [L] は B o N T / A のモル濃度に等しく、[R] は B o N T / A 受容体のモル濃度であり、そして [C] は B o N T / A - B o N T / A 受容体複合体のモル濃度であり、そしてここで全ての濃度は系が平衡にあるときのかかる構成要素のものである。解離定数が小さいほど、B o N T / A はその受容体により強固に結合するか、または B o N T / A と B o N T / A 受容体との間の結合アフィニティーがより高くなる。この実施態様の態様では、B o N T / A 受容体に関する B o N T / A の解離定数は、任意のその他の受容体に関する B o N T / A のものよりも少なくとも 2 桁小さく、少なくとも 3 桁小さく、少なくとも 4 桁小さく、または少なくとも 5 桁小さい。この実施態様のその他の態様では、B o N T / A 受容体と優先的に相互作用する B o N T / A の結合アフィニティーは例えば 500 nM 以下、400 nM 以下、300 nM 以下、200 nM 以下または 100 nM 以下の平衡解離定数 (K D) を有し得る。この実施態様のその他の態様では、B o N T / A 受容体と優先的に相互作用する B o N T / A の結合アフィニティーは例えば 90 nM 以下、80 nM 以下、70 nM 以下、60 nM、50 nM 以下、40 nM 以下、30 nM 以下、20 nM 以下または 10 nM 以下の平衡解離定数 (K D) を有し得る。本明細書で使用される際には「B o N T / A 中毒応答を引き出す」なる用語は、B o N T / A 受容体が B o N T / A と相互作用して神経毒 / 受容体複合体を形成し、そして引き続きその複合体が細胞の細胞質へ内部移行する能力を指す。

【0098】

本明細書で使用される際には「天然発生 B o N T / A 受容体」なる用語は、限定するものではないが、翻訳後修飾、選択的スプライシングされた転写物、または自然突然変異から生成される B o N T / A 受容体アイソフォーム、および B o N T / A 受容体サブタイプを含む天然発生過程により生成される任意の B o N T / A 受容体を指す。天然発生 B o N T / A 受容体には、限定するものではないが、「ボツリヌス毒素スクリーニングアッセイ」Ester Fernandez-Salasら、米国特許出願公開第 2008/0003240 号；「ボツリヌス毒素スクリーニングアッセイ」Ester Fernandez-Salasら、米国特許出願公開第 2008/0182799 号；「SV2 はボツリヌス神経毒 A に関するタンパク質受容体である」Min Dongら、Science (2006)；「シナプス性小胞タンパク質 2 C はボツリヌス神経毒 A の横隔神経への取り込みを媒介する」S. Mahrhold et al, FEBS Lett. 580 (8) : 2011-2014 (2006) (その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする) に記載されるものような、芽細胞成長因子受容体 2 (F G F R 2)、線維芽細胞成長因子受容体 3 (F G F R 3)、シナプス性小胞糖タンパク質 2 (S V 2) および G T 1 b 様複合体ガングリオシドが含まれる。天然発生 F G F R 2 には限定するものではないが、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69 および配列番号：70、または配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69 および配列番号：70 から例

例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、もしくは100個以上のアミノ酸を置換、欠失もしくは付加したものが含まれる。天然発生FGFR3には限定するものではないが、配列番号：25、配列番号：26および配列番号：27、または配列番号：25、配列番号：26および配列番号：27から例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、もしくは100個以上のアミノ酸を置換、欠失もしくは付加したものが含まれる。天然発生SV2には限定するものではないが、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30および配列番号：31、または配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30および配列番号：31から例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、もしくは100個以上のアミノ酸を置換、欠失もしくは付加したものが含まれる。

10

【0099】

本明細書で使用される際には「非天然発生BONT/A受容体バリエーション」なる用語は、限定するものではないが、無作為変異誘発または合理的設計を用いて遺伝子操作により生成されたBONT/A受容体、および化学合成により生成されたBONT/A受容体を含む、ヒトの用手操作を援用して生成されたまたは設計された任意のBONT/A受容体を指す。非天然発生BONT/Aバリエーションの非限定例には、例えば保存BONT/A受容体バリエーション、非保存BONT/A受容体バリエーション、BONT/A受容体キメラバリエーションおよび活性なBONT/A受容体フラグメントが含まれる。

20

【0100】

本明細書で使用される際には「非天然発生BONT/A受容体」なる用語は、限定するものではないが、無作為変異誘発または合理的設計を用いて遺伝子操作により生成されたBONT/A受容体、およびインビトロ化学合成により生成されたBONT/A受容体を含む、その構造がヒトの用手操作を援用して修飾された任意のBONT/A受容体を指す。非天然発生BONT/A受容体の非限定例は例えば「ボツリヌス毒素スクリーニングアッセイ」Ester Fernandez-Salasら、米国特許出願公開第2008/0003240号；「ボツリヌス毒素スクリーニングアッセイ」Ester Fernandez-Salasら、米国特許出願公開第2008/0182799号（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。非天然発生BONT/A受容体は配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70からの例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上のアミノ酸を置換、欠失または付加できる。

30

【0101】

故に実施態様では、BONT/A受容体は例えばFGFR2、FGFR3またはSV2のような天然発生BONT/A受容体である。この実施態様の態様では、BONT/A受容体はBONT/A受容体アイソフォームまたはBONT/A受容体サブタイプである。この実施態様の態様では、天然発生BONT/A受容体は配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70の天然発生BONT/A受容体である。この実施態様のその他の態様ではBONT/A受容体は、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配

40

50

列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70と例えば少なくとも70%のアミノ酸同一性、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する天然発生BONT/A受容体である。

【0102】

別の実施態様では、BONT/A受容体は例えば遺伝子操作されたFGFR2、遺伝子操作されたFGFR3または遺伝子操作されたSV2のような非天然発生BONT/A受容体である。この実施態様のその他の態様ではBONT/A受容体は、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70と例えば少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する非天然発生BONT/A受容体である。この実施態様のその他の態様ではBONT/A受容体は、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70に相対して例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の非隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生BONT/A受容体である。この実施態様のなおその他の態様ではBONT/A受容体は、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70に相対して例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生BONT/A受容体である。

【0103】

BONT/A受容体は内因性BONT/A受容体または外因性BONT/A受容体でよい。本明細書で使用される際には「内因性BONT/A受容体」なる用語は、それが細胞のゲノム内で天然にコードされるので、BONT/A受容体の外部供給源またはBONT/A受容体をコードする遺伝材料の外部供給源を必要とせずに細胞が生来的にBONT/A受容体を発現するように細胞に天然に存在するBONT/A受容体を指す。内因性BONT/A受容体の発現は例えば細胞分化またはプロモーター活性化のような環境刺激を伴っても、または伴わなくてもよい。例えば以下の確立された細胞株は少なくとも1つの内因性BONT/A受容体を発現する：BE(2)-M17、Kelly、LA1-55n、N1E-115、N4TG3、N18、Neuro-2a、NG108-15、PC12、SH-SY5Y、SiMaおよびSK-N-BE(2)-C。内因性BONT/A受容体は天然発生BONT/A受容体またはその天然発生バリエーションのみでよい。

【0104】

本明細書で使用される際には「外因性BONT/A受容体」なる用語は、ヒトの用手操作によりBONT/A受容体の外部供給源またはBONT/A受容体をコードする遺伝材料の外部供給源の導入を介して細胞において発現されたBONT/A受容体を指す。外因性BONT/A受容体の発現は例えば細胞分化またはプロモーター活性化のような環境刺激を伴っても、または伴わなくてもよい。非限定例としては、確立された細胞株からの細胞は例えばFGFR2、FGFR3またはSV2のようなBONT/A受容体をコードするポリヌクレオチド分子の一過性の、または安定したトランスフェクションにより1つま

たはそれより多い外因性 B o N T / A 受容体を発現することができる。別の非限定例としては、確立された細胞株からの細胞は、例えば F G F R 2、F G F R 3 または S V 2 のような B o N T / A 受容体のタンパク質トランスフェクションにより 1 つまたはそれより多い外因性 B o N T / A 受容体を発現することができる。外因性 B o N T / A 受容体は天然発生 B o N T / A 受容体もしくはその天然発生バリエーション、または非天然発生 B o N T / A 受容体もしくはその非天然発生バリエーションでよい。

【0105】

故に実施態様では、確立された細胞株からの細胞は内因性 B o N T / A 受容体を発現する。この実施態様の態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性 B o N T / A 受容体は天然発生 B o N T / A 受容体である。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性 B o N T / A 受容体は配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69 または配列番号：70 である。この実施態様のなおさらなる態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性 B o N T / A 受容体は、例えば B o N T / A 受容体アイソフォームまたは B o N T / A 受容体サブタイプのような天然発生 B o N T / A 受容体である。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性 B o N T / A 受容体は、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69 または配列番号：70 と例えば少なくとも 70 % のアミノ酸同一性、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を有する天然発生 B o N T / A 受容体である。

【0106】

別の実施態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して外因性 B o N T / A 受容体を発現するために操作される。この実施態様の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して天然発生 B o N T / A 受容体を発現するために操作される。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69 または配列番号：70 の天然発生 B o N T / A 受容体を発現するために操作される。この実施態様のなおその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して例えば B o N T / A 受容体アイソフォームまたは B o N T / A 受容体サブタイプのような天然発生 B o N T / A 受容体を発現するために操作される。この実施態様のさらにその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69 または配列番号：70 と例えば少なくとも 70 % のアミノ酸同一性、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を有する天然発生 B o N T / A 受容体を発現するために操作される。

【0107】

実施態様の別の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して非天然発生 B o N T / A 受容体を発現するために操作される。この実施態様のその他の態様

では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70と例えば少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する非天然発生BONT/A受容体を発現するために操作される。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70に相対して例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の非隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生BONT/A受容体を発現するために操作される。この実施態様のなおその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70に相対して例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生BONT/A受容体を発現するために操作される。

10

20

【0108】

別の実施態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して外因性FGFR2、外因性FGFR3、外因性SV2または任意のその組み合わせを発現するために操作される。この実施態様の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して天然発生FGFR2、天然発生FGFR3、天然発生SV2または任意のその組み合わせを発現するために操作される。この実施態様のなおその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して非天然発生FGFR2、非天然発生FGFR3、非天然発生SV2または任意のその組み合わせを発現するために操作される。この実施態様のさらにその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して天然発生FGFR2もしくは非天然発生FGFR2、天然発生FGFR3もしくは非天然発生FGFR3、天然発生SV2もしくは非天然発生SV2、または任意のその組み合わせを発現するために操作される。

30

【0109】

毒素取り込みに関する直接的および間接的アッセイを含む常法により、1つまたはそれより多い内因性または外因性BONT/A受容体を発現する細胞を同定することができる。BONT/A結合または取り込み特性を決定するアッセイを用いて、細胞がBONT/A受容体を発現しているかどうかを評価することができる。かかるアッセイには、限定するものではないが、例えば[125I]BONT/A、[125I]のような標識BONT/Aを使用する架橋アッセイが含まれ、例えば「クロストリジウムボツリヌスC型神経毒の様々な神経芽細胞腫細胞株への結合」Noriko Yokosawa et al., Infect. Immun. 57 (1) : 272-277 (1989) ; 「ボツリヌスC1、DおよびE型神経毒のニューロン細胞株およびシナプトソームへの結合」Noriko Yokosawa et al. Toxicon 29 (2) : 261-264 (1991) ; および「ラット脳シナプトソームにおけるクロストリジウムボツリヌスB型神経毒に関するタンパク質受容体の同定」Tei-ichi Nishiki et al., J. Biol. Chem. 269 (14) : 10498-10503 (1994) を参照されたい。その他の非限定的なアッセイには、標識または未標識抗体を使用してBONT/A結合を検出する免疫細胞化学アッセイ（例えば「

40

50

クロストリジウムボツリヌスC型前駆体毒素のHT-29細胞への内部移行のための受容体およびトランスポーター」Atsushi Nishikawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 319 (2) : 327-333 (2004) 参照) および標識または未標識抗体を使用して結合毒素を検出する免疫沈降アッセイ (例えば「腸上皮細胞および赤血球に関するクロストリジウムボツリヌスC型前駆体毒素の結合サブコンポーネントの分子特徴付け」Yukako Fujinaga et al., Microbiology 150 (Pt 5) : 1529-1538 (2004) 参照) が含まれる。これらのアッセイに有用な抗体には、限定するものではないが、BoNT/Aに対して選択された抗体、例えばFGFR2、FGFR3もしくはSV2のようなBoNT/A受容体に対して選択された抗体、および/または例えばGD1a、GD1b、GD3、GQ1bもしくはGT1bのようなガングリオシドに対して選択された抗体が含まれる。抗体が標識されている場合、当業者に周知の技術を用いて、ウェスタンブロット分析、抗体の細胞位置の直接顕微鏡的観察、洗浄工程、フローサイトメトリー、電気泳動またはキャピラリー電気泳動後の細胞または基質結合抗体の測定を含む種々の手段により分子の結合を検出することができる。抗体が未標識である場合、結合分子の間接的検出のための標識二次抗体を用いることができ、そして標識抗体に関するよう検出を進めることができる。BoNT/A取り込み特性または特徴を決定するこれらのおよび類似のアッセイが内因性または外因性またはBoNT/A受容体を発現する細胞を同定するのに有用であり得るということは理解される。

【0110】

BoNT/Aへの暴露の後の分子の放出をモニタリングするアッセイを用いて、細胞が1つまたはそれより多い内因性または外因性BoNT/A受容体を発現しているかどうかを評価することもできる。これらのアッセイでは、BoNT/A処理の後、BoNT/A受容体を発現している細胞において分子の放出の阻止が生じるであろう。周知のアッセイには、ニューロンからの例えば[3H] ノルアドリナリンまたは[3H] ドーパミン放出のような放射標識カテコラミン放出の阻止を測定する (例えば「破傷風毒素およびボツリヌス毒素F型に感度が低いカルシウム依存性小胞伝達物質放出に関する証拠」A Fassio et al., Neuroscience 90 (3) : 893-902 (1999) ; および「カテコラミン放出のボツリヌス毒素C1およびEに対する感度により容易に放出可能なプールに設定された小胞の選択的なターゲティングが示唆される」Sara Stigliani et al., J. Neurochem. 85 (2) : 409-421 (2003) 参照) または蛍光定量的な手順を用いてカテコラミン放出を測定する (例えば「エクトアクセプター (ecto-acceptors) に結合し、そして細胞内伝達物質放出を阻止する毒素誘導体により表されるボツリヌス神経毒Aの内部移行における鎖間ジスルフィドまたその関与するチオール役割」Anton de Paiva et al., J. Biol. Chem. 268 (28) : 20838-20844 (1993) ; 「ボツリヌス毒素AまたはBによる25 kDaのシナプトソーム関連タンパク質 (SNAP-25) またはシナプトブレブリンの切断後のインタクトな、および透過処理されたクロム親和性細胞の明確なエキソサイトーシス応答」Gary W. Lawrence et al., Eur. J. Biochem. 236 (3) : 877-886 (1996) ; および「インタクトな、および透過処理されたクロム親和性細胞においてボツリヌス神経毒C1はシンタキシンおよびSNAP-25の双方を切断する：カテコラミン放出のその遮断との相関」Patrick Foran et al., Biochemistry 35 (8) : 2630-2636 (1996) 参照) 方法が含まれる。その他の非限定例には、例えば下垂体前葉細胞または卵巣細胞のような内分泌細胞からのホルモン放出の阻止を測定するアッセイが含まれる。分子放出に関するこれらのおよび類似のアッセイが内因性または外因性またはBoNT/A受容体を発現する細胞を同定するのに有用であり得るということは理解される。

【0111】

BoNT/Aへの暴露の後にBoNT/A基質の切断を検出するアッセイを用いて、細胞が1つまたはそれより多い内因性または外因性BoNT/A受容体を発現しているかどうかを評価することもできる。これらのアッセイでは、BoNT/A処理後、BoNT/A受容体を発現する細胞においてBoNT/A基質切断生成物の作成またはインタクトなBoNT/A基質の消失を検出する。特異的ウェスタンブロット分析の非限定例、ならび

に十分に特徴付けされた試薬、条件およびプロトコルを、限定するものではないが、Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI; および Stratagene, Inc., La Jolla, CA. を含む商業的な製造供給元から容易に入手可能である。B o N T / A 基質切断に関するこれらのおよび類似のアッセイは、内因性または外因性 B o N T / A 受容体を発現する細胞を同定するのに有用であり得る。

【0112】

非限定例としては、B o N T / A S N A P - 2 5 切断生成物または S N A P - 2 5 の切断および未切断双方の形態を認識する抗体を使用するウェスタンブロット分析を用いて B o N T / A の取り込みに関して検定することができる。これらのアッセイに有用な α - S N A P - 2 5 抗体の実例には、限定するものではないが、S M I - 8 1 α - S N A P - 2 5 マウスモノクローナル抗体 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD)、C I 7 1 . 1 マウス α - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、C I 7 1 . 2 α - S N A P - 2 5 マウスモノクローナル抗体 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、S P 1 2 α - S N A P - 2 5 マウスモノクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, MA)、 α - S N A P - 2 5 ウサギポリクローナル抗血清 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、 α - S N A P - 2 5 ウサギポリクローナル抗血清 S 9 6 8 4 (Sigma, St Louis, MO) および α - S N A P - 2 5 ウサギポリクローナル抗血清 (Abcam, Cambridge, MA) が含まれる。

【0113】

本開示の態様は、遺伝子用手操作または組換え操作を介して外因性 S N A P - 2 5 および / または 1 つもしくはそれより多い外因性 B o N T / A 受容体を発現するように作られた細胞を提供する。遺伝子用手操作または組換え操作を介して外因性 S N A P - 2 5 および / または 1 つもしくはそれより多い外因性 B o N T / A 受容体を発現するのに有用な細胞には、内因性 S N A P - 2 5 および / または 1 つもしくはそれより多い内因性 B o N T / A 受容体を発現しても、またはしなくてもよいニューロン細胞および非ニューロン細胞が含まれる。かかる遺伝子用手操作または組換え操作された細胞は構成的、組織特異的、細胞特異的または誘導プロモーターエレメント、エンハンサーエレメントまたは双方の制御下で外因性 S N A P - 2 5 および 1 つまたはそれより多い外因性 B o N T / A 受容体を発現できることはさらに理解される。外因性 S N A P - 2 5 および / または 1 つもしくはそれより多い外因性 B o N T / A 受容体を発現するように細胞を遺伝子用手操作または組換え操作することができる限り、任意の細胞が有用であり、そして B o N T / A 中毒を起こすことが可能であることは理解される。

【0114】

それにより B o N T / A がタンパク質分解により例えば S N A P - 2 5、F G F R 2、F G F R 3 または S V 2 のような S N A P - 2 5 基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために、細胞に必要な構成要素をコードする外因性ポリヌクレオチド分子を細胞へ導入するために有用な方法には、限定するものではないが、例えばリン酸カルシウム媒介、ジエチルーアミノエチル (D E A E) デキストラン媒介、脂質媒介、ポリエチレンイミン (P E I) 媒介、ポリリジン媒介およびポリブレン媒介のような化学媒介分配方法; 例えばバイオリスティック粒子分配、マイクロインジェクション、プロトプラスト融合およびエレクトロポレーションのような物理学媒介方法; ならびに例えばレトロウイルス媒介トランスフェクションのようなウイルス媒介分配方法が含まれ、例えば「クローン化された遺伝子の培養哺乳動物細胞への導入」Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. pp. 16.1-16.62 (2001); 「哺乳動物細胞における外来遺伝子の移行および発現」Alessia Colosimo et al., Biotechniques 29 (2): 314-318, 320-322, 324 (2000); 「ニューロンへの遺伝子移入のための技術」Philip Washbourne & A. Kimberley McAllister, Philip Washbourne & A. Kimberley McAllister, Curr. Opin. Neurobiol. 12 (5): 566-573 (2002); および Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, pp 9.16.4-9.16.11 (2000) (その各々をそ

の全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする)を参照されたい。ポリヌクレオチド分子を細胞に導入するための具体的な方法の選択は一部では、それによりB o N T / Aがタンパク質分解によりS N A P-25基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な構成要素を、細胞が一過性に、または安定して含有するかどうかに依存することは当業者には理解される。それによりB o N T / Aがタンパク質分解によりS N A P-25基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な構成要素をコードするポリヌクレオチド分子の非限定例は以下のとおりである：配列番号：130、配列番号：131、配列番号：132、配列番号：133、配列番号：134、配列番号：135、配列番号：136、配列番号：137または配列番号：138のF G F R 2ポリヌクレオチド分子；配列番号：139、配列番号：140または配列番号：141のF G F R 3ポリヌクレオチド分子；配列番号：142、配列番号：143または配列番号：144のS V 2ポリヌクレオチド分子；および配列番号：145または配列番号：146のS N A P-25ポリヌクレオチド分子。

10

【0115】

化学媒介分配方法は当業者に周知であり、そして例えば「リン酸カルシウムによる接着および懸濁細胞のトランスフェクション」Martin Jordan & Florian Worm, Methods 33 (2) : 136-143 (2004) ; 「脳由来細胞へのプラスミド分配のためのポリエチレンジイミン計画」Chun Zhang et al., Methods 33 (2) : 144-150 (2004) (その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする)に記載される。かかる化学媒介分配方法を標準的な手順により調製することができ、そして市販により入手可能であり、例えばCell Phectトランスフェクションキット (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) ; 哺乳動物トランスフェクションキット、リン酸カルシウムおよびD E A E デキストラン (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) ; Lipofectamine (商標) トランスフェクション試薬 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) ; ExGen 500トランスフェクションキット (Fermentas, Inc., Hanover, MD) およびSuperFectおよびEffecteneトランスフェクションキット (Qiagen, Inc., Valencia, CA) を参照されたい。

20

【0116】

物理学媒介方法は当業者に周知であり、そして例えば「バイオリスティックス技術を用いるニューロンにおけるプラスミド媒介遺伝子移入」Jeike E. Biewenga et al., J. Neurosci. Methods. 71 (1) : 67-75 (1997) ; 「バイオリスティックおよびジオリスティックトランスフェクション：遺伝子銃を使用してD N Aおよび親油性色素を哺乳動物細胞に分配する」John O'Brinen & Sarah C. R. Lummis, Methods 33 (2) : 121-125 (2004) ; 「インビトロおよびインビボ電場媒介透過処理、遺伝子移入および発現」M. Golzio et al., Methods 33 (2) : 126-135 (2004) ; および「初代細胞への遺伝子移入のための新しい非ウイルス方法」Oliver Greschet al., Methods 33 (2) : 151-163 (2004) (その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする)に記載される。

30

【0117】

ウイルス媒介分配方法は当業者に周知であり、そして例えば「アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスベクター」Chooi M. Lai et al., DNA Cell Biol. 21 (12) : 895-913 (2002) ; 「アルファウイルス基盤発現ベクター：計画および適用」Ilya Frolov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (21) : 11371-11377 (1996) ; 「D N Aの哺乳動物への分配のためのレンチウイルスベクター」Roland Wolkowicz et al., Methods Mol. Biol. 246 : 391-411 (2004) ; 「バキュロウイルスベクター：新規哺乳動物細胞遺伝子分配ベヒクルおよびその適用」A. Huser & C. Hofmann, Am. J. Pharmacogenomics 3 (1) : 53-63 (2003) ; 「哺乳動物細胞の形質導入のためのレトロウイルスおよびレンチウイルス基盤ベクターの一過性生成」Tiziana Tonini et al., Methods Mol. Biol. 285 : 141-148 (2004) ; 「テトラサイクリン応答プロモーターによる真核細胞における遺伝子発現の厳格な制御」Manfred GossenおよびHermann Bujard、米国特許第5464758号 ; 「遺伝子発現を調節するための方法」Hermann BujardおよびManfred Gossen、米国特

40

50

許第5814618号；「昆虫ステロイドホルモン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび同一物で形質転換された細胞」David S. Hogness、米国特許第5514578号；「昆虫エクジソン受容体をコードするポリヌクレオチド」David S. Hogness、米国特許第6245531号；「C末端ホルモン結合ドメイントランケーションを有するプロゲステロン受容体」Elisabetta Vegetoら、米国特許第5364791号；「変異したステロイドホルモン受容体、その使用のための方法および遺伝子治療のための分子スイッチ」Elisabetta Vegetoら、米国特許第5874534号（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。かかるウイルス媒介分配方法を標準的な手順により調製することができ、そして市販により入手可能であり、例えばViraPower（商標）アデノウイルス発現系（Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA）およびViraPower（商標）アデノウイルス発現系説明マニュアル25-0543バージョンA、Invitrogen, Inc.（2002年6月15日）；ならびにAdEasy（商標）アデノウイルスベクター系（Stratagene, Inc., La Jolla, CA）およびAdEasy（商標）アデノウイルスベクター系説明マニュアル064004f（Stratagene, Inc.）を参照されたい。さらにかかるウイルス媒介分配系を標準的な方法により調製することができ、そして市販により入手可能であり、例えばBD（商標）Tet-OffおよびTet-On遺伝子発現系（BD Biosciences-Clonetechnology, Palo Alto, CA）およびBD（商標）Tet-OffおよびTet-On遺伝子発現系ユーザーマニュアルPT3001-1（BD Biosciences Clonetechnology）（2003年3月14日）、GeneSwitch（商標）系（Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA）および哺乳動物細胞のためのGeneSwitch（商標）系Aミフェプリストン調節発現系バージョンD、25-0313（Invitrogen, Inc.）（2002年11月4日）；ViraPower（商標）レンチウイルス発現系（Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA）およびViraPower（商標）レンチウイルス発現系説明マニュアル25-0501バージョンE（Invitrogen, Inc.）（2003年12月8日）；ならびにComplete Control（登録商標）レトロウイルス誘導哺乳動物発現系（Stratagene, La Jolla, CA）およびComplete Control（登録商標）レトロウイルス誘導哺乳動物発現系説明マニュアル064005eを参照されたい。

【0118】

故に実施態様では、B o N T / A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、それによりB o N T / Aがタンパク質分解によりS N A P-25基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な構成要素をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。別の実施態様では、B o N T / A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、それによりB o N T / Aがタンパク質分解によりS N A P-25基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な複数の構成要素をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。この実施態様の態様では、B o N T / A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、F G F R 2、F G F R 3、S V 2またはS N A P-25をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。この実施態様の態様では、B o N T / A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：130、配列番号：131、配列番号：132、配列番号：133、配列番号：134、配列番号：135、配列番号：136、配列番号：137または配列番号：138のF G F R 2をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。この実施態様のその他の態様では、B o N T / A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：139、配列番号：140または配列番号：141のF G F R 3をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。この実施態様のなおその他の態様では、B o N T / A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：142、配列番号：143または配列番号：144のS V 2をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。この実施態様のなおその他の態様では、B o N T / A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：145または配列番号：146のS N A P-25をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。

【0119】

別の実施態様では、B o N T / A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、

それにより B o N T / A がタンパク質分解により S N A P - 2 5 基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な構成要素をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。別の実施態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、それにより B o N T / A がタンパク質分解により S N A P - 2 5 基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な複数の構成要素をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。この実施態様の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は F G F R 2、F G F R 3、S V 2 または S N A P - 2 5 をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。この実施態様の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：130、配列番号：131、配列番号：132、配列番号：133、配列番号：134、配列番号：135、配列番号：136、配列番号：137 または配列番号：138 の F G F R 2 をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。この実施態様のその他の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は配列番号：139、配列番号：140 または配列番号：141 の F G F R 3 をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。この実施態様のなおその他の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：142、配列番号：143 または配列番号：144 の S V 2 をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。この実施態様のなおその他の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：145 または配列番号：146 の S N A P - 2 5 をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。

【0120】

前記で言及したように、それにより B o N T / A がタンパク質分解により例えば本明細書に開示される S N A P - 2 5、F G F R 2、F G F R 3 または S V 2 のような S N A P - 2 5 基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な、外因性構成要素を細胞に導入することができる。かかる外因性構成要素を分配剤と共に細胞集団に導入するために有用な任意のおよび全ての方法は、この方法が所定の細胞集団内の細胞の少なくとも 50% に本明細書に開示される外因性構成要素を一過性に導入するという条件で有用であり得る。故にこの実施態様の態様は所定の細胞集団の例えば少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80% または少なくとも 90% が、それにより B o N T / A がタンパク質分解により例えば本明細書に開示される S N A P - 2 5、F G F R 2、F G F R 3 または S V 2 のような S N A P - 2 5 基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な外因性構成要素を一過性に含有する細胞集団を含み得る。本明細書で使用される際には「分配剤」なる用語は、共有結合で連結された、非共有結合で連結された、または任意のその他の様式で随伴されたポリペプチドの細胞への内部移行を可能に、または増強する任意の分子を指す。故に「分配剤」なる用語は、限定するものではないが、タンパク質、ペプチド、ペプチド擬似物質、小型分子、ポリヌクレオチド分子、リポソーム、脂質、ウイルス、レトロウイルスおよび限定するものではないが、共有結合で、または非共有結合で連結された分子を細胞膜、細胞の細胞質または核に輸送する細胞を包含する。「分配剤」なる用語が受容体媒介エンドサイトーシスを介して機能する分配剤および受容体媒介エンドサイトーシスとは独立しているものを含む任意のメカニズムにより内部移行する分子を包含することはさらに理解される。

【0121】

分配剤は例えば化学的抱合または遺伝子的に生成された融合タンパク質によるように、共有結合で連結された F G F R 2、F G F R 3、S V 2 または S N A P - 2 5 様の構成要素の細胞取り込みを可能に、または増強する薬剤でもよい。分配剤に共有結合で連結する方法およびかかる薬剤を使用する方法は例えば「タンパク質形質導入系およびその使用方法」Steven F. Dowdy、国際公開第 W O 0 0 / 3 4 3 0 8 号；「活性分子の細胞内アドレッシングのためのベクターとして使用することができるペプチド」Gerard Chassaing および Alain Prochiantz、米国特許第 6 0 8 0 7 2 4 号；「T A T 由来の輸送部分を含んでなる融合タンパク質」Alan Frankel ら、米国特許第 5 6 7 4 9 8 0 号；「T A T 由来の輸送

ポリペプチド抱合体」Alan Frankelら、米国特許第5747641号；「TAT由来の輸送ポリペプチドおよび融合タンパク質」Alan Frankelら、米国特許第5804604号；「輸送タンパク質の使用」Peter F. J. O'Hareら、米国特許第6734167号；「生物学的に活性な分子の細胞への移入のための方法」Yao-Zhong LinおよびJack J. Hawiger、米国特許第5807746号；「生物学的に活性な分子の細胞への移入のための方法」Yao-Zhong LinおよびJack J. Hawiger、米国特許第6043339号；「細胞膜転位置活性を有するタンパク質の遺伝子操作のための配列および方法」Yao-Zhong Linら、米国特許第6248558号；「細胞膜転位置活性を有するタンパク質の遺伝子操作のための配列および方法」Yao-Zhong Linら、米国特許第6432680号；「生物学的に活性な分子の細胞への移入のための方法」Jack J. Hawigerら、米国特許第6495518号；「細胞膜転位置活性を有するタンパク質の遺伝子操作のための配列および方法」Yao-Zhong Linら、米国特許第6780843号；「生物学的膜をわたる輸送を増強するための方法および組成物」Jonathan B. RothbardおよびPaul A Wender、米国特許第6306993号；「生物学的膜をわたる輸送を増強するための方法および組成物」Jonathan B. RothbardおよびPaul A Wender、米国特許第6495663号；ならびに「タンパク質分配のための融合タンパク質」Pamela B. Davisら、米国特許第6287817号（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。

10

【0122】

分配剤はFGFR2、FGFR3、SV2またはSNAP-25様の非共有結合で随伴された構成要素の細胞取り込みを可能に、または増強する薬剤でもよい。共有結合連結の不在で機能する方法およびかかる薬剤を使用する方法は例えば「ペプチド媒介トランスフェクション剤および使用の方法」Gilles Divitaら、米国特許第6841535号；「細胞内タンパク質分配組成物および使用の方法」Philip L FelgnerおよびOlivier Zelphati、米国特許出願公開第2003/0008813号；ならびに「小型分子、タンパク質および核酸の細胞内分配」Michael Karas、米国特許出願公開第2004/0209797号（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。かかるペプチド分配剤を標準的な方法により調製および使用することができ、そして市販により入手可能であり、例えばCHARIOT（商標）試薬（Active Motif, Carlsbad, CA）；BIO-PORTER（登録商標）試薬（Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA）、BIO TREK（商標）タンパク質分配試薬（Stratagene, La Jolla, CA）およびPRO-JECT（商標）タンパク質トランスフェクション試薬（Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL）を参照されたい。

20

30

【0123】

本開示の態様は一部ではBONT/Aを含んでなる試料を含んでなる。本明細書で使用する際には「BONT/Aを含んでなる試料」なる用語は活性なBONT/Aを含有するかまたは潜在的に含有する任意の生物学的物質を指す。限定するものではないが、精製された、部分的に精製されたまたは未精製のBONT/A；天然または非天然発生配列を有する組換え一本鎖または二鎖毒素；修飾されたプロテアーゼ特異性を有する組換えBONT/A；改変された細胞特異性を有する組換えBONT/A；バルクBONT/A；例えばBOTOX（登録商標）、DYSPORT（登録商標）／RELOXIN（登録商標）、XEOMIN（登録商標）、PURTOX（登録商標）、NEURONOX（登録商標）、BTX-Aを含む処方されたBONT/A生成物、および；例えば細菌、酵母、昆虫または哺乳動物供給源からの細胞または粗製、分画化もしくは部分的に精製された細胞ライゼート；血液、血漿または血清；生の、調理された、部分的に調理されたまたは加工された食物；飲料；動物飼料；土壌試料；水試料；池底質；ローション；化粧品；ならびに臨床処方物を含む種々の試料を本明細書に開示される方法に従って検定することができる。試料なる用語は限定するものではないが、哺乳動物組織試料、ヒツジ、ウシおよびブタ組織試料のような家畜組織試料；霊長類組織試料；ならびにヒト組織試料を含む組織試料を包含することは理解される。かかる試料は限定するものではないが、乳児腸試料のような腸試料、および創傷から得られた組織

40

50

試料を包含する。非限定例としては、ピコモル濃度量の B o N T / A 活性を検出する方法は、食物もしくは飲料試料中の B o N T / A の存在もしくは活性を決定するために；例えば B o N T / A に暴露された、または 1 つもしくはそれより多いボツリヌス症の病徴を有するヒトもしくは動物からの試料を検定するために；バルク B o N T / A の生成および精製の間の活性を追跡するために；医薬用もしくは化粧用適用において使用される処方された B o N T / A 生成物を検定するために；または α -B o N T / A 中和抗体の存在または不在に関して対象の血清を検定するために；有用であり得る。

【0124】

故に実施態様では、B o N T / A を含んでなる試料は任意の量の B o N T / A を含んでなる試料である。この実施態様の態様では、B o N T / A を含んでなる試料は約 100 ng 以下、約 10 ng 以下、約 1 ng 以下、約 100 pg 以下、約 10 pg 以下または約 1 pg 以下の B o N T / A を含んでなる。この実施態様のその他の態様では、B o N T / A を含んでなる試料は約 1 μ M 以下、約 100 nM 以下、約 10 nM 以下、約 1 nM 以下、約 100 pM 以下、約 10 pM 以下、約 1 pM 以下、約 100 fM 以下、約 10 fM 以下または約 1 fM 以下の B o N T / A を含んでなる。

【0125】

本開示の態様は一部では処理された細胞から、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-25 を含んでなる S N A P-25 構成要素を単離することを含んでなる。本明細書で使用される際には「B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-25 を含んでなる S N A P-25 構成要素」なる用語は、S N A P-25 切断生成物を含有する細胞構成要素を指す。限定するものではないが、細胞溶解プロトコール、スピнкаラム精製プロトコール、免疫沈降、アフィニティー精製およびタンパク質クロマトグラフィーを含む、S N A P-25 構成要素を富化または単離するために適当な任意の方法が有用であり得るということは想定される。

【0126】

本開示の態様は一部では固相支持体に連結された α -S N A P-25 抗体を含んでなる。本明細書で使用される際には「固相支持体」なる用語は「固相」と同義であり、そして本明細書において開示される α -S N A P-25 抗体の固定のために使用することができる任意のマトリックスを指す。固相支持体の非限定例には、例えばチューブ；プレート；カラム；ピンまたは「ディップスティック」；磁性粒子、ビーズまたは例えばアガロース、セファロース、シリカおよびプラスチックのようなその他の球状もしくは繊維状のクロマトグラフィー媒質；ならびに例えばニトロセルロースおよびポリフッ化ビニリデン（P V D F）のようなシートまたは膜が含まれる。例えばガラス、炭素、ポリスチレン、塩化ポリビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、ジアゾセルロースまたはデンプンのような多様な材料を使用して固相支持体を構築することができる。選択される固相支持体は、可溶性または未結合材料からそれを容易に分離させる物理学的特性を有し得て、そして一般に例えば過剰の試薬、反応副産物または溶媒のような未結合材料を（例えば洗浄、濾過、遠心等により）固相支持体結合アッセイ構成要素から分離またはそうでなければ除去することを可能にする。固相支持体の作成および使用の仕方の非限定例は例えば Molecular Cloning, A Laboratory Manual, supra, (2001)；および Current Protocols in Molecular Biology, supra, (2004)（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。

【0127】

本開示の態様は一部では B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-25 エピトープに選択的に結合する α -S N A P-25 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-25 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出することを含んでなる。シグナル対ノイズ比がバックグラウンドシグナルからの、抗体-抗原複合体からのシグナルを統計的に有意な程度まで区別することができるという条件で、任意の検出系を使用してこ

の開示された免疫基盤の方法の態様を実行できるということは想定される。免疫基盤の検出系の非限定例には、ウェスタンブロッティングおよびドットブロッティング様の免疫ブロット分析、免疫沈降分析、酵素結合性免疫吸着分析（E L I S A）およびサンドイッチ E L I S A が含まれる。撮像またはリン光体撮像を伴うオートラジオグラフィ（A U）、化学発光（C L）、電気化学発光（E C L）、生物発光（B L）、蛍光、共鳴エネルギー転移、平面偏光、比色分析またはフローサイトメトリー（F C）を用いてシグナルの検出を達成することができる。免疫基盤の検出系の記載は例えば「化学発光」Michael M. Rauhut, Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3rd ed, John Wiley and Sons, 1985) ; 「電気化学発光の分析適用における最近の動向の概説」A. W. Knight, Trends Anal. Chem. 18 (1) : 47-62 (1999) ; 「化学分析における電気化学発光の最近の適用」K.A. Fahrnich et al. Talanta 54 (4) : 531-559 (2001) ; 「分子クローニングにおいて一般的に使用される技術」pp. A8.1-A8-55 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001) ; 「検出系」pp. A9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001) ; Electrogenenerated Chemiluminescence (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004) (その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする) に開示される。

10

【0128】

サンドイッチ E L I S A (またはサンドイッチイムノアッセイ) は抗原上の異なるエピトープに結合する2つの抗体に基づく方法である。目的の抗原に関して高い結合特異性を有する捕捉抗体は固体表面に結合している。次いで抗原を添加し、続いて検出抗体と称される第2の抗体を添加する。検出抗体は捕捉抗体とは異なるエピトープに抗原を結合する。それ故に抗原は2つの抗体の間で「サンドイッチされる」。抗原に関する抗体結合アフィニティーは通常イムノアッセイ感度の主な決定要因である。抗原濃度が増大するにつれて、検出抗体の量は増大して、測定される応答はより高度に至る。結合の程度を定量するために、例えば二次抗体およびレポーター基質に付着した酵素のような異なるレポーター系を使用することができ、ここで酵素反応は検出シグナルとして読み出しされる。作成されたシグナルは試料中に存在する標的抗原の量に比例する。結合事象を測定するために使用されるレポーター基質が検出形式を決定する。分光光度プレートリーダーを比色検出に使用する。さらにシグナルを増幅し、そして発光リーダーで読み取ることができる化学発光および電気化学発光基質が開発されている。レポーターはまた蛍光読み出しでもよく、ここでアッセイの酵素工程をフルオロフォアで置き換え、そして次いで蛍光リーダーを使用して読み出しを測定する。例外なく M S D サンドイッチ E L I S A - E C L 検出プラットフォーム (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) を含む E C L サンドイッチ E L I S A を実施するために必要な試薬およびプロトコールは市販により入手可能である。

20

30

【0129】

故に実施態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在の検出を、免疫ブロット分析、免疫沈降分析、E L I S A またはサンドイッチ E L I S A を使用して実施することができる。この実施態様の態様では、A U、C L、E C L もしくは B L 免疫ブロット分析、A U、C L、E C L、B L もしくは F C 免疫沈降分析、A U、C L、E C L、B L もしくは F C E L I S A、または A U、C L、E C L、B L もしくは F C サンドイッチ E L I S A を使用して検出を実施する。

40

【0130】

シングルプレックスまたはマルチプレックス様式で本開示の態様を実行することができる。シングルプレックス様式で実行される B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法は、 α - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在のみ

50

を検出するものである。マルチプレックス様式で実行される B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法は、1つまたはそれより多い抗体-抗原複合体の存在を同時発生的に検出するものであり；その1つは α -S N A P-25抗体およびB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P-25切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体であり；そして（複数の）その他のものは第2、第3、第4等の異なるタンパク質に対する抗体-抗原複合体である。例えば検出される α -S N A P-25 / S N A P-25抗体-抗原複合体の量を、第2のタンパク質に関して検出される抗体-抗原複合体の量に対して正規化することにより試料対試料変動性を最小化する内部対照として第2のタンパク質を使用することができる。そのように、第2のタンパク質は通常ハウスキーピングタンパク質のような、細胞により一貫して発現されるものである。有用な第2のタンパク質の非限定例には、例えばグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（G A P D H）、シンタキシン、サイトカインが含まれる。マルチプレックス様式で免疫基盤のアッセイを実施する方法は例えば「マイクロアレイ形式のマルチプレックスサンドイッチアッセイ」U. B. Nielsen and B. H. Geierstanger, J. Immunol. Methods. 290 (1-2) : 107-120 (2004) ; 「抗体アレイを使用する定量的タンパク質プロファイリング」R. Barry and M. Soloviev, Proteomics, 4 (12) : 3717-3726 (2004) ; 「マルチプレックス分子診断学およびエマージングマイクロアレイテクノロジーを用いるイムノアッセイ」M. M. Ling et al., Expert Rev Mol Diagn. 7 (1) : 87-98 (2007) ; 「炎症および加齢研究におけるサイトカイン測定のためのE L I S Aおよびマルチプレクステクノロジー」S. X. Leng et al., J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63 (8) : 879-884 (2008) （その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。

【0131】

故に1つの実施態様では、B o N T / A活性を検出する免疫基盤の方法を、 α -S N A P-25抗体およびB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P-25切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在のみを検出することによりシングルプレックス様式で実行する。別の実施態様では、B o N T / A活性を検出する免疫基盤の方法を、 α -S N A P-25抗体およびB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P-25切断生成物および例えばG A P D HまたはシンタキシンのようなS N A P-25以外のタンパク質に対する少なくとも1つのその他の抗体-抗原複合体を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を同時発生的に検出することによりマルチプレックス様式で実行する。

【0132】

本開示の態様は一部ではB o N T / A免疫抵抗性を決定する方法を提供する。本明細書で使用される際には「B o N T / A免疫抵抗性」なる用語は、その哺乳動物の免疫応答が直接的または間接的のいずれかで治療の有効性を低減するために、B o N T / A治療に対して十分に応答しない、またはB o N T / A治療の有益な効果の低減を示す哺乳動物を意味する。有効性の低減の非限定例は、毒素の特異性または活性を低減または防御する様式でB o N T / A毒素に結合する、少なくとも1つの α -B o N T / A中和抗体の哺乳動物における存在であろう。本明細書で使用される際には「B o N T / A治療」なる用語は、B o N T / A毒素を使用する神経調節を必要とする哺乳動物における何か望ましくないものを相殺する処置、療法、治療、回復、リハビリテーションもしくは任意のその他の手段、または1回もしくはそれより多くの制御された用量の、医学的、治療的、治療的、美容的、療法的もしくは任意のその他の有益な効果を有するB o N T / A毒素の医薬品、調製物もしくは混合物を哺乳動物に投与することを意味する。B o N T / A治療は限定するものではないが、任意の担体または活性成分と組み合わせられ、そして任意の投与経路により投与される任意の処方における任意の天然発生またはその修飾フラグメントの使用を包含する。実例としては周知のB o N T / A治療はBOTOX（登録商標）治療である。

【0133】

本開示の態様は一部では、 α -B o N T / A中和抗体の存在または不在に関して試験中

の哺乳動物から得られる被験試料を提供する。本明細書で使用される際には「被験試料」なる用語は、少なくとも1つの α -B o N T / A抗体を含有するか、または潜在的に含有する任意の生物学的物質を指す。 α -B o N T / A抗体は抗B o N T / A中和抗体または抗B o N T / A非中和抗体でよい。本明細書で使用される際には「抗B o N T / A中和抗体」なる用語は、生理学的条件下で毒素がB o N T / A治療におけるその効果を奏することを低減または防御するような様式でB o N T / A毒素の領域に結合するであろう任意の α -B o N T / A抗体を意味する。本明細書で使用される際には「 α -B o N T / A非中和抗体」なる用語は、生理学的条件下でB o N T / A毒素の領域に結合するが、毒素がB o N T / A治療におけるその効果を奏することを防御しないであろう任意の α -B o N T / A抗体を意味する。限定するものではないが、血液、血漿、血清およびリンパ液を含む α -B o N T / A抗体を含有し得る任意のおよび全ての試料をこの方法において使用することができるということは想定される。加えて限定するものではないが、鳥類ならびにマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ロバ、ウシ、霊長類およびヒトを含む哺乳動物を含む、B o N T / A毒素に対して α -B o N T / A抗体を上昇させることが可能な任意のおよび全ての生物が試料のための供給源として役立ち得る。血液収集および血清調製のための具体的なプロトコルの非限定例は、例えばMarjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, BLOOD COLLECTION IN HEALTHCARE (F.A. Davis Company, 2001) ; および Diana Garza & Kathleen Becan-McBride, PHLEBOTOMY HANDBOOK : BLOOD COLLECTION ESSENTIALS (Prentice Hall, 6th ed., 2002) に記載される。これらのプロトコルは日常的な手順であり、十分に当業者の、およびは本明細書の教示からの範囲内である。B o N T / A毒素に対する暴露の前、単回のB o N T / A処置の後、多回のB o N T / A毒素処置の後、B o N T / A治療に対する抵抗性の発症の前、またはB o N T / A治療に対する抵抗性の発症の後に生物から被験試料を入手することができる。

【0134】

本開示の態様は一部では対照試料を提供する。本明細書で使用される際には「対照試料」なる用語は、被験試料の存在または不在が公知である任意の試料を意味し、そして陰性および陽性対照試料の双方を含む。 α -B o N T / A抗体の中和に関する陰性対照試料は、決してB o N T / Aに暴露されたことがなかった個体から入手することができ、そして限定するものではないが、被験試料を供給する同じ個体からであるが、B o N T / A治療を行う前に取られた試料；B o N T / Aに決して暴露されたことがない異なる個体から取られた試料；B o N T / Aに決して暴露されたことがない複数の異なる個体から取られたプールされた試料；を含み得る。 α -B o N T / A中和抗体に関する陽性対照試料は、B o N T / A免疫抵抗性を顕在化する個体から入手することができ、そして限定するものではないが、患者基盤の試験アッセイで試験して陽性である個体；インビボバイオアッセイで試験して陽性である個体；および超免疫性を示す個体、例えばB o N T / Aワクチン接種された個体を含む。

【0135】

α -B o N T / A抗体を試料から精製できることがさらに予見される。限定するものではないが、プロテインA / Gクロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィーを含む種々の手順を用いて抗B o N T / A抗体を試料から精製することができる。試料から抗体を精製するための具体的なプロトコルの非限定例は例えばANTIBODIES : A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998) ; USING ANTIBODIES : A LABORATORY MANUAL : PORABLE PROTOCOL NO I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998) ; およびMOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, supra, (2001) (出典明示により本明細書の一部とする) に記載される。加えて、抗体精製方法ならびに十分に特徴付けされた試薬、条件およびプロトコルの非限定例は、限定するものではないが、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL ; およびZymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CAを含む商業的な製造供給元から容易に入手可能である。これらのプロトコルは十分に当業者の範囲内である日常的な手順である。

【0136】

故に実施態様では試料は血液を含んでなる。この実施態様の態様では試料はマウス血液、ラット血液、ヤギ血液、ヒツジ血液、ウマ血液、ロバ血液、ウシ血液、霊長類血液またはヒト血液を含んでなる。別の実施態様では試料は血漿を含んでなる。この実施態様の態様では被験試料はマウス血漿、ラット血漿、ヤギ血漿、ヒツジ血漿、ウマ血漿、ロバ血漿、ウシ血漿、霊長類血漿またはヒト血漿を含んでなる。別の実施態様では試料は血清を含んでなる。この実施態様の態様では試料はマウス血清、ラット血清、ヤギ血清、ヒツジ血清、ウマ血清、ロバ血清、ウシ血清、霊長類血清およびヒト血清を含んでなる。別の実施態様では試料はリンパ液を含んでなる。この実施態様の態様では試料はマウスリンパ液、ラットリンパ液、ヤギリンパ液、ヒツジリンパ液、ウマリンパ液、ロバリリンパ液、ウシリンパ液、霊長類リンパ液またはヒトリンパ液を含んでなる。なお別の実施態様では試料は被験試料である。なお別の実施態様では試料は対照試料である。この実施態様の態様では対照試料は陰性対照試料または陽性対照試料である。

10

【0137】

本開示の態様は一部では工程（d）で検出されたB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5の量を工程（e）で検出されたB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5の量と比較することを提供する。実施態様では被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量は、対照試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量と比較して高い。この実施態様の態様では、陽性対照試料と比較して、被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量が多いことは、哺乳動物におけるB o N T / A免疫抵抗性の低減または欠如を示す。この実施態様の別の態様では、陰性対照試料と比較して被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量が均等であることは、哺乳動物におけるB o N T / A免疫抵抗性の低減または欠如を示す。別の実施態様では、対照試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量と比較して、被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量が少ない。この実施態様の態様では、陽性対照試料と比較して、被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量が少ないかまたは均等であることは、哺乳動物におけるB o N T / A免疫抵抗性の増大または存在を示す。この実施態様の別の態様では、陰性対照試料と比較して、被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量が少ないことは、哺乳動物におけるB o N T / A免疫抵抗性の増大または存在を示す。

20

【0138】

試料中のα-B o N T / A中和抗体の存在を検出するのに適当な、例えば直線性アッセイ条件および非直線性アッセイ条件のような任意のおよび全てのアッセイ条件は本明細書に開示される方法において有用である。実施態様では、アッセイ条件は直線性である。この実施態様の態様では、B o N T / Aのアッセイ量は過剰である。この実施態様の別の態様では、B o N T / Aのアッセイ量は律速である。この実施態様の別の態様では、被験試料のアッセイ量は律速である。

30

【0139】

本開示の態様をまた以下のようにも記載できる： 1. B o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5抗原に連結された可動性リンカーに連結された担体を含んでなる組成物。

40

【0140】

2. B o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基がグルタミンまたはリジンである1の組成物。

【0141】

3. S N A P - 2 5抗原が配列番号：147を含んでなる1の組成物。

【0142】

4. 可動性リンカーおよびS N A P - 2 5抗原アミノ酸配列が配列番号：38または配列番号：46である1の組成物。

【0143】

5. S N A P - 2 5切断生成物からのB o N T / A切断部位切断可能結合からのP₁

50

残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する単離された α -SNAP-25抗体。

【0144】

6. α -SNAP-25抗体がSNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含まないエピトープに関して $1 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満の会合速度定数を有し；そして α -SNAP-25抗体がエピトープに関して 0.450 nM 未満の平衡解離定数を有する5の単離された α -SNAP-25抗体。

【0145】

7. 単離された α -SNAP-25抗体が配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：80および配列番号：82からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変領域；ならびに配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90および配列番号：92からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変領域を有する5の単離された α -SNAP-25抗体。

【0146】

8. 単離された α -SNAP-25抗体が少なくとも配列番号：93の V_H CDR1、配列番号：94の V_H CDR1、配列番号：95の V_H CDR1、配列番号：118の V_H CDR1、配列番号：119の V_H CDR1または配列番号：120の V_H CDR1を含んでなる5の単離された α -SNAP-25抗体。

【0147】

9. 単離された α -SNAP-25抗体が少なくとも配列番号：96の V_H CDR2、配列番号：97の V_H CDR2、配列番号：98の V_H CDR2、配列番号：99の V_H CDR2、配列番号：121の V_H CDR2、配列番号：122の V_H CDR2または配列番号：123の V_H CDR2を含んでなる5の単離された α -SNAP-25抗体。

【0148】

10. 単離された α -SNAP-25抗体が少なくとも配列番号：100の V_H CDR3、配列番号：101の V_H CDR3、配列番号：102の V_H CDR3または配列番号：124の V_H CDR3を含んでなる5の単離された α -SNAP-25抗体。

【0149】

11. 単離された α -SNAP-25抗体が少なくとも配列番号：103の V_L CDR1、配列番号：104の V_L CDR1、配列番号：105の V_L CDR1、配列番号：106の V_L CDR1、配列番号：107の V_L CDR1、配列番号：125の V_L CDR1、配列番号：126の V_L CDR1、配列番号：127の V_L CDR1、配列番号：128の V_L CDR1または配列番号：129の V_L CDR1を含んでなる5の単離された α -SNAP-25抗体。

【0150】

12. 単離された α -SNAP-25抗体が少なくとも配列番号：108の V_L CDR2、配列番号：109の V_L CDR2、配列番号：110の V_L CDR2、配列番号：111の V_L CDR2または配列番号：112の V_L CDR2を含んでなる5の単離された α -SNAP-25抗体。

【0151】

13. 単離された α -SNAP-25抗体が少なくとも配列番号：113の V_L CDR3、配列番号：114の V_L CDR3、配列番号：115の V_L CDR3、配列番号：116の V_L CDR3または配列番号：117の V_L CDR3を含んでなる5の単離された α -SNAP-25抗体。

【0152】

14. 単離された α -SNAP-25抗体が配列番号：93、配列番号：121および配列番号：100を含んでなる重鎖可変領域；ならびに配列番号：105、配列番号：110および配列番号：115を含んでなる軽鎖可変領域を含んでなる5の単離された α -SNAP-25抗体。

【0153】

15. 単離された α -SNAP-25抗体が配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：147または配列番号：148のSNAP-25エピトープに選択的に結合する5の単離された α -SNAP-25抗体。

【0154】

16. 単離された α -SNAP-25抗体が配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43または配列番号：44のSNAP-25エピトープに選択的に結合する5の単離された α -SNAP-25抗体。

【0155】

17. (a) 確立された細胞株からの細胞をBoNT/Aを含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞はBoNT/AによるBoNT/A中毒に感受性が高い；(b) 処理された細胞からBoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25切断生成物を含んでなるSNAP-25構成要素を単離すること；(c) SNAP-25構成要素を α -SNAP-25抗体と接触させること、ここで α -SNAP-25抗体はSNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；ならびに(d) α -SNAP-25抗体およびSNAP-25切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体-抗原複合体による検出はBoNT/A活性の指標である；の工程を含んでなるBoNT/A活性を検出する方法。

【0156】

18. (a) 確立された細胞株からの細胞をBoNT/Aを含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞はBoNT/AによるBoNT/A中毒に感受性が高い；(b) 処理された細胞からBoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25切断生成物を含んでなるSNAP-25構成要素を単離すること；(c) SNAP-25構成要素を固相支持体に連結された α -SNAP-25抗体と接触させること、ここで α -SNAP-25抗体はSNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；ならびに(d) α -SNAP-25抗体およびSNAP-25切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体-抗原複合体による検出はBoNT/A活性の指標である；の工程を含んでなるBoNT/A活性を検出する方法。

【0157】

19. (a) 確立された細胞株からの細胞をBoNT/Aを含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞はBoNT/AによるBoNT/A中毒に感受性が高い；(b) 処理された細胞からBoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25切断生成物を含んでなるSNAP-25構成要素を単離すること；(c) SNAP-25構成要素を固相支持体に固定すること；(d) SNAP-25構成要素を α -SNAP-25抗体と接触させること、ここで α -SNAP-25抗体はSNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；ならびに(e) α -SNAP-25抗体およびSNAP-25切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体-抗原複合体による検出はBoNT/A活性の指標である；の工程を含んでなるBoNT/A活性を検出する方法。

【0158】

20. (a) 確立された細胞株からの細胞をBoNT/Aを含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞はBoNT/Aを取り込むことができる；(b) 処理された細胞からBoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25切断生成物を含んでなるSNAP-25構成要素を単離すること；(c) SNAP-25構成要素を α -SNAP-25抗体と接触させること、ここで

α -S N A P-25 抗体は S N A P-25 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合の P 1 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；ならびに (d) α -S N A P-25 抗体および S N A P-25 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体-抗原複合体による検出は B o N T / A 活性の指標である；の工程を含んでなる B o N T / A 活性を検出する方法。

【0159】

21. (a) 確立された細胞株からの細胞を B o N T / A を含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T / A を取り込むことができる；(b) 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合の P 1 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-25 切断生成物を含んでなる S N A P-25 構成要素を単離すること；(c) S N A P-25 構成要素を固相支持体に連結された α -S N A P-25 抗体と接触させること、ここで α -S N A P-25 抗体は S N A P-25 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合の P 1 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；ならびに (d) α -S N A P-25 抗体および S N A P-25 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体-抗原複合体による検出は B o N T / A 活性の指標である；の工程を含んでなる B o N T / A 活性を検出する方法。

【0160】

22. (a) 確立された細胞株からの細胞を B o N T / A を含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T / A を取り込むことができる；(b) 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合の P 1 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-25 切断生成物を含んでなる S N A P-25 構成要素を単離すること；(c) S N A P-25 構成要素を固相支持体に固定すること；(d) S N A P-25 構成要素を α -S N A P-25 抗体と接触させること、ここで α -S N A P-25 抗体は S N A P-25 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合の P 1 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；ならびに (e) α -S N A P-25 抗体および S N A P-25 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体-抗原複合体による検出は B o N T / A 活性の指標である；の工程を含んでなる B o N T / A 活性を検出する方法。

【0161】

23. (a) α -B o N T / A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料に B o N T / A を添加すること；(b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T / A 中毒に感受性が高い；(c) 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合の P 1 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-25 切断生成物を含んでなる S N A P-25 構成要素を単離すること；(d) S N A P-25 構成要素を α -S N A P-25 抗体と接触させること、ここで α -S N A P-25 抗体は S N A P-25 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合の P 1 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；(e) α -S N A P-25 抗体および S N A P-25 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；(f) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b-e を繰り返すことであって、陰性対照試料は B o N T / A および、 α -B o N T / A 中和抗体を含有しないことが解っている血清を含んでなる；ならびに (g) 工程 e で検出された抗体-抗原複合体の量を工程 f で検出された抗体-抗原複合体の量と比較すること、ここで工程 f で検出された抗体-抗原複合体の量に相対して工程 e で検出された抗体-抗原複合体のより少ない検出量は α -B o N T / A 中和抗体の存在の指標である；の工程を含んでなる哺乳動物における B o N T / A 免疫抵抗性を決定する方法。

【0162】

24. (a) α -B o N T / A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料に B o N T / A を添加すること；(b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T / A 中毒に感受性が高い；(c) 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合の P 1 残基

でカルボキシル末端を有する S N A P-25 切断生成物を含んでなる S N A P-25 構成要素を単離すること；(d) S N A P-25 構成要素を固相支持体に連結された α -S N A P-25 抗体と接触させること、ここで α -S N A P-25 抗体は S N A P-25 切断生成物からの B o N T/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；(e) α -S N A P-25 抗体および S N A P-25 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；(f) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b-e を繰り返すことであって、陰性対照試料は B o N T/A および、 α -B o N T/A 中和抗体を含有しないことが解っている血清を含んでなる；ならびに (g) 工程 e で検出された抗体-抗原複合体の量を工程 f で検出された抗体-抗原複合体の量と比較すること、ここで工程 f で検出された抗体-抗原複合体の量に相対して工程 e で検出された抗体-抗原複合体のより少ない検出量は α -B o N T/A 中和抗体の存在の指標である；の工程を含んでなる哺乳動物における B o N T/A 免疫抵抗性を決定する方法。

10

【0163】

25. (a) α -B o N T/A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料に B o N T/A を添加すること；(b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T/A 中毒に感受性が高い；(c) 処理された細胞から B o N T/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-25 切断生成物を含んでなる S N A P-25 構成要素を単離すること；(d) S N A P-25 構成要素を固相支持体に固定すること；(e) S N A P-25 構成要素を α -S N A P-25 抗体と接触させること、ここで α -S N A P-25 抗体は S N A P-25 切断生成物からの B o N T/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；(f) α -S N A P-25 抗体および S N A P-25 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；(g) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b-f を繰り返すことであって、陰性対照試料は B o N T/A および、 α -B o N T/A 中和抗体を含有しないことが解っている血清を含んでなる；ならびに (h) 工程 f で検出された抗体-抗原複合体の量を工程 (g) で検出された抗体-抗原複合体の量と比較すること、ここで工程 g で検出された抗体-抗原複合体の量に相対して工程 f で検出された抗体-抗原複合体のより少ない検出量は α -B o N T/A 中和抗体の存在の指標である；の工程を含んでなる哺乳動物における B o N T/A 免疫抵抗性を決定する方法。

20

30

【0164】

26. (a) α -B o N T/A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料に B o N T/A を添加すること；(b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T/A を取り込むことができる；(c) 処理された細胞から B o N T/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P-25 切断生成物を含んでなる S N A P-25 構成要素を単離すること；(d) S N A P-25 構成要素を α -S N A P-25 抗体と接触させること、ここで α -S N A P-25 抗体は S N A P-25 切断生成物からの B o N T/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；(e) α -S N A P-25 抗体および S N A P-25 切断生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；(f) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b-e を繰り返すことであって、陰性対照試料は B o N T/A および、 α -B o N T/A 中和抗体を含有しないことが解っている血清を含んでなる；ならびに (g) 工程 e で検出された抗体-抗原複合体の量を工程 f で検出された抗体-抗原複合体の量と比較すること、ここで工程 f で検出された抗体-抗原複合体の量に相対して工程 e で検出された抗体-抗原複合体のより少ない検出量は α -B o N T/A 中和抗体の存在の指標である；の工程を含んでなる哺乳動物における B o N T/A 免疫抵抗性を決定する方法。

40

【0165】

27. (a) α -B o N T/A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物

50

から得られた被験試料にB o N T / Aを添加すること；(b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞はB o N T / Aを取り込むことができる；(c) 処理された細胞からB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5切断生成物を含んでなるS N A P - 2 5構成要素を単離すること；(d) S N A P - 2 5構成要素を固相支持体に連結されたα - S N A P - 2 5抗体と接触させること、ここでα - S N A P - 2 5抗体はS N A P - 2 5切断生成物からのB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；(e) α - S N A P - 2 5抗体およびS N A P - 2 5切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；(f) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程b - eを繰り返すことであって、陰性対照試料はB o N T / Aおよび、α - B o N T / A中和抗体を含有しないことが解っている血清を含んでなる；ならびに(g) 工程eで検出された抗体 - 抗原複合体の量を工程fで検出された抗体 - 抗原複合体の量と比較すること、ここで工程fで検出された抗体 - 抗原複合体の量に相対して工程eで検出された抗体 - 抗原複合体のより少ない量の検出はα - B o N T / A中和抗体の存在の指標である；の工程を含んでなる哺乳動物におけるB o N T / A免疫抵抗性を決定する方法。

10

【0166】

28. (a) α - B o N T / A中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料にB o N T / Aを添加すること；(b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞はB o N T / Aを取り込むことができる；(c) 処理された細胞からB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5切断生成物を含んでなるS N A P - 2 5構成要素を単離すること；(d) S N A P - 2 5構成要素を固相支持体に固定すること；(e) S N A P - 2 5構成要素をα - S N A P - 2 5抗体と接触させること、ここでα - S N A P - 2 5抗体はS N A P - 2 5切断生成物からのB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；(f) α - S N A P - 2 5抗体およびS N A P - 2 5切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；(g) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程b - fを繰り返すことであって、陰性対照試料はB o N T / Aおよび、α - B o N T / A中和抗体を含有しないことが解っている血清を含んでなる；ならびに(h) 工程fで検出された抗体 - 抗原複合体の量を工程gで検出された抗体 - 抗原複合体の量と比較すること、ここで工程gで検出された抗体 - 抗原複合体の量に相対して工程fで検出された抗体 - 抗原複合体のより少ない検出量はα - B o N T / A中和抗体の存在の指標である；の工程を含んでなる哺乳動物におけるB o N T / A免疫抵抗性を決定する方法。

20

30

【0167】

29. 細胞がB o N T / A約500 pM以下による、約400 pM以下による、約300 pM以下による、約200 pM以下による、約100 pM以下によるB o N T / A中毒に感受性が高い17 - 22および23 - 25の方法。

【0168】

30. 細胞が約500 pM以下、約400 pM以下まで、約300 pM以下まで、約200 pM以下まで、約100 pM以下までのB o N T / Aを取り込むことができる20 - 22および26 - 28の方法。

40

【0169】

31. 試料が約100 ng以下、約10 ng以下、約1 ng以下、100 fg以下、10 fg以下または1 fg以下のB o N T / Aを含んでなる17 - 22の方法。

【0170】

32. 試料が約100 nM以下、約10 nM以下、約1 nM以下、約100 pM以下、約10 pM以下、約1 pM以下、約100 fM以下、約10 fM以下または約1 fM以下のB o N T / Aを含んでなる17 - 22の方法。

【0171】

50

33. α -SNAP-25抗体が5-16の単離された α -SNAP-25抗体である17-28の方法。

【0172】

34. 抗体-抗原複合体の存在が免疫プロット分析、免疫沈降分析、ELISAまたはサンドイッチELISAにより検出される17-28の方法。

【0173】

35. 免疫基盤の方法が下の漸近線(the lower asymptote)に関して少なくとも3:1、少なくとも5:1、少なくとも10:1、少なくとも20:1、少なくとも50:1または少なくとも100:1のシグナル対ノイズ比を有する17-28の方法。

【0174】

36. 免疫基盤の方法が上の漸近線(the higher asymptote)に関して少なくとも10:1、少なくとも20:1、少なくとも50:1、少なくとも100:1、少なくとも200:1、少なくとも300:1、少なくとも400:1、少なくとも500:1または少なくとも600:1のシグナル対ノイズ比を有する17-28の方法。

【0175】

37. 免疫基盤の方法が例えば少なくとも100 ng、少なくとも50 ng、少なくとも10 ng、少なくとも5 ng、少なくとも100 pg、少なくとも50 pg、少なくとも10 pg、少なくとも5 pg、少なくとも100 fg、少なくとも50 fg、少なくとも10 fgまたは少なくとも5 fgの EC_{50} 活性を検出することができる17-28の方法。

【0176】

38. 免疫基盤の方法が例えば少なくとも10 nM、少なくとも5 nM、少なくとも100 pM、少なくとも50 pM、少なくとも10 pM、少なくとも5 pM、少なくとも100 fM、少なくとも50 fM、少なくとも10 fM、少なくとも5 fMまたは少なくとも1 fMの EC_{50} 活性を検出することができる17-28の方法。

【0177】

39. 免疫基盤の方法が例えば10 pg以下、9 pg以下、8 pg以下、7 pg以下、6 pg以下、5 pg以下、4 pg以下、3 pg以下、2 pg以下、1 pg以下のBoNT/AのLODを有する17-28の方法。

【0178】

40. 免疫基盤の方法が例えば100 fM以下、90 fM以下、80 fM以下、70 fM以下、60 fM以下、50 fM以下、40 fM以下、30 fM以下、20 fM以下または10 fM以下のBoNT/AのLODを有する17-28の方法。

【0179】

41. 免疫基盤の方法が例えば10 pg以下、9 pg以下、8 pg以下、7 pg以下、6 pg以下、5 pg以下、4 pg以下、3 pg以下、2 pg以下、1 pg以下のBoNT/AのLOQを有する17-28の方法。

【0180】

42. 免疫基盤の方法が例えば100 fM以下、90 fM以下、80 fM以下、70 fM以下、60 fM以下、50 fM以下、40 fM以下、30 fM以下、20 fM以下または10 fM以下のBoNT/AのLOQを有する17-28の方法。

【0181】

43. 免疫基盤の方法が十分に活性なBoNT/Aを、十分に活性なBoNT/Aの活性の70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下または10%以下を有する部分的に活性なBoNT/Aと区別することができる17-28の方法。

【実施例1】

【0182】

候補細胞株のスクリーニング

以下の実施例はBoNT/A中毒に感受性が高い、または本明細書に開示されるBoNT

10

20

30

40

50

T/A活性を検出する方法に必要なB o N T/A取り込み受容力を有する確立された細胞株を同定する仕方を例証する。

1. 候補細胞株のストック培養物の成長

細胞株を成長させるために、試験中の細胞株からの適当な密度の細胞を適当な成長培地 30 mL (表1参照) を含有する 162 cm² の組織培養フラスコに蒔き、そして 37℃ のインキュベーター中 5% または 10% 二酸化炭素下で、細胞が望ましい密度に到達するまで成長させた。

【0183】

【表1-1】

表1 細胞株スクリーニングで使用された培地	
細胞株	血清成長培地組成
Kelly SiMa	RPMI1640、10% ウシ胎仔血清、1% ペニシリンーストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン
NB69	RPMI1640、15% ウシ胎仔血清、1% ペニシリンーストレプトマイシン
CHP-126	RPMI1640、20% ウシ胎仔血清、1% ペニシリンーストレプトマイシン
N4TG3	RPMI1640、10% ウシ胎仔血清、1% ペニシリンーストレプトマイシン、100 μM 6-チオグアニン
MHH-NB-11	RPMI1640、10% ウシ胎仔血清、1% ペニシリンーストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、0.1mM 非必須アミノ酸
PC12	RPMI1640、5% 熱不活化ウシ胎仔血清、10% ウマ血清、2mM GlutaMAX (商標)、10mM HEPES、1mM ピルビン酸ナトリウム、1% ペニシリンーストレプトマイシン
N18TG2	DMEM (11885-084, Gibco)、10% ウシ胎仔血清、1% ペニシリンーストレプトマイシン、100 μM 6-チオグアニン
N1E-115 N18 ND8/34 NG108-15 NG115-40 1L NS20Y SK-N-SH	90% DMEM、10% 熱不活化ウシ胎仔血清、2mM グルタミン、2mM グルコース

10

20

30

【表 1 - 2】

SK-N-DZ SK-N-F1	90%DMEM、10%熱不活化ウシ胎仔血清、4mMグルタミン、4mMグルコース、0.1mM非必須アミノ酸、1.5g/L NaHCO ₃
BE(2)-C BE(2)-M17 CHP-212 LA-1-55n LA-N-1 MC-1XC SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM (11090-081、Gibco)、Ham's F12 (11765-054、Gibco)、10%熱不活化ウシ胎仔血清、2mMグルタミン、0.1mM非必須アミノ酸
NB4 1A3	Ham's F10 (12471-017、Gibco)、2.5%熱不活化ウシ胎仔血清、15%熱不活化ウマ血清、2mMグルタミン
Neuro-2a	EMEM、10%熱不活化ウシ胎仔血清、2mMグルタミン、0.1mM非必須アミノ酸、1.5g/L NaHCO ₃ 、1mMピルビン酸ナトリウム

10

20

【0184】

2. 1 nM BoNT/Aを使用する候補細胞株の単回用量スクリーニング

細胞基盤のアッセイの感度を改善するために試験される1つのパラメーターは、クロストリジウム神経毒を取り込み、そして基質表面に接着する良好な受容力を呈する適当な細胞株を同定することであった。最初に細胞株を、1 nM BoNT/Aを取り込むその能力および表面に付着するその能力に関して試験した。細胞株が1 nM BoNT/Aを取り込むことができるかどうかを決定するために、試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を、適切な血清成長培地（表1）1 mLを含有する24ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた播種した。細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、細胞が望ましい密度に到達するまで成長させた（およそ18から24時間）。成長培地を各ウェルから吸引し、そして1) 毒素を含有しない新鮮成長培地（未処理細胞株）または2) 1 nM BoNT/A複合体を含有する新鮮成長培地（処置細胞株）のいずれかで置き換えた。一晚インキュベートした後、成長培地を吸引し、そして各ウェルを1×PBS 200 μLで濯ぐことにより細胞を洗浄した。細胞を採取するために、1×PBSを吸引し、2×SDS負荷バッファー50 μLを添加することにより細胞を溶解し、ライゼートを清浄な試験管に移し、そして試料を95℃まで5分間加熱した。

30

【0185】

SNA P-25未切断基質およびSNA P-25切断生成物の双方の存在に関して検出するために、各採取された試料からのアリコートウェスタンブロットにより分析した。この分析では、採取された試料の12 μLアリコートを変性還元条件下でNuPAGE（登録商標）Novex 12%Bis-Trisプレキャストポリアクリルアミドゲル（Invitrogen Inc., Carlsbad, CA）を使用してMOPSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。分離されたペプチドをTrans-Blot（登録商標）SD半乾燥電気泳動トランスファーセル装置（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA）を使用してウェスタンブロッティングによりゲルからポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜（Invitrogen Inc., Carlsbad, CA）に移した。Tris緩衝生理食塩水（TBS）（25 mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール塩酸（Tris-HCl）（pH 7.4）、137 mM塩化ナトリウム、2.7 mM塩化カリウム）、0.1%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン

40

50

(20) ソルビタンモノラウレート)、2%ウシ血清アルブミン(BSA)、5%脱脂粉乳を含有する溶液中、室温で2時間インキュベートすることによりPVD F膜を遮断した。遮断された膜を1) 一次抗体として α -SNAP-25マウスモノクローナル抗体(SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD)の1:5,000希釈; または2) 一次抗体としてS9684 α -SNAP-25ウサギポリクローナル抗血清(Sigma, St. Louis, MO)の1:5,000希釈のいずれかを含有するTBS、0.1%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)、2%BSAおよび5%脱脂粉乳中、4℃で一晩インキュベートした。 α -SNAP-25マウスモノクローナルおよびウサギポリクローナル抗体の双方はSNAP-25未切断基質およびSNAP-25切断生成物の双方を検出することができ、BoNT/A取り込みの量を評価するためのパラメーターとして、各細胞株における全体的なSNAP-25発現およびBoNT/A処理後に切断されたSNAP-25のパーセントを評価することが可能になる。一次抗体でプロービングされたプロットをTBS、TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)で、各回15分間で3回洗浄した。洗浄した膜を1) 二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合されたヤギポリクローナル抗マウス免疫グロブリンG、重および軽鎖(IgG、H+L)抗体(Zymed, South San Francisco, CA)の1:10,000希釈; または2) 二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合されたヤギポリクローナル抗ウサギ免疫グロブリンG、重および軽鎖(IgG、H+L)抗体(Zymed, South San Francisco, CA)の1:10,000希釈のいずれかを含有するTBS、0.1%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)、2%BSAおよび5%脱脂粉乳中で室温で2時間インキュベートした。二次抗体でプロービングされたプロットをTBS、0.1%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)中、各回15分間で3回洗浄した。標識SNAP-25生成物のシグナル検出をECL Plus(商標)ウェスタンブロット検出系(GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)を用いて可視化し、そして膜を撮像し、そして切断されたパーセントをTyphoon 9410変数形式撮像装置および撮像装置分析ソフトウェア(GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)で定量化した。ピクセルサイズ(100から200ピクセル)およびPMT電圧設定(350から600、通常400)の選択は個々のプロットに依存した。表2は1nM BoNT/Aで処理したときにSNAP-25切断生成物が検出された細胞株を示す。以下の細胞株は1nM BoNT/Aの取り込みおよび基質表面への適切な付着の双方を呈した: BE(2)-M17、IMR-32、Kelly、LA1-55n、N1E-115、N4TG3、N18、Neuro-2a、NG108-15、PC12、SH-SY5Y、SiMaおよびSK-N-BE(2)-C。

【0186】

細胞株が表面に付着できるかどうかを決定するために、試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を、適切な成長培地(表1)1mLを含有する24ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、細胞が望ましい密度に到達するまで成長させた(およそ18から24時間)。播種された細胞の全数に相対して、組織プレートの底部ウェル表面に接着した細胞のパーセンテージにより細胞付着を評価した。細胞株CHP-126、IMR-32、LA-N-1、MC-IXC、NG115-401L、SK-N-BE(2)-C、SK-N-F1およびSK-N-MCは50%未満の付着を呈したので(表2)、各細胞株は適当ではないと見なされた。試験された全てのその他の細胞株は適当な付着特徴を呈した(表2)。

【表 2 - 1】

表 2 1 nM B o N T / A を使用する候補細胞株の単回用量スクリーニング				
細胞株	記載	供給源	1nM B o N T / A 取り込み	付着
BE (2) - C	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2268	なし	> 60%
BE (2) - M 17	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2267	あり	> 60%
CHP-126	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 304	なし	< 50%
CHP-212	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2273	なし	> 60%
HCN-1a	大脳皮質ニューロン	ATCC CRL-10442	なし	> 60%
HCN-2	大脳皮質ニューロン	ATCC CRL-10742	なし	> 60%
IMR-32	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-127	あり	< 50%
Kelly	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 92110411	あり	> 60%
Kelly	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 355	あり	> 60%
LA1-55n	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 06041203	あり	> 60%
LA-N-1	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 06041201	—	< 25%
MC-IXC	ヒト神経上皮腫	ATCC CRL-2270	—	< 25%
MHH-NB-11	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 157	なし	> 60%
N1E-115	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-2263	あり	> 60%

10

20

30

40

【表 2 - 2】

N4TG3	マウス神経芽細胞腫	DSMZ ACC 101	なし	> 60%
N18TG2	マウス神経芽細胞腫	DSMZ ACC 103	なし	> 60%
NB4 1A3	マウス神経芽細胞腫	ECACC 89121405	なし	> 60%
ND3	マウス神経芽細胞腫／一次新生仔ラットDRGハイブリッド	ECACC 92090901	なし	> 60%
ND7／23	マウス神経芽細胞腫／一次ラットDRGハイブリッド	ECACC 92090903	なし	> 60%
ND8	マウス神経芽細胞腫／一次新生仔ラットDRGハイブリッド	ATCC	なし	> 60%
ND8／34	マウス神経芽細胞腫	ECACC 92090904	なし	> 60%
ND15	マウス神経芽細胞腫／一次新生仔ラットDRGハイブリッド	ECACC 92090907	なし	> 60%
ND27	マウス神経芽細胞腫／一次ラットDRGハイブリッド	ECACC 92090912	なし	> 60%
NB69	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 99072802	なし	> 60%
NDC	マウス神経芽細胞腫／一次新生仔ラットDRGハイブリッド	ECACC 92090913	なし	> 60%
Neuro-2a	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-131	あり	> 60%
NG108-15	マウス神経芽細胞腫／ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 88112302	あり	> 60%
NG115-401L	マウス神経芽細胞腫／ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 87032003	なし	< 50%
NS20Y	マウス神経芽細胞腫	DSMZ ACC 94	なし	> 60%
PC12	ラットクロム親和性細胞腫	ATCC CRL-1721	あり	> 60%
SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2266	あり	> 60%
SiMa	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 164	あり	> 60%

10

20

30

40

【表 2 - 3】

SK-N-BE (2) -C	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 271	あり	<50%
SK-N-AS	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 137	なし	>60%
SK-N-DZ	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 149	なし	>60%
SK-N-F1	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 142	なし	<50%
SK-N-M C	ヒト神経芽細胞腫	ATCC HTB-1 0	—	<25%
SK-N-SH	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 860128 02	なし	>60%
TE 189.T	脊髄	ATCC CRL-7 947	なし	>60%

10

【実施例 2】

20

【0187】

候補細胞株における神経毒取り込みに関する成長条件の評価

以下の実施例は、B o N T / A 中毒に感受性が高いかまたは B o N T / A 取り込み受容力を有していることを最大化する確立された細胞株のための成長条件の決定の仕方を例証する。

1. 候補細胞株の神経毒取り込みに及ぼす細胞分化の効果

細胞分化が神経毒取り込みを改善したかどうかを決定するために、1 nM B o N T / A の取り込みを呈する細胞株を血清不含培地に移して分化を誘起した。試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を、アール塩を伴う 2 mM GlutaMAX (商標) I、0.1 mM 非必須アミノ酸、10 mM HEPES、1 mM ピルビン酸ナトリウム、100 単位/mL ペニシリンおよび 100 μg/mL ストレプトマイシンを伴う最小必須培地を含有する血清不含培地 1 mL を含有する 24 ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。これらの細胞を 37℃ のインキュベーター中 5% 二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで（およそ 2 から 3 日）インキュベートした。対照として、試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を適切な成長培地（表 1）1 mL を含有する 24 ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。これらの未分化対照細胞を 37℃ のインキュベーター中 5% 二酸化炭素下で、細胞が望ましい密度に到達するまで（およそ 18 から 24 時間）成長させた。分化型および未分化型対照培養物の双方からの培地を各ウェルから吸引し、そして 0（未処理試料）、0.1 nM、0.3 nM または 1 nM B o N T / A 複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。一晚インキュベートした後、実施例 1 に記載されるように細胞を洗浄し、そして採取した。

30

40

【0188】

S N A P - 2 5 切断生成物の存在を検出するために、採取された試料を 12% 26 ウェル Criterion ゲル (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を使用して S D S - P A G E により分離する以外は実施例 1 に記載されるように、各採取された試料からのアリコート をウェスタンブロットにより分析し、そしてウサギポリクローナル α - S N A P - 2 5₁₋₉₇ 抗体血清を一次抗体として使用した（実施例 4 参照）。表 3 は 0.1 nM B o N T / A で処理したときに S N A P - 2 5 切断生成物を呈した細胞株を示す。試験された細胞株のうち、S i M a および N e u r o - 2 a 細胞株のみが未分化状態で 0.1 nM B o

50

N T / A の取り込みを呈した。しかしながら、S i M a および N e u r o - 2 a に加えて、細胞株 N 1 8、L A 1 - 5 5 n、P C 1 2 および S H - S Y 5 Y 全てが分化した状態で 0.1 n M B o N T / A の取り込みを呈した。

【 0 1 8 9 】

【表 3 - 1】

表 3 候補細胞株の神経毒取り込みに及ぼす細胞分化の効果				
細胞株	記載	供給源	0.1nM B o N T / A 取り込み	
			未分化型	分化型
BE (2) - M 17	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 267	なし	なし
Kelly	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 35 5	なし	なし
LA1-55n	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 060412 03	なし	あり
N1E-115	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-2 263	なし	未試験
N4TG3	マウス神経芽細胞腫	DSMZ ACC 10 1	なし	未試験
N18	マウス神経芽細胞腫 / ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 881123 01	なし	あり

10

20

【表 3 - 2】

Neuro-2a	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-1 31	あり	あり
NG108-15	マウス神経芽細胞腫 / ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 881123 02	なし	未試験
PC12	ラットクロム親和性細胞腫	ATCC CRL-1 721	なし	あり
SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 266	なし	あり
SiMa	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 16 4	あり	あり
SK-N-BE (2) - C	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 271	なし	未試験

30

40

【 0 1 9 0 】

2. 分化型候補細胞株の神経毒取り込みに及ぼすガングリオシド処理の効果

神経毒の低アフィニティー結合を改善する処理が神経毒取り込みを改善するかどうかを決定するために、1 n M B o N T / A の取り込みを呈する分化型細胞株をガングリオシド G T 1 b で処理した。試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を、2 5

50

$\mu\text{g}/\text{mL}$ GT1b (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) を伴うかまたは伴わない前記されたような血清不含培地を含有する24ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。これらの細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、前記されたような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまでインキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そして0（未処理試料）、1.9 pM、3.7 pM、7.4 pM、14.8 pM、29.7 pM、59.4 pM、118.8 pM、237.5 pM、574 pM、950 pMおよび1900 pMのBoNT/A複合体のいずれかを含有する新鮮血清不含培地で置き換えた。細胞株を24時間および48時間の2つの異なる時間でインキュベートした。毒素のインキュベーションの後、実施例1に記載されるように細胞を洗浄し、そして採取した。

10

【0191】

SNA P-25切断生成物の存在を検出するために、採取された試料を12%26ウェルCriterionゲル (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を使用してSDS-PAGEにより分離する以外は実施例1に記載されるように、各採取された試料からのアリコートウェスタンブロットにより分析し、そしてウサギポリクローナル α -SNA P-25₁₉₇抗体血清を一次抗体として使用した（実施例4参照）。表4はBoNT/Aを取り込む分化型細胞株の能力に及ぼすガングリオシド処理の効果を示す。これらの結果により、ウェスタンブロットにおいてSNA P-25切断生成物の検出可能なバンドを生成する最低濃度のBoNT/Aが示される。

20

【0192】

【表4-1】

表4 候補細胞株の神経毒取り込みに及ぼすガングリオシド処理の効果				
細胞株	記載	供給源	BoNT/A取り込み	
			24時間インキュベーション	48時間インキュベーション
BE (2) -M17	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2267	237.5pM	118.8pM
Kelly	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 355	未試験	未試験
LA1-55n	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 06041203	15pM	7.4pM
N1E-115	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-2263	未試験	未試験
N4TG3	マウス神経芽細胞腫	DSMZ ACC 101	未試験	未試験

30

40

【表 4－2】

N18	マウス神経芽細胞腫／ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 88112301	14.8pM	7.4pM
Neuro-2a	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-131	7.4pM	7.4pM
NG108-15	マウス神経芽細胞腫／ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 88112302	未試験	未試験
PC12	ラットクロム親和性細胞腫	ATCC CRL-1721	7.4pM	7.4pM
SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2266	未試験	未試験
SiMa	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 164	1.9pM	1.9pM
SK-N-BE (2) -C	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2271	未試験	未試験

10

20

【0193】

3. 候補細胞株の神経毒取り込みを増強した細胞分化特性を伴う血清不含培地の開発

細胞分化を誘起する処置改善が神経毒取り込みを改善できるかどうかを決定するために、SiMa、Neuro-2aおよびPC12細胞株を種々の血清不含培地中で成長させて分化を誘起した。試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を、種々の被験血清不含培地1mLを含有する24ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。試験されたパラメーターは1) BoNT/A取り込みに及ぼす異なる基礎培地の効果(MEMおよびRPMI 1649); 2) BoNT/A取り込みに及ぼす神経栄養因子の存在または不在の効果(N2サプリメントおよびB27サプリメント); 3) BoNT/A取り込みに及ぼす分化因子の存在または不在の効果(レチノイン酸および神経成長因子); および4) BoNT/A取り込みに及ぼす血清の存在または不在の効果(血清不含培地および血清使用量低減培地)であった。対照として、試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を対照血清不含培地(最小必須培地、アール塩を伴う2mM GlutaMAX(商標)I、0.1mM非必須アミノ酸、10mM HEPES、1mMビルビン酸ナトリウム、100単位/mLペニシリンおよび100μg/mLストレプトマイシン)1mLを含有する24ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。これらの細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで(およそ2から3日)インキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そして0(未処理試料)、0.005pM、0.015pM、0.05pM、0.14pM、0.42pM、1.2pM、3.7pM、11pM、33pM、100pMおよび300pMのBoNT/A複合体のいずれかを含有する新鮮血清不含培地で置き換えた。加えて、分化型細胞をBoNT/Aで24時間処理し、続いて培地交換し、そして新鮮培地中毒素を伴わずに48時間インキュベートしてSNAP-25切断生成物の蓄積を可能にした。次いで実施例1に記載されるように細胞を洗浄し、そして採取した。

30

40

【0194】

【表 5】

表 5 細胞株を分化するのに使用された血清不含培地	
細胞株	被験血清不含培地組成
LA1-55n	アール塩を伴う2mM GlutaMAX (商標) I、0.1mM非必須アミノ酸、10mM HEPES、1xN2サプリメントおよび1×B27サプリメントを伴う最小必須培地
Neuro-2a	最小必須培地、アール塩を伴う2mM GlutaMAX (商標) I、1×B27サプリメント、1×N2サプリメント、0.1mM非必須アミノ酸、10mM HEPES
PC12	RPMI1640、2mM GlutaMAX (商標)、1×B27サプリメント、1×N2サプリメント、10mM HEPES、1mMピルビン酸ナトリウム、1%ペニシリン-ストربتマイシンおよび50ng/mL神経成長因子
SiMa	最小必須培地、アール塩を伴う2mM GlutaMAX (商標) I、1×B27サプリメント、1×N2サプリメント、0.1mM非必須アミノ酸、10mM HEPES

10

【0195】

S N A P-25 切断生成物の存在を検出するために、採取された試料を12%26ウェルCriterionゲル(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を使用してSDS-PAGEにより分離する以外は実施例1に記載されるように、各採取された試料からのアリコート
 をウェスタンブロットにより分析し、そしてα-S N A P-25ウサギポリクローナル血清を使用した(実施例4参照)。各細胞株に関して決定された、最も最適化された培地を表5に示す。表6は細胞株をこの最適化された血清不含培地で成長させたときに検出された最低量のS N A P-25切断生成物の最低量を示す。最適化された血清不含培地の使用により結果的にL A 1-55n、Neuro-2a、PC-12およびSiMa細胞株において許容されるシグナル対ノイズ比を伴うB o N T/A活性シグナルが検出された(図2)。例えば最適化された分化条件により、S N A P-25切断生成物検出において対照血清不含培地と比較して、Neuro-2aおよびPC12細胞に関して5倍、そしてSiMa細胞に関してほぼ50倍の増大を招いた。加えてバリデーションを施せる頑健なアッセイを開発するために、下の漸近線に関して3:1、および上の漸近線に関して10:1の最小シグナル対ノイズ比が必要とされる。1.2pM用量から検出されたシグナルを0pM B o N T/Aのバックグラウンドシグナルと比較した場合に、L A-1-55nを除いて、全ての最適化された細胞株により、下の漸近線に関して少なくとも3:1のシグナル対ノイズ比が提供された(図2)。加えて300pM用量からのシグナルを0pM B o N T/Aのバックグラウンドシグナルと比較した場合、全ての最適化された細胞株により、上の漸近線に関して少なくとも100:1のシグナル対ノイズ比が提供された(図2)。これらの結果により、アッセイがpM量のB o N T/Aの存在を検出していたので、これらの細胞株のいずれかを使用して本明細書に開示されるようなB o N T/A活性を検出するための免疫基盤の方法を開発できることが示される。

20

30

【0196】

40

【表 6 - 1】

表 6 候補細胞株の神経毒取り込みに及ぼす最適化された血清不含培地の効果				
細胞株	記載	供給源	B o N T / A 取り込み	
			対照血清不含培地	最適化された血清不含培地
BE (2) - M 17	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 267	未試験	未試験
Kelly	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 35 5	未試験	未試験
LA1-55n	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 060412 03	7.4pM	3.7pM
N1E-115	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-2 263	未試験	未試験
N4TG3	マウス神経芽細胞腫	DSMZ ACC 10 1	未試験	未試験
N18	マウス神経芽細胞腫／ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 881123 01	未試験	未試験

10

20

【表 6 - 2】

Neuro-2a	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-1 31	3.7pM	0.8pM
NG108-15	マウス神経芽細胞腫／ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 881123 02	未試験	未試験
PC12	ラットクロム親和性細胞腫	ATCC CRL-1 721	2.0pM	0.42pM
SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 266	未試験	未試験
SiMa	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 16 4	0.23pM	0.005pM
SK-N-BE (2) - C	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 271	未試験	未試験

30

40

【実施例 3】

【0197】

B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基で遊離カルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する α - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の開発

以下の実施例は B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合することができる α - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の作成の仕方を例証する。

1. α - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の作成

S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P₁ 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合するモノクローナル α - S N A P - 2 5

50

抗体を開発するために、13-残基ペプチドCDSENKTRIDEANQ_{COOH}（配列番号：38）をSNAP-25切断生成物抗原として設計した。このペプチドは可動性リンカー領域ならびにKLHおよびカルボキシル化されたC末端グルタミン（配列番号：38）を伴うヒトSNAP-25（配列番号：5）のアミノ酸186-197に抱合するためのN末端システイン残基を含んでなる。選抜された、独特なペプチド配列に対するモノクローナル抗体の作成により、密接に関係するアイソフォームのプールの中でタンパク質の特定の亜集団の同定を可能にするエピトープが制御される。Blast検索により、このペプチドがSNAP-25に対してのみ高い相同性を有し、そしてニューロン細胞においてその他のタンパク質との交差反応性の可能性がほとんどないことが示された。またコンピュータアルゴリズムを利用することにより配列を注意深く精査して、疎水性親水性指標、タンパク質表面確率、可動性の領域および好ましい二次構造、続いて選ばれたペプチド配列の相応しい配向および提示を決定した。ペプチドを合成し、そしてキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に抱合させて免疫原性を増大した。6匹のBalb/cマウスをこのペプチドで免疫し、そして約8週のうちに3回の免疫の後、マウスを試験のために出血させた。4℃で60分間インキュベートすることにより血液を凝固させた。凝固した血液を10,000×g、4℃で10分間遠心して細胞デブリをペレット化した。得られた血清を50μLアリコートに分注し、そして必要になるまで-20℃で保存した。

【0198】

本明細書に開示されるその他のSNAP-25抗原に基づいた類似の計画を用いて、SNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合するα-SNAP-25モノクローナル抗体を開発した。例えば配列番号：38のSNAP-25抗原の代わりに配列番号：45のSNAP-25抗原をKLHに抱合させることができる。別の実例としては、配列番号：38のSNAP-25抗原からのヒトSNAP-25のアミノ酸186-197を配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43または配列番号：44と置き換えることができる。

【0199】

2. α-SNAP-25モノクローナル抗体の存在に関するスクリーニング

BoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25抗原に選択的に結合することができるα-SNAP-25モノクローナル抗体の存在を決定するために、抽出されたマウス血清を使用して比較ELISAおよび細胞基盤の切断アッセイを実施した。比較ELISAのために、2つの融合タンパク質を構築した：配列番号：48のBirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇および配列番号：49のBirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆。BirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇は、配列番号：5のアミノ酸134-197を含んでなるSNAP-25ペプチドにアミノ末端で連結された配列番号：50の天然ビオチン化16アミノ酸BirAペプチドを含んでなった。BirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆は配列番号：5のアミノ酸134-206を含んでなるSNAP-25ペプチドにアミノ末端で連結された配列番号：50の天然ビオチン化16アミノ酸BirAペプチドを含んでなった。これらの2つの基質を1×PBSに10μg/mL BirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇およびBirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆の濃度で懸濁した。適切な基質溶液およそ100μLを添加することにより、BirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇およびBirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆を別個のプレートにコーティングし、そしてプレートを室温で1時間インキュベートした。洗浄されたプレートを、6匹の免疫マウス（マウス1、マウス2、マウス3、マウス4、マウス5およびマウス6）のうちの1匹から誘導された抗体含有血清の1：10から1：100希釈を含有する1×TBS中0.5%BSA中、37℃で1時間インキュベートした。一次抗体でプロービングされたプレートをTBS、0.1%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20

）ソルビタンモノラウレート）200 μ L中、各回5分間で4回洗浄した。洗浄されたプレートを、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合されたヤギポリクローナル抗マウスIgG抗体（Pierce Biotechnology, Rockford, IL）の1:10,000希釈を含有する1 $\times$ TBS中、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。二次抗体でプロービングされたプレートをTBS、0.1%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）200 μ L中4回洗浄した。標識SNAP-25生成物の発色検出をImmunoPure TMB基質キット（Pierce Biotechnology, Rockford, IL）を使用する発色検出により可視化した。BirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇コーティングされたプレートは黄色を発色したが、BirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆コーティングされたプレートは発色せず、それにより α -SNAP-25抗体がSNAP-25₁₉₇切断生成物を優先的に認識することが示された。結果により、免疫に使用された6匹のマウスのうち3匹のマウス（マウス2、マウス3およびマウス4）がより高い力価およびBONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25抗原に対するさらなる特異性を有した。

10

【0200】

ELISA軽鎖活性アッセイを用いてこれらの結果を確認した。以下の基質溶液および100 μ Lを添加することにより96ウェルReacti-Bindストレプトアビジンコーティングされたプレート（Pierce Biotechnology, Rockford, IL）を調製した：列A-Cを12の異なる濃度のBirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇100 μ Lでコーティングした；列D-Hを10 μ g/mLのBirA-HisTag（登録商標）-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆100 μ Lでコーティングした。基質溶液を吸引し、そしてTBS、0.1%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）200 μ Lで各ウェルを3回濯ぐことによりプレートを洗浄した。BONT/Aの希釈をBONT/Aインキュベーションバッファー（50mM HEPES、pH7.4、1%ウシ胎仔血清、10 μ M ZnCl₂、10mMジチオスレイトール）中37 $^{\circ}$ Cで20分間予備還元し、そして予備還元されたBONT/A 100 μ Lを、基質でコーティングされたプレートに添加し、そして37 $^{\circ}$ Cで90分間インキュベートした。BONT/Aインキュベーションバッファーを吸引し、そしてTBS、0.1%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）200 μ Lで各プレートを3回濯ぐことによりBONT/A処理プレートを洗浄した。試験中の抗体含有血清の1:10から1:100希釈を含有する1 $\times$ TBS中0.5%BSA中で、洗浄されたプレートを37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。一次抗体でプロービングされたプレートをTBS、0.1%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）200 μ L中、各回5分間で4回洗浄した。洗浄されたプレートを、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合されたヤギポリクローナル抗マウスIgG抗体（Pierce Biotechnology, Rockford, IL）の1:10,000希釈を含有する1 $\times$ TBS中、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。二次抗体でプロービングされたプレートをTBS、0.1%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）200 μ L中4回洗浄した。標識SNAP-25生成物の発色検出をImmunoPure TMB基質キット（Pierce Biotechnology, Rockford, IL）を使用する発色検出により可視化した。6匹全ての免疫マウス（マウス1、マウス2、マウス3、マウス4、マウス5およびマウス6）から誘導された抗体含有血清を使用して、SNAP-25₁₉₇切断生成物の存在と相関した黄色の発色がBONT/A処理試料において検出されたが、未処理対照では検出されなかった。故に比較ELISA分析により、免疫に使用されたマウスのうち3匹のマウス（マウス2、マウス3およびマウス4）がより高い力価およびBONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25抗原に対するさらなる特異性を有した。

20

30

40

【0201】

細胞基盤の切断アッセイに関しては、適当な密度のPC12細胞を、適切な血清培地（表1）3mLを含有する60mm²組織培養プレートに蒔いた。細胞を37 $^{\circ}$ Cのインキュ

50

ベーター中5%二酸化炭素下で、細胞が適切な密度に到達するまで成長させた。室温で5分間インキュベートした、LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) 15 μ Lを含有するOPTI-MEM還元血清培地250 μ Lを、pQBI-25/GFP-BONT/A-LC発現構築物(配列番号: 51) 10 μ gを含有するOPTI-MEM還元血清培地250 μ Lに添加することによりトランスフェクション溶液500 μ Lを調製した。pQBI-25/GFP-BONT/A-LC発現構築物はpQBI-25発現ベクター(Qbiogene Inc., Carlsbad, CA)を含んでなり、そのプロモーターエレメントは配列番号: 52のGFP-BONT/A軽鎖をコードするポリヌクレオチドに機能的に連結されている。このトランスフェクション混合物を室温でおよそ20分間インキュベートした。培地を新鮮な未補充培地で置き換え、そしてトランスフェクション溶液500 μ Lを細胞に添加した。次いで細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下でおよそ6から18時間インキュベートした。実施例2に記載されるように細胞を洗浄および採取した。SNAP-25₁₉₇切断生成物の存在を検出するために、使用された一次抗体が抗体含有血清の1:1,000希釈であり、そして使用された二次抗体がマウス α -IgG西洋ワサビペルオキシダーゼ(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)の1:20,000希釈であった以外は実施例2に記載されるように、各採取された試料からのアリコートウェスタンブロットにより分析した。3匹のマウス(マウス2、マウス3およびマウス4)から誘導された抗体含有血清を使用して、SNAP-25₁₉₇切断生成物に相当する単一のバンドがBONT/A処理試料において検出されたが、未処理対照では検出されなかった。故に細胞基盤の切断アッセイにより、免疫に使用されたマウスのうち、3匹のマウス(マウス2、マウス3およびマウス4)がより高い力価およびBONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25抗原に対するさらなる特異性を有した。

【0202】

3. ハイブリドーマの生成

BONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25抗原に選択的に結合することができる α -SNAP-25モノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを作成するために、最終の「ブースター」免疫に引き続いて3日にマウス2から脾臓を採取し、そして標準的なハイブリドーマプロトコルを用いて脾臓細胞を骨髓腫細胞P3-X63 Ag8.653と融合させた。これらの細胞を5つの96ウェルプレートに蒔き、そしてHAT培地を使用してハイブリッドを選択した。融合後8-14日以内に2つの別個のプレートにコーティングされたBirA-HisTag(登録商標)-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇およびBirA-HisTag(登録商標)-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ペプチドを伴う比較ELISAを用いておよそ480の親クロンの最初のスクリーニングを実施した。比較ELISAにより、切断されたSNAP-25₁₉₇に特異的な抗体を生成するハイブリドーマを同定するための迅速なスクリーニング方法が提供された。上位18個のクローンを、前記された細胞基盤の切断アッセイを用いるさらなるスクリーニングおよびLC/Aトランスフェクトされた細胞の免疫染色に供した(表7)。

【0203】

【表 7】

表 7 α -SNAP-25 モノクローナル抗体を含有する上澄の分析						
クロー ン	比較 E L I S A				細胞基盤のアッセイ	
	OD SNAP-2 5 ₁₉₇	OD SNAP-2 5 ₂₀₆	比 _{197/206}	比 _{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	—	—

【0204】

クローン 1D3、1G10、2E2、3C1、3C3 および 3E8 により生成された馴化培地は、SNAP-25₂₀₆ 未切断基質に相対して SNAP-25₁₉₇ 切断生成物に関して少なくとも 4 : 1 の比_{197/206}を有する優先的な結合特異性を伴う α -SNAP-25 抗体を含んでなり、そして細胞基盤の切断アッセイおよび GFP-LC/A でトランスフェクトされた PC12 細胞の免疫染色を用いて SNAP-25₁₉₇ 切断生成物を検出したので、これらのクローンを限界希釈によりさらにクローン化した。類似してクローン 2C9、2F11、3G2、4D1 および 4G6 により生成された馴化培地は、SNAP-25₁₉₇ 切断生成物に相対して SNAP-25₂₀₆ 未切断基質に関して少なくとも 1.5 : 1 の比_{206/197}を有する優先的な結合特異性を伴う α -SNAP-25 抗体を含んでなり、そして細胞基盤の切断アッセイを用いて SNAP-25₂₀₆ 未切断生成物を検出したので、これらのクローンを限界希釈によりさらにクローン化した。これらの単一の細胞由来のクローンを比較 E L I S A、細胞基盤の切断および免疫染色を用いて再度スクリーニングして、そのアフィニティーおよび特異性を確認し、そして標準的な手順を用いて抗体をアイソタイプ分類した。クローン 1D3B8 (IgM.k)、1G10A12 (IgG3.k)、2C9B10 (IgG3.k)、2E2A6 (IgG3.k)、2F11B6 (IgM.k)、3C1A5 (IgG2a.k) および 3C3E2 (IgG2a.k) から腹水を生成した。クローン 3E8 はクローニング過程の間に抗体生成を停止し、そしてさらに評価できなかった。

【0205】

4. α -SNAP-25モノクローナル抗体の結合特異性の評価

BONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25抗原に選択的に結合することができる α -SNAP-25モノクローナル抗体の結合特異性を評価するために、クローン1D3B8、1G10A12、2C9B10、2E2A6、2F11B6、3C1A5および3C3E2由来の腹水を使用して、細胞基盤の活性アッセイ、免疫細胞化学および免疫沈降を用いてSNAP-25切断生成物を検出した。

【0206】

細胞基盤の活性アッセイに関して、ウェスタンブロット分析により α -SNAP-25抗体含有腹水が未切断SNAP-25₂₀₆基質およびSNAP-25₁₉₇切断生成物を検出する能力を分析することにより結合特異性を決定した。適当な密度のPC12細胞を、適切な血清培地3mLを含有する60mm²組織培養プレートに蒔き、37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、適切な細胞密度に到達するまで成長させ、そして前記されたようにpQBI-25/GFP-BONT/A-LC発現構築物を欠如するトランスフェクション溶液（トランスフェクトされていない細胞）、またはpQBI-25/GFP-BONT/A-LC発現構築物を含有するトランスフェクション溶液（トランスフェクトされた細胞）のいずれかでトランスフェクトした。実施例1に記載されるように細胞を洗浄および採取した。未切断SNAP-25₂₀₆基質およびSNAP-25₁₉₇切断生成物双方の存在を検出するために、使用された一次抗体が α -SNAP-25モノクローナル抗体含有腹水の1:100希釈であり、そして使用された二次抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合された α -マウスIgG（Pierce Biotechnology, Rockford, IL）の1:20,000希釈であった以外は実施例1に記載されるように、各採取された試料からのアリコートウェスタンブロットにより分析した。加えて、3つの市販により入手可能なマウス α -SNAP-25モノクローナル抗体を試験した。 α -SNAP-25抗体であるSMI-81（Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD）（製造者により未切断SNAP-25₂₀₆基質およびSNAP-25₁₉₇切断生成物の双方を検出することが示されている）を製造者の推奨に従って15,000希釈で使用した。 α -SNAP-25抗体であるMC-6050（Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV）（製造者により未切断SNAP-25₂₀₆基質およびSNAP-25₁₉₇切断生成物の双方を検出することが示されている）を製造者の推奨に従って1:100希釈で使用した。 α -SNAP-25抗体であるMC-6053（Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV）（製造者によりSNAP-25₁₉₇切断生成物のみを検出することが示されている）を製造者の推奨に従って1:100希釈で使用した。

【0207】

表8はSNAP-25₁₉₇切断生成物のみを検出した α -SNAP-25抗体含有腹水を示す。細胞基盤の切断アッセイにより、クローン1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5および3C3E2から生成された腹水は、SNAP-25₁₉₇切断生成物に関して高い結合特異性を有する α -SNAP-25モノクローナル抗体を合成し、SNAP-25₂₀₆未切断基質に相対してこの切断生成物の選択的認識が可能になる。市販の抗体SMI-81はSNAP-25₂₀₆未切断基質を検出したが、SNAP-25₁₉₇切断生成物をわずかししか認識しなかった（表8）。驚くべきことに、市販の抗体MC-6050はSNAP-25₂₀₆未切断基質のみを検出し、そしてSNAP-25₁₉₇切断生成物を認識し損なった（表8）。なおさらに驚くべきことに、市販の抗体MC-6050はSNAP-25₂₀₆未切断基質のみを検出し、そしてSNAP-25₁₉₇切断生成物を認識し損なったにもかかわらず、製造者は、この抗体がSNAP-25₁₉₇切断生成物を特異的に検出すると宣伝している（表8）。故にこの分析により、1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5および3C3E2はSNAP-25₁₉₇切断生成物に関して適当な選択性を呈するが、1G10A12および2F11B6は呈さないことが示される。加えて、市販の抗体SMI-81、MC-6050およびMC-6053は全てSNAP-25₁₉₇切断生成物を選択的に検出し損なったので、全て

本出願で開示される免疫基盤の方法に不適當である。

【0208】

免疫細胞化学分析のために、免疫染色により α -SNAP-25抗体含有腹水が未切断SNAP-25₂₀₆基質およびSNAP-25₁₉₇切断生成物を検出する能力を分析することにより結合特異性を決定した。例えば「ボツリヌス神経毒の軽鎖における細胞膜局在シグナル」Ester Fernandez-Salas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 101 (9): 3208-3213 (2004) 参照。前記されたように適当な密度のPC12細胞を蒔き、成長させ、そしてpQBI-25/GFP-BoNT/A-LC発現構築物を欠如するトランスフェクション溶液（トランスフェクトされていない細胞）またはpQBI-25/GFP-BoNT/A-LC発現構築物を含有するトランスフェクション溶液（トランスフェクトされた細胞）のいずれかでトランスフェクトした。細胞を1×PBSで洗浄し、そしてPAF5mL中、室温で30分間固定した。固定された細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水中で洗浄し、1×PBS中0.5%Triton（登録商標）X-100（ポリエチレングリコールオクチルフェノールエーテル）5mL中でインキュベートし、1×PBSで洗浄し、そしてメタノール5mL中-20℃で6分間透過処理した。透過処理された細胞を100mMグリシン5mL中、室温で30分間遮断し、1×PBS中で洗浄し、そして1×PBS中0.5%BSA5mL中室温で30分間遮断した。遮断された細胞を1×PBS中で洗浄し、そして試験中のクローン性ハイブリドーマ細胞株からの腹水の1:10希釈を含有する1×PBS中0.5%BSA中、室温で2時間インキュベートした。一次抗体でプロービングされた細胞を1×PBS中各回5分間で3回洗浄した。洗浄された細胞を二次抗体としてALEXA（登録商標）FLUOR568（Invitrogen Inc., Carlsbad, CA）に抱合されたヤギポリクローナル抗マウス免疫グロブリンG、重および軽鎖（IgG、H+L）抗体の1:200希釈を含有する1×PBS中、室温で2時間インキュベートした。二次抗体でプロービングされた細胞を1×PBS中各回5分間で3回洗浄した。洗浄された細胞を、VECTASHIELD（登録商標）封入剤（Vector Laboratories, Burlingame, CA）でマウントし、そしてカバーガラスを載せることにより顕微鏡試験用に調製した。Leica共焦点顕微鏡で、適切なレーザー設定を用いてシグナル検出の画像が得られた。表8はSNAP-25₁₉₇切断生成物を特異的に検出する α -SNAP-25抗体含有腹水を示す。免疫細胞化学分析により、クローン1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5および3C3E2から生成された腹水が、SNAP-25₁₉₇切断生成物に関して高い結合特異性を有する α -SNAP-25モノクローナル抗体を合成し、SNAP-25₂₀₆未切断基質に相対してこの切断生成物の優先的な認識を可能にすることが示された。

【0209】

免疫沈降分析のために、プロテインA（HiTrap（商標）プロテインA HPカラム、GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ）精製された α -SNAP-25モノクローナル抗体が未切断SNAP-25₂₀₆基質およびSNAP-25₁₉₇切断生成物を沈澱させる能力を分析することにより結合特異性を決定した。例えばChapter 8 Storing and Purifying Antibodies, pp. 309-311, Harlow & Lane, supra, 1998a参照。前記されたように適当な密度のPC12細胞を蒔き、成長させ、そしてpQBI-25/GFP発現構築物（対照細胞；配列番号：53）を含有するトランスフェクション溶液、またはpQBI-25/GFP-BoNT/A-LC発現構築物（実験細胞）を含有するトランスフェクション溶液のいずれかでトランスフェクトした。pQBI-25/GFP発現構築物は、そのプロモーターエレメントが配列番号：54のGFPをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結されている発現ベクターを含んでなる。一晚インキュベートした後、成長培地を吸引し、そして各ウェルを1×PBS 200 μ Lで濯ぐことにより細胞を洗浄した。細胞を採取するために、PBSを吸引し、50mM HEPES、150mM NaCl、1.5mM MgCl₂、1mM EDT、10%グリセロール、1%Triton（登録商標）X-100（ポリエチレングリコールオクチルフェノールエーテル）および1×COMPLETE（商標）プロテアーゼ阻害剤カクテル（Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN）を含んでなる免疫沈降溶解バッファーを添加し、そして4℃で1時間インキュ

ベートすることにより細胞を溶解した。溶解した細胞を $3,000 \times g$ 、 4°C で 10 分間遠心して細胞デブリを除去し、そして上澄を清浄な管に移し、そしておよそ 1 mg/mL のタンパク質濃度まで希釈した。精製されたモノクローナル抗体およそ $5\text{ }\mu\text{g}$ を希釈された上澄 0.5 mL に添加し、そして 4°C で 2 時間インキュベートした。一次抗体のインキュベーションの後、固定されたプロテイン G (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) およそ $50\text{ }\mu\text{L}$ を希釈された上澄に添加し、そして 4°C で 1 時間インキュベートした。免疫沈降溶解バッファ 0.5 mL を添加し、 $300 \times g$ 、 4°C で 1 分間遠心して固定されたプロテイン G をペレット化し、そして上澄をデカントすることによりインキュベートされた上澄を各回 30 分間で 3 回洗浄した。洗浄の後、ペレットを $1 \times \text{SDS}$ 負荷バッファ $30\text{ }\mu\text{L}$ 中に再懸濁し、そして試料を 95°C まで 5 分間加熱した。未切断 SNAP-25₂₀₆ 基質および SNAP-25₁₉₇ 切断生成物の双方の存在を検出するために、使用された一次抗体が $\alpha\text{-SNAP-25}$ ポリクローナル抗体血清 (実施例 4 参照) の 1 : 1,000 希釈であり、そして使用された二次抗体がウサギ $\alpha\text{-IgG}$ 西洋ワサビペルオキシダーゼ (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) の 1 : 20,000 希釈であった以外は実施例 1 に記載されるように、各採取された試料からのアリコートウェスタンブロットにより分析した。表 8 は免疫沈降分析により SNAP-25₁₉₇ 切断生成物を特異的に引き下げる $\alpha\text{-SNAP-25}$ 抗体含有腹水を示す。免疫沈降分析により、クローン 2E2A6 および 3C1A5 から生成された腹水が SNAP-25₁₉₇ 切断生成物に関して高い結合特異性を有する $\alpha\text{-SNAP-25}$ モノクローナル抗体を合成し、SNAP-25₂₀₆ 未切断基質に相対してこの切断生成物の優先的な認識を可能にすることが示された。

【0210】

【表 8】

表 8 $\alpha\text{-SNAP-25}$ モノクローナル抗体を含有するクローン腹水の分析						
クローン	細胞基盤のアッセイ		免疫細胞化学		免疫沈降	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆
1D3B8	++	—	++	—	未試験	未試験
1G10A12	++	++	未試験	未試験	未試験	未試験
2C9B10	++	—	++	—	未試験	未試験
2E2A6	++	—	++	—	++	—
2F11B6	+	+	+	+	未試験	未試験
3C1A5	++	—	++	—	++	—
3C3E2	+	—	未試験	未試験	未試験	未試験
MC-6050	—	+	未試験	未試験	未試験	未試験
MC-6053	—	+	未試験	未試験	未試験	未試験
SMI-81	—/+	++	未試験	未試験	未試験	未試験

【0211】

5. $\alpha\text{-SNAP-25}$ モノクローナル抗体の結合アフィニティーの評価

SNAP-25₁₉₇ 切断生成物または SNAP-25₂₀₆ 未切断基質のいずれかに関して高い結合特異性を示す $\alpha\text{-SNAP-25}$ モノクローナル抗体の結合アフィニティーを決定するために、BIAcore 3000 装置でカルボキシメチルデキストラン (CM5) センサーチップ (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を使用して結合アフィニティーアッセイ

を実施した。10 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM 塩化ナトリウム、3 mM EDTA、0.005 % (容量/容量) 界面活性剤 P20 を含んでなる HBS-E P バッファーで、25℃、流速 10 μ L/分 で実行した。配列番号：5 のアミノ酸 134-197 (SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇) または配列番号：5 のアミノ酸 134-206 (SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆) を含んでなる SNAP-25 ペプチドを標準的なアミン結合を用いて CM5 センサーチップの表面に共有結合により付着させた。簡単には、0.2 M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドおよび 0.05 M N-ヒドロキシスクシイミドの混合物の 7 分注入により CM5 チップを活性化し；次いで SNAP-25 ペプチドを 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.0) 中、流速 10 μ L/分 で 20 分注入し；そして未反応のスクシイミドエステルを 1 M 塩酸エタノールアミン (pH 8.5) の 7 分注入により遮断した。チップ上に固定された SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ または SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ の量は応答単位の 100-150 増大 (約 0.10-0.15 ng/mm²) により反映された。クロン 1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5 および 3C3E2 から生成された腹水または精製されたモノクローナル抗体のいずれかを含んでなる抗体試料、ならびに市販により入手可能な α -SNAP-25 抗体を、CM5 チップの表面上を通過させて、会合時間 10 分および解離時間 20 分を可能にした。10 mM グリシン-HCl (pH 2.5) の流速 15 μ L/分の 1 分注入による実行の間に表面を再生した。センサーグラム曲線は BIAevaluation 3.0 ソフトウェアを用いて 1:1 動力学的結合モデルに適合した。

【0212】

結果により、2E2A6 および 3C1A5 の双方が SNAP-25 未切断基質を超えて SNAP-25₁₉₇ 切断生成物に関して高度に特異的であったことが示される (表 9)。MC-6050 および MC-6053 の結合アフィニティーと比較した場合、1D3B6 はこれらの市販の抗体に相対して SNAP-25 切断生成物に関しておよそ 10 倍高い平衡解離定数を有した (表 9)。興味深いことに、2E2A6 のみがこれらの市販の抗体に相対して SNAP-25 切断生成物に関してわずかに低い平衡解離定数を有した (0.405 nM 対 0.497 および 0.508) (表 9)。これらの市販の α -SNAP-25 抗体のいずれも SNAP-25 切断生成物を選択的に認識しなかったが (表 8)、約 0.5 nM よりも低い平衡解離定数がかかる選択性を達成するためにある程度必須であると思われる。類似して MC-6050 および MC-6053 の結合アフィニティーと比較した場合、2E2A6 は約少なくとも 1 倍緩徐な分離速度 (off rate) / 解離定数 (6.74×10^{-5} 対 $8.82 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ および $1.18 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) を有した (表 9)。これはさらに、約 8.82×10^{-4} より緩徐な分離速度 / 解離定数が一部で SNAP-25 切断生成物に関する選択的結合を達成するためにある程度必須であると思われること示唆する。この結果は $5.78 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の分離速度 / 解離定数を有した 1D3B8 と一致する (表 9)。

【0213】

【表 9-1】

表 9 α -SNAP-25 モノクローナル抗体結合アフィニティーの分析				
SPRパラメーター	1D3B8		2E2A6*	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^a	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^b
Ka ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	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)	— (—)

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

SPRパラメーター	3C1A5		2C9B10	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^c	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-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	—

10

【表 9 - 3】

SPRパラメーター	MC-6050		MC-6053	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-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

20

* 2つの異なるチップでこの抗体に関して独立して実行した。

^a 10分の会合時間の後、125 nMまでのα-SNAP-25モノクローナル抗体1D3B8をCM5センサーチップの表面上を通過させたときに、結合は観察されなかった。

^b 10分の会合時間の後、10 μMまでのα-SNAP-25モノクローナル抗体2E2A6をCM5センサーチップの表面上を通過させたときに、結合は観察されなかった。

^c 10分の会合時間の後、100 nMまでのα-SNAP-25モノクローナル抗体3C1A5をCM5センサーチップの表面上を通過させたときに、結合は観察されなかった。

^d 10分の会合時間の後、100 nMまでのα-SNAP-25モノクローナル抗体2C9B10をCM5センサーチップの表面上を通過させたときに、結合は観察されなかった。

30

【0214】

6. 単離されたα-SNAP-25モノクローナル抗体からのエピトープのシーケンシング

BONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25抗原に選択的に結合することができる、単離されたα-SNAP-25モノクローナル抗体のエピトープを決定するために、ハイブリドーマ1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5および3C3E2により生成されるα-SNAP-25モノクローナル抗体の可変重(V_H)および可変軽(V_L)鎖をコードするポリヌクレオチド分子をシーケンシングした。標準的なプロトコールを用いて各ハイブリドーマからmRNAを抽出および精製し、そしてオリゴdTアンチセンスプライマーまたは遺伝子特異的(ネズミIgG1 CHおよびカップCL)アンチセンスプライマーのいずれかを使用してcDNAに逆転写した。cDNA生成の後、特異的なネズミおよびヒト定常ドメインプライマーを使用してPCRによりcDNAを増幅して抗体のアイソタイプを決定した。V_HおよびV_L縮重プライマーを使用してcDNAから可変ドメインを増幅した。5' RACEのた

40

50

めに、ホモポリマー d C T P テールを c D N A の 3' 末端に付加した。次いでオリゴ d G センスプライマーおよび遺伝子特異的 (C H / K C) アンチセンスプライマーを用いて重および軽鎖を増幅した。P C R 生成物にはアンチセンスプライマーまでにシグナルペプチド、可変ドメインおよび定常ドメインの配列が含まれた。P C R 生成物をゲル精製して小型フラグメントを除去し、そしてシークエンシングのためにプラントまたは T A ベクターにクローン化した。各鎖に関して 5 つの独立したクローンをシークエンシングし、そして V_H および V_L 鎖のアラインメントおよびコンセンサス配列を決定した (表 10)。V_H および V_L アミノ酸配列を決定するために用いられた方法は例えば「新規生理活性脂質誘導体ならびに同一物を作成および使用する方法」Roger A. Sabbadini ら、米国特許出願公開第 2007/0281320 号；および「ファージ抗体ライブラリーを使用することにより評価されるようなボツリヌス神経毒 A 型結合ドメインに対するネズミ体液性免疫応答の分子特徴付け」Peter Amersdorfer, et al., Infect. Immun. 65 (9) : 3743-3752 (その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする) に記載される。加えて抗体の可変重 (V_H) および可変軽 (V_L) 鎖をシークエンシングし、そして C D R 領域を同定するために商業用サービスを利用でき、例えば Fusion Antibodies Ltd., Northern Ireland を参照されたい。

10

【0215】

本明細書に開示されるハイブリドーマにより生成される α -S N A P-25 モノクローナル抗体の V_H および V_L 鎖を含んでなるポリヌクレオチド配列は以下のとおりである：1 D 3 B 8 V_H (配列番号：71)、2 C 9 B 10 V_H (配列番号：73)、2 E 2 A 6 V_H (配列番号：75)、3 C 1 A 5 V_H バリエーション 1 (配列番号：77)、3 C 1 A 5 V_H バリエーション 2 (配列番号：79)、3 C 3 E 2 V_H (配列番号：81)；1 D 3 B 8 V_L (配列番号：83)、2 C 9 B 10 V_L (配列番号：85)、2 E 2 A 6 V_L (配列番号：87)、3 C 1 A 5 V_L (配列番号：89) および 3 C 3 E 2 V_L (配列番号：91)。本明細書に開示されるハイブリドーマにより生成される α -S N A P-25 モノクローナル抗体の V_H および V_L 鎖を含んでなるアミノ酸配列は以下のとおりである：1 D 3 B 8 V_H (配列番号：72)、2 C 9 B 10 V_H (配列番号：74)、2 E 2 A 6 V_H (配列番号：76)、3 C 1 A 5 V_H バリエーション 1 (配列番号：78)、3 C 1 A 5 V_H バリエーション 2 (配列番号：80)、3 C 3 E 2 V_H (配列番号：82)；1 D 3 B 8 V_L (配列番号：84)、2 C 9 B 10 V_L (配列番号：86)、2 E 2 A 6 V_L (配列番号：88)、3 C 1 A 5 V_L (配列番号：90) および 3 C 3 E 2 V_L (配列番号：92)。ハイブリドーマ 1 D 3 B 8、2 C 9 B 10、2 E 2 A 6、3 C 1 A 5 および 3 C 3 E 2 により生成される α -S N A P-25 モノクローナル抗体の V_H および V_L C D R ドメインを含んでなるアミノ酸配列を表 10 に示す。

20

30

【0216】

【表 10 - 1】

表 10 α -SNAP-25 モノクローナル抗体からの V_H および V_L ドメインの CDR 配列

CDR	配列	同定された所	配列番号：
V_H CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5バリエーション 2	93
V_H CDR 1	TFTNYVIH	3C1A5バリエーション 1 3C3E2	94
V_H CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V_H CDR 2	YLFPNGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5バリエーション 2	97
V_H CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C1A5バリエーション 1 3C3E2	98
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V_H CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5バリエーション 2	100
V_H CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101

10

20

30

【表 10-2】

V _H CDR 3	ARHLANTYFFFYDY	3C1A5バリエーション 1 3C3E2	102
V _L CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
V _L CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
V _L CDR 1	RASKSVSTSGYSYMH	2E2A6	105
V _L CDR 1	KASQDIKSYLS	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	LVSNNLES	2E2A6	110
V _L CDR 2	YATSLAD	3C1A5	111
V _L CDR 2	YASQSSIS	3C3E2	112
V _L CDR 3	FQGSHPPT	1D3B8	113
V _L CDR 3	QHGYGTPYT	2C9B10	114
V _L CDR 3	QHIRELTRS	2E2A6	115
V _L CDR 3	LQHGESPT	3C1A5	116
V _L CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

10

20

【0217】

本明細書に開示されるハイブリドーマにより生成される α -SNAP-25モノクローナル抗体のV_HCDRドメインバリエーションを含んでなるアミノ酸配列の非限定例には、1D3B8に関してはV_HCDR1バリエーション配列番号：118；2C9B10、2E2A6および3C1A5V_Hバリエーション2に関してはV_HCDR1バリエーション配列番号：119；3C1A5V_Hバリエーション1および3C3E2に関してはV_HCDR1バリエーション配列番号：120；1D3B8および2E2A6に関してはV_HCDR2バリエーション配列番号：121；2C9B10および3C1A5V_Hバリエーション2に関してはV_HCDR2バリエーション配列番号：122；3C1A5V_Hバリエーション1および3C3E2に関してはV_HCDR2バリエーション配列番号：123；1D3B8および2C9B10に関してはV_HCDR3バリエーションMDY；2E2A6および3C1A5V_Hバリエーション2に関してはV_HCDR3バリエーションMGY；ならびに3C1A5V_Hバリエーション1および3C3E2に関してはV_HCDR3バリエーション配列番号：124が含まれる。本明細書に開示されるハイブリドーマにより生成される α -SNAP-25モノクローナル抗体のV_LCDRドメインバリエーションを含んでなるアミノ酸配列の非限定例には、1D3B8に関してはV_LCDR1バリエーション配列番号：125；2C9B10に関してはV_LCDR1バリエーション配列番号：126；2E2A6に関してはV_LCDR1バリエーション配列番号：127；3C1A5に関してはV_LCDR1バリエーション配列番号：128；3C3E2に関してはV_LCDR1バリエーション配列番号：129；1D3B8に関してはV_LCDR2バリエーションKVS；2C9B10に関してはV_LCDR2バリエーションNAK；2E2A6に関してはV_LCDR2バリエーションLVS；3C1A5に関してはV_LCDR2バリエーションYAT；および3C3E2に関してはV_LCDR2バリエーションYASが含まれる。

30

40

【実施例4】

【0218】

BONT/A切断部位切断可能結合のP₁残基で遊離カルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する α -SNAP-25ポリクローナル抗体の開発

50

以下の実施例はB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合することができるα - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の作成の仕方を例証する。

S N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合するα - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を開発するために、10-残基ペプチドC G G G R I D E A N Q (配列番号: 46) をS N A P - 2 5 切断生成物抗原として設計した。このペプチドはK L Hに抱合するためのN末端システイン残基、ヒトS N A P - 2 5 (配列番号: 5) のアミノ酸191-197に連結された可動性スペーサーであるGスペーサー (G G G) を含んでなり、そしてカルボキシル化されたC末端グルタミンを有する。Blast検索により、このペプチドがS N A P - 2 5 に対してのみ高い相同性を有し、そしてニューロン細胞においてその他のタンパク質との交差反応性の可能性がほとんどないことが示された。またコンピュータアルゴリズムを利用することにより配列を注意深く精査して、疎水性親水性指標、タンパク質表面確率、可動性の領域および好ましい二次構造、続いて選ばれたペプチド配列の相応しい配向および提示を決定した。ペプチドを合成し、そしてキーホールリンペットヘモシアニン (K L H) に抱合させて免疫原性を増大した。動物を免疫する前に、細胞ライゼートに存在するタンパク質に対して免疫反応性を有さなかった動物を同定するために、ナイーブなウサギを最初に候補細胞株からの細胞ライゼートに対してウェスタンブロットでスクリーニングした。2匹のプレスクリーニングされたウサギをこのペプチドで免疫し、そして約8週のうちに3回の免疫の後、ウサギを試験のために出血させた。4℃で60分間インキュベートすることにより血液を凝固させた。凝固した血液を10,000×g、4℃で10分間遠心して細胞デブリをペレット化した。得られた血清試料を50μLアリコートに分注し、そして必要になるまで-20℃で保存した。

【0219】

本明細書に開示されるその他のS N A P - 2 5 抗原に基づく類似の計画を用いて、S N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A切断部位切断可能結合からのP₁残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合するα - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を開発する。例えば配列番号: 46のS N A P - 2 5 抗原の代わりに、配列番号: 47のS N A P - 2 5 抗原をK L Hに抱合させることができる。別の事例としては、配列番号: 38のS N A P - 2 5 抗原からのヒトS N A P - 2 5 のアミノ酸191-197を、配列番号: 33、配列番号: 34、配列番号: 35、配列番号: 36、配列番号: 37、配列番号: 39、配列番号: 40、配列番号: 41、配列番号: 42、配列番号: 43または配列番号: 44、配列番号: 147または配列番号: 148と置き換えることができる。

【0220】

2. α - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の存在に関するスクリーニング

B o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5 抗原に選択的に結合することができるα - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の存在を決定するために、実施例3に記載されるように抽出されたウサギ血清を使用して比較E L I S A および細胞基盤の切断アッセイを実施した。双方のウサギからの血清はB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5 抗原に選択的に結合することができるα - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を含有した。α - S N A P - 2 5 ウサギポリクローナル抗体をN T P 2 2 およびN T P 2 3 と称した。

【0221】

3. α - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の精製

B o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5 抗原に選択的に結合することができるα - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を精製するために、配列番号: 46のS N A P - 2 5 抗原を含有するアフィニティークラムを使用して、ウサギ血清からN T P 2 2 およびN T P 2 3 抗体を精製した。

【0222】

4. α - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の結合特異性の評価

B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原に選択的に結合することができる α - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の結合特異性を評価するために、実施例 3 に記載されるように細胞基盤の活性アッセイ、免疫細胞化学および免疫沈降を用いて精製された N T P 2 2 および N T P 2 3 α - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を使用して切断生成物を検出した。細胞基盤の切断アッセイ、免疫細胞化学分析および免疫沈降分析全てにより、N T P 2 2 および N T P 2 3 α - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体が未切断 S N A P - 2 5 と交差反応しないことが示された。故に N T P 2 2 および N T P 2 3 の双方が S N A P - 2 5₁₉₇ 切断生成物に関して高い結合特異性を有し、S N A P - 2 5₂₀₆ 未切断基質に相対してこの切断生成物の優先的な認識を可能にする。実施例 3 に記載されるように BiAcCore において S P R を用いて抗原に関するアフィニティーを決定することができる。

10

【実施例 5】

【0223】

サンドイッチ E L I S A のための構成要素および条件調製

以下の実施例は B o N T / A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 に特異的な α - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を使用して S N A P - 2 5 切断生成物を検出することにより、B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法を行うために有用なサンドイッチ E L I S A を実施するために必要な構成要素および条件を同定および調製する仕方を例証する。

1. B o N T / A で処理された細胞からの細胞ライゼートの調製

分析用の B o N T / A 処理された細胞ライゼートを得るために、N e u r o - 2 a のストック培養物から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う 2 m M G l u t a M A X (商標) I、1 × B 2 7 サプリメント、1 × N 2 サプリメント、0.1 m M 非必須アミノ酸、10 m M H E P E S を含有する血清不含培地 50 m L を含有する T 1 7 5 フラスコに播種した。これらの細胞を 37 °C のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで (およそ 2 から 3 日) インキュベートした。対照として、N e u r o - 2 a のストック培養物から適当な密度の細胞を適切な成長培地 (表 1) 50 m L を含有する T 1 7 5 フラスコに播種した。これらの未分化対照細胞を 37 °C のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下で、細胞が 50 % コンフルエンスに到達するまで (およそ 18 時間) 成長させた。分化型および未分化型対照培養物の双方からの培地を各ウェルから吸引し、そして 0 (未処理試料) または 10 n M B o N T / A 複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。一晚インキュベートした後、細胞を洗浄し、そして新たに調製された T r i t o n X - 100 溶解バッファー (50 m M H E P E S、150 m M N a C l、1.5 m M M g C l₂、1 m M E G T A、1 % T r i t o n X - 100) 中 4 °C で 30 分間一定の攪拌を行いながら溶解することにより細胞を採取した。溶解した細胞を 4000 r p m、4 °C で 20 分間遠心して、ベンチトップ遠心を使用してデブリを排除した。細胞ライゼートのタンパク質濃度をブラッドフォードアッセイにより測定した。

20

30

【0224】

2. サンドイッチ E L I S A 構成要素の調製および同定

適切な捕捉抗体 - 検出抗体対を同定するために、11 個の異なる α - S N A P - 2 5 捕捉抗体および 7 個の異なる α - S N A P - 2 5 検出抗体を含んでなる 26 個の異なる組み合わせの捕捉および検出抗体対で E C L サンドイッチ E L I S A 分析を行った (表 12)。使用した α - S N A P - 2 5 抗体は、本明細書において開示される 2 E 2 A 6 および 3 C 1 A 5 α - S N A P - 2 5 マウスモノクローナル抗体、本明細書において開示される S M I - 8 1、M C - 6 0 5 0 および M C - 6 0 5 3 α - S N A P - 2 5 マウスモノクローナル抗体、本明細書において開示される N T P 2 3 α - S N A P - 2 5 ウサギポリクローナル抗体、S 9 6 8 4 α - S N A P - 2 5 ウサギポリクローナル抗体 (Sigma, S t. Louis, MO)、H - 5 0 α - S N A P - 2 5 ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)、C - 1 8 α - S N A P - 2 5 ヤギポリクロ

40

50

ーナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)、N-19 α -SNAP-25 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)、ならびに SP12 α -SNAP-25 マウスポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) であった。

【0225】

捕捉抗体溶液を調製するために、ハイブリドーマ細胞株 2E2A6 および 3C1A5 からの腹水に含有される α -SNAP-25 モノクローナル抗体、ならびに α -SNAP-25 MC-6050 および MC-6053 モノクローナル抗体を標準的なプロテイン A 精製プロトコルを用いて精製した。全てのその他の α -SNAP-25 抗体を精製された抗体として購入した。

10

【0226】

検出抗体溶液を調製するために、適切な α -SNAP-25 抗体を製造者の説明書に従って (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) ルテニウム (II) トリスービピリジン (4-メチルスルホナート) NHSEステル標識試薬 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) に抱合させた。蒸留水で再構成された MSD SULFO-TAG (商標) ストック溶液 30 μ L を 2 mg/mL α -SNAP-25 ポリクローナル抗体 200 μ L に添加し、そして反応物を暗中室温で 2 時間インキュベートすることにより抱合反応を実施した。標準的なスピンカラムプロトコルを用いて標識された抗体を精製し、そして標準的な比色タンパク質アッセイを用いてタンパク質濃度を決定した。分光光度計を使用して α -SNAP-25 抗体/MSD SULFO-TAG (商標) 抱合体の吸光度を 455 nm で測定してリットルあたりのモル濃度を決定した。検出抗体溶液を必要になるまで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

20

【0227】

SNAP-25 切断生成物に特異的である捕捉抗体を含んでなる固相支持体を調製するために、適切な α -SNAP-25 モノクローナル抗体溶液 (1 $\times$ PBS 中 20 μ g/mL) およそ 5 μ L を 96 ウェル MSD High Bind プレートの各ウェルに添加し、そして生物学的安全キャビネット内で 2-3 時間空気乾燥させて溶液を液体蒸発させる。次いで 2 % Amersham 遮断試薬 (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) および 10 % ヤギ血清 (VWR, West Chester, PA) を含んでなる遮断バッファー 150 μ L を室温で 2 時間添加することにより、捕捉抗体結合ウェルを遮断した。遮断されたプレートを密閉し、そして必要になるまで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

30

【0228】

ECLSandイッチELISA分析により切断されたSNAP-25切断生成物の存在を検出するために、保存されたプレートからの遮断バッファーをウェルから吸引し、前記されたようにBONT/Aで処理された細胞からのライゼート25 μ Lを各ウェルに添加し、そしてプレートを4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして1 $\times$ PBS、0.1 %TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート) 200 μ Lで各ウェルを3回濯ぐことによりプレートウェル3回を洗浄した。洗浄後、1 $\times$ PBS、0.1 %TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート) 中2 %Amersham遮断試薬を含んでなる5 μ g/mL検出抗体溶液25 μ Lを各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを室温で1時間振盪しながらインキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを1 $\times$ PBS、0.1 %TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート) 200 μ Lで3回洗浄した。洗浄後、1 $\times$ リードバッファー (Read Buffer) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 150 μ Lを各ウェルに添加し、そしてSECTOR (商標) Imager 6000イメージリーダー (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) を使用してプレートを読み取った。各抗体対に関して10 nM用量で得られたシグナルを、各抗体対に関して0 nM用量で得られたシグナルにより除することにより比を計算した (表12)。これらの結果により、試験された抗体対の26個の異なる組み合わせの中で3個の抗体対のみが試験された高用量に関して10:1を超えるシグナル対ノイズ比を有した: 第1対 (2E2A6 マウスmAbおよびS9684 ウサギpAb)、

40

50

第4対(3C1A5マウスmAbおよびS9684ウサギpAb)および第18対(S9684ウサギpAbおよび2E2A6マウスmAb)。さらなるアッセイ開発のために第1抗体対を選んだ。

【0229】

【表11-1】

表12 α-SNAP-25抗体組み合わせのスクリーニング					
抗体対 番号	捕捉抗体	検出抗体	検出SNAP-25 切断生成物	検出SNAP-25 未切断基質	シグナル 対ノイズ 比(10nM /0nM)
1	2E2A6マウスmAb	S9684ウサギpAb	あり	なし	26.6 : 1
2	2E2A6マウスmAb	N-19ヤギpAb	あり	なし	7.3 : 1
3	2E2A6マウスmAb	H-50ウサギpAb	あり	なし	0.9 : 1
4	3C1A5マウスmAb	S9684ウサギpAb	あり	なし	12.1 : 1
5	3C1A5マウスmAb	N-19ヤギpAb	あり	なし	1.9 : 1
6	3C1A5マウスmAb	H-50ウサギpAb	あり	なし	0.9 : 1
7	C-18ヤギpAb	S9684ウサギpAb	なし	なし	0.8 : 1
8	C-18ヤギpAb	N-19ヤギpAb	なし	なし	0.9 : 1
9	C-18ヤギpAb	H-50ウサギpAb	なし	なし	0.9 : 1
10	H-50ウサギpAb	2E2A6マウスmAb	あり	なし	0.9 : 1
11	H-50ウサギpAb	C-18ヤギpAb	なし	なし	1.0 : 1
12	N-19ヤギpAb	2E2A6マウスmAb	あり	なし	0.9 : 1
13	N-19ヤギpAb	C-18ヤギpAb	なし	なし	1.1 : 1

10

20

30

【表 1 1 - 2】

14	NTP 23ウサギpAb	N-19ヤギpAb	あり	なし	1.2 : 1
15	NTP 23ウサギpAb	C-18ヤギpAb	なし	なし	1.1 : 1
16	NTP 23ウサギpAb	SP12マウスpAb	あり	なし	1.3 : 1
17	NTP 23ウサギpAb	H-50ウサギpAb	あり	なし	1.1 : 1
18	S9684ウサギpAb	2E2A6マウスmAb	あり	なし	21.3 : 1
19	S9684ウサギpAb	C-18ヤギpAb	なし	なし	0.7 : 1
20	S9684ウサギpAb	SMI-81マウスmAb	あり	あり	1.2 : 1
21	SMI-81マウスmAb	S9684ウサギpAb	あり	あり	1.1 : 1
22	SMI-81マウスmAb	N-19ヤギpAb	あり	あり	1.0 : 1
23	SMI-81マウスmAb	C-18ヤギpAb	なし	なし	0.8 : 1
24	SP12マウスpAb	C-18ヤギpAb	なし	なし	1.0 : 1
25	MC-6050マウスmAb	S9684ウサギpAb	あり	あり	5.0 : 1
26	MC-6053マウスmAb	S9684ウサギpAb	あり	あり	7.1 : 1

10

20

30

【0 2 3 0】

3. 細胞分化条件の最適化

サンドイッチ E L I S A 検出系を用いる場合に B o N T / A 中毒に感受性が高い細胞を含んでなる細胞株に関する最適な分化条件を決定するために、種々の細胞培養培地および分化時間の長さの双方を試験した。

最適な分化培地を決定するために、S i M a 細胞株から適当な密度の細胞を、以下の培地および分化サプリメント：1) R P M I 1 6 4 0、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン-ストربتマイシン、2 mM L-グルタミンおよび 25 μg/mL G T 1 b)；2) R P M I - 1 6 4 0、1×B 2 7 サプリメント、1×N 2 サプリメントおよび 25 μg/mL G T 1 b)；3) 最小必須培地、1×B 2 7 サプリメント、1×N 2 サプリメントおよび 25 μg/mL G T 1 b)；ならびに 4) R P M I - 1 6 4 0、10% B S A、1×N 2 サプリメント、1×N G F サプリメントおよび 25 μg/mL G T 1 b)；のうちの 1 つを 1 mL 含有する、I V 型コラーゲンでコーティングされた 24 ウェル細胞培養プレートのウェルに蒔いた。細胞を 37℃のインキュベーター中 5%二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで（およそ 3 日）インキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そして 0（未処理試料）、0.2 pM、2 pM または 20 pM B o N T / A 複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。一晚処理した後、細胞を洗浄し、毒素を伴わずにさらに 2 日間インキュベートして S N A P - 2 5 基質の切断を可能にし、そしてセクション 1 にて前記されたように採取した。細胞ライゼートのタンパク質濃度をブラッドフ

40

50

ォードアッセイにより測定した。ECLサンドイッチELISA分析によるSNAP-25切断生成物の存在の検出を、第1抗体対を使用して前記されたように実施した。実施例1にて論じられたように、未分化型細胞は分化型細胞ほど効果的に毒素を取り込まなかった。BoNT/A取り込みおよび結果的にSNAP-25切断を増大するために最も効果的な分化培地は培地3(MEM+N2+B27)、続いて培地2(RPMI-1640+N2+B27)、および培地4(RPMI-1640+N2+NGF+BSA)(図3)。培地2中で培養された細胞は、その他の培地と比較して、SNAP-25のさらなる切断を招いた。

【0231】

最適な分化時間を決定するために、SiMa細胞株から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う2mM GlutaMAX(商標)I、1×B27サプリメント、1×N2サプリメント、0.1mM非必須アミノ酸、10mM HEPESおよび25μg/mL

GT1bを含有する血清不含培地100μLを含有する、ポリ-D-リジンコーティングされた96ウェル細胞培養プレートのウェルに蒔いた。6時間、24時間、48時間および72時間試験する分化時間経過を得るために細胞を異なる4日に蒔き、そして37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下でインキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そして0(未処理試料)、0.1pM、0.2pM、0.4pM、0.8pM、1.6pM、3.1pM、6.25pM、12.5pMまたは25pM BoNT/A複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。一晚処理した後、細胞を洗浄し、毒素を伴わずにさらに2日間インキュベートしてSNAP-25基質の切断を可能にし、そしてセクション1にて前記されたように採取した。採取した後、細胞ライゼートのタンパク質濃度およびECLサンドイッチELISA分析によるSNAP-25切断生成物の存在の検出を前記されたように実施した。次いでECL撮像装置から得られた生データをSigmaPlot v.9.0に移し、そして4パラメーターロジスティック適合を用いて用量-応答曲線を定義した。

データをプロットする場合に、4パラメーターロジスティック関数に用いられる制約はなかった。以下の分析を用いてグラフレポートを作成した：R²(相関係数)、a(データセットに関して最大)、b(傾き)およびX₀±SE(EC₅₀値±標準誤差)。結果により、48-72時間分化した細胞で2pM未満のEC₅₀値を達成できることが示された(図4)。分化の48時間から72時間の間の分化型細胞を使用でき、細胞の性能における有意な変化を伴わないという知見はアッセイの頑健性を強調した。48時間未満の分化時間は処方された生成物のピコモル濃度の試験に適当ではないかもしれないが、これらの短い分化時間はバルク原薬試験には十分鋭敏である。

【0232】

4. BoNT/A処理時間の最適化

BoNT/Aで処理される必要のある細胞株からの細胞に最適な時間の長さを決定するために、種々の長さのBoNT/A処理時間を試験した。SiMa細胞株から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う2mM GlutaMAX(商標)I、1×B27サプリメント、1×N2サプリメント、0.1mM非必須アミノ酸、10mM HEPESおよび25μg/mL GT1bを含有する血清不含培地100μLを含有する、ポリ-D-リジンコーティングされた96ウェル細胞培養プレートのウェルに蒔いた。細胞を蒔き、そして37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで(およそ3日)インキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そしてRPMI1640成長培地中0(未処理試料)、0.1pM、0.2pM、0.4pM、0.8pM、1.6pM、3.1pM、6.3pM、12.5pMまたは25pM BoNT/A複合体のいずれかを含有する新鮮培地で3検体ずつ置き換えて、全用量-応答を作成した。5つの異なる長さのBoNT/A処理計画を実施した：1) BoNT/A 6時間処理、細胞の除去および洗浄、BoNT/Aを伴わずに18時間の細胞のインキュベーション、ならびにセクション1にて前記されたような細胞の採取；2) BoNT/A 24時間処理、細胞の除去および洗浄、ならびにセクション1にて前記されたような細胞の採取；3) BoNT/A

A 24時間処理、細胞の除去および洗浄、B o N T / Aを伴わずに24時間の細胞のインキュベーション、ならびにセクション1にて前記されたような細胞の採取；4) B o N T / A 24時間インキュベーション、細胞の除去および洗浄、B o N T / Aを伴わずに48時間の細胞のインキュベーション、ならびにセクション1にて前記されたような細胞の採取；ならびに5) B o N T / A 24時間インキュベーション、細胞の除去および洗浄、B o N T / Aを伴わずに72時間の細胞インキュベーション、ならびにセクション1にて前記されたような細胞の採取。採取した後、細胞ライゼートのタンパク質濃度、E C LサンドイッチE L I S AによるS N A P-25切断生成物の検出を実施し、そして前記されたようにE C₅₀を計算した。結果により、試験されたいずれかのB o N T / A処理で2 p M未満のE C₅₀値を達成できることが示される(図5)。興味深いことに、24時間+24時間、24時間+48時間および24時間+73時間のB o N T / A処理計画により本質的に同じE C₅₀値、各々1.0 p M、1.1 p Mおよび0.9 p Mを生じた。6時間+18時間および24時間+0時間のB o N T / A処理計画に関して生じたE C₅₀値は各々1.7 p Mおよび1.6 p Mであった。得られたシグナルの量は低い、これらの結果により、6時間から24時間の間のB o N T / A処理時間、加えて1日から3日の処理後インキュベーションを用いて、B o N T / A活性を検出するために十分であるE C₅₀を生じ、そしてアッセイの全体的な時間経過において柔軟性を与えることができることが示される。

10

【0233】

5. B o N T / A活性を検出する免疫基盤の方法の感度

20

本明細書において開示されるB o N T / A活性を検出する免疫基盤の方法の感度を評価するために、B o N T / A中毒に感受性が高い細胞によるB o N T / A取り込みのタイミングを決定した。S i M a細胞株から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う2 m M GlutaMAX (商標) I、1×B 27サプリメント、1×N 2サプリメント、0.1 m M非必須アミノ酸、10 m M H E P E Sおよび20 μ g / m L G T 1 bを含有する血清不含培地100 μ Lを含有する、ポリ-Dーリジンコーティングされた96ウェル細胞培養プレートのウェルに蒔いた。細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで(およそ3日)インキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、1 n M B o N T / A複合体を含有する新鮮培地で置き換え、そしてB o N T / A処理細胞を、0分(神経毒を添加し、そして次に即座に除去した)、5分、10分、20分、30分および60分の6つの異なる時点でインキュベートした。B o N T / Aを伴わない(0 n M)培地の陰性対照を使用した。インキュベーションの後、細胞を洗浄し、そしてセクション1にて前記されたように採取した。採取の後、細胞ライゼートのタンパク質濃度、E C LサンドイッチE L I S AによるS N A P-25切断生成物の検出を実施し、そして前記されたようにE C₅₀を計算した。結果により、バックグラウンドを超える有意な量のS N A P-25切断生成物を生成する前に、細胞によるB o N T / Aの取り込みに1分未満しかかからないことが示された(図6)。

30

【0234】

6. B o N T / A活性を検出する免疫基盤の方法の特異性

40

本明細書において開示されるB o N T / A活性を検出する免疫基盤の方法の特異性を評価するために、部分的に不活化されたB o N T / Aを除外してB o N T / Aを正確に区別する、B o N T / A中毒に感受性が高い細胞の受容力を決定した。S i M a細胞株から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う2 m M GlutaMAX (商標) I、1×B 27サプリメント、1×N 2サプリメント、0.1 m M非必須アミノ酸、10 m M H E P E Sおよび25 μ g / m L G T 1 bを含有する血清不含培地100 μ Lを含有する、ポリ-Dーリジンコーティングされた96ウェル細胞培養プレートのウェルに蒔いた。細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで(およそ3日)インキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そして1) 0 (未処理試料)

50

、0.03 pM、0.1 pM、0.31 pM、0.93 pM、2.78 pM、8.33 pMおよび25 pM B o N T / A 複合体；2) 0、0.14 nM、0.41 nM、1.23 nM、3.7 nM、11.11 nM、33.33 nMおよび100 nM 不活性B o N T / A (i B o N T / A) ；または3) 0、0.14 nM、0.41 nM、1.23 nM、3.7 nM、11.11 nM、33.33 nMおよび100 nM L H_N / Aフラグメントのいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。i B o N T / Aは神経毒のメタロプロテアーゼ活性を完全に不活化する軽鎖の亜鉛結合ドメインに変異を含有し、例えば「ボツリヌス神経毒Aの軽鎖の発現および精製：単一の変異が重鎖との再構成後のS N A P - 25のその切断および神経毒性を無効にする」Li Qing Zhou, et al., Biochemistry 34: 15175-15181 (1995) (その全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする)を参照されたい。L H_N / Aフラグメントは結合ドメインを欠如するが、インタクトな転位置ドメインおよび軽鎖を含有し、例えば「組換え毒素フラグメント」Clifford C. Shoneら、米国特許第6461617号(その全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする)を参照されたい。24時間の処理の後、細胞を洗浄し、毒素を伴わずにさらに2日間インキュベートしてS N A P - 25基質の切断を可能にし、そしてセクション1にて前記されたように採取した。採取した後、細胞ライゼートのタンパク質濃度、E C LサンドイッチE L I S AによるS N A P - 25切断生成物の検出を実施し、そして前記されたようにE C₅₀を計算した。結果により、i B o N T / AおよびL H_N / A (E C₅₀ > 100 nM)に関する細胞の結合アフィニティーはB o N T / A (E C₅₀ = 1.6 pM)に関する結合アフィニティーよりも少なくとも60,000低いことが示される(図7)。試験された全濃度のi B o N T / Aで処理された細胞においてS N A P - 25切断生成物は検出されなかった。最高用量のL H_N / Aフラグメントで処理された細胞において低量のS N A P - 25切断生成物が検出されたが、この活性は転位置ドメインの活性によるこのフラグメントの非特異的取り込みによるものである。故に結果により、本明細書において開示されるB o N T / A活性を検出する免疫基盤の方法は、それによりB o N T / Aがタンパク質分解によりS N A P - 25基質を切断し、そしてB o N T / AのB o N T / A受容体への結合、神経毒/受容体複合体の内部移行、B o N T / A軽鎖の細胞内小胞から細胞質への転位置およびS N A P - 25のタンパク質分解による切断を包含する中毒過程に関与する全ての工程を測定できることが示される。

【実施例6】

【0235】

E C LサンドイッチE L I S Aを用いてB o N T / A活性を検出する免疫基盤の方法

以下の実施例は、E C LサンドイッチE L I S Aを用いてB o N T / A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 25切断生成物に特異的なα-S N A P - 25モノクローナル抗体を使用してS N A P - 25切断生成物を検出することによりB o N T / A活性を検出する免疫基盤の方法を例証する。

B o N T / Aで処理された細胞からライゼートを調製するために、確立された細胞株から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う2 mM GlutaMAX (商標) I、1 × B 27サプリメント、1 × N 2サプリメント、0.1 mM非必須アミノ酸、10 mM H E P E Sおよび25 μg/mL G T 1 bを含有する血清不含培地100 μLを含有する96ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた(実施例1および2参照)。これらの細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで(およそ3日)インキュベートした。分化型細胞からの培地を各ウェルから吸引し、そして0(未処理試料)、0.03 pM、0.1 pM、0.3 pM、0.9 pM、2.8 pM、8.3 pMおよび25 pM B o N T / A複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。24時間の処理の後、細胞を洗浄し、そして毒素を伴わずにさらに2日間インキュベートした。実施例5に記載されるように細胞を採取した。

【0236】

α-S N A P - 25捕捉抗体溶液を調製するために、ハイブリドーマ細胞株2 E 2 A 6

からの腹水に含有される α -SNAP-25モノクローナル抗体を標準的なプロテインA精製プロトコルを用いて精製した。 α -SNAP-25検出抗体溶液を調製するために、 α -SNAP-25ウサギポリクローナル抗体S9684 (Sigma, St. Louis, MO)を製造者の説明書に従って(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)ルテニウム(I I)ートリスービピリジン(4-メチルスルホナート)NHSEステル標識試薬(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)に抱合させた。抱合反応、標識された α -SNAP-25抗体の精製、濃度決定および保存は実施例5に記載されるとおりであった。

【0237】

SNAP-25切断生成物に特異的である捕捉抗体を含んでなる固相支持体を調製するために、 α -SNAP-25モノクローナル抗体2E2A6溶液(1×PBS中20 μ g/mL)およそ5 μ Lを96ウェルMSD High Bindプレートの各ウェルに添加し、そして生物学的安全キャビネット内で2-3時間空気乾燥させて溶液を液体蒸発させた。次いで捕捉抗体結合ウェルを遮断し、そしてBoNT/A活性を直接検出するために使用した。

【0238】

ECLSاندイッチELISA分析によりSNAP-25切断生成物の存在を検出するために、保存されたプレートからの遮断バッファをウェルから吸引し、BoNT/Aで処理された細胞からのライゼート25 μ Lを各ウェルに添加し、そしてプレートを4℃で一晩インキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして1×PBS、0.1%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)200 μ Lで各ウェルを3回濯ぐことによりプレートウェルを3回洗浄した。洗浄後、1×PBS、0.1%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)中2%Amersham遮断試薬を含んでなる5 μ g/mL検出抗体溶液25 μ Lを各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを室温で1時間振盪しながらインキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを1×PBS、0.1%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)200 μ Lで3回洗浄した。洗浄後、1×リードバッファ(Read Buffer)(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)150 μ Lを各ウェルに添加し、そしてプレートをSECTOR(商標)Imager 6000イメージリーダー(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)を使用して読み取った。収集されたデータを分析し、そして実施例5に記載されるようにEC₅₀を計算した。代表的な結果を図8に示す、これらの結果により、下の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約15:1から約20:1および上の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約20:1から約500:1でEC₅₀のBoNT/A代表値1.0 pMが検出される(約0.3 pMから約2.0 pMの範囲)ことが示された。

【実施例7】

【0239】

CLサンドイッチELISAを用いてBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法

以下の実施例はCLサンドイッチELISAによるBoNT/A切断部位切断可能結合のP₁残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25に特異的な α -SNAP-25モノクローナル抗体を使用してSNAP-25切断生成物を検出することによりBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法を例証する。

細胞からのライゼートをBoNT/Aで処理し、そして α -SNAP-25捕捉抗体溶液を実施例6に記載されるように調製した。

α -SNAP-25検出抗体溶液を調製するために、 α -SNAP-25ポリクローナル抗体S9684 (Sigma, St. Louis, MO)を製造者の説明書に従って(Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL)西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)に抱合させた。1mg/mL α -SNAP-25ポリクローナル抗体500 μ Lを、凍結乾燥活性化ペルオキシダーゼを含有するバイアルに添加し、構成要素を混合し、そして次にシアノ水素化ホウ素ナトリウム10 μ Lを添加することにより抱合反応を実施した。この反応混合物をドラフト内で室温で1時間インキュベートした。反応をクエンチした後、標準的なスピнкаラムプロトコルを用いて標識された抗体を精製し、そして標準的な比色タンパク質ア

ッセイを用いてタンパク質濃度を決定した。分光光度計を使用して α -SNAP-25ポリクローナル抗体／HRP抱合体の吸光度を455nmで測定してリットルあたりのモル濃度を決定した。 α -SNAP-25検出抗体溶液を必要になるまで4℃で保存した。

【0240】

SNAP-25切断生成物に特異的である α -SNAP-25捕捉抗体を含んでなる固相支持体を調製するために、 α -SNAP-25モノクローナル抗体2E2A6溶液(1×PBS中1mg/mL)およそ100μLを96ウェルGreinerホワイトプレートの各ウェルに添加し、そして4℃でプレートを一晚インキュベートし、そして次に過剰の抗体溶液を捨てた。次いで2%Amersham遮断試薬(GE Life Sciences, Piscataway, NJ)および10%ヤギ血清(VWR, West Chester, PA)を含んでなる遮断バッファ150μLを室温で1時間添加することにより、捕捉抗体結合ウェルを遮断した。遮断バッファを捨て、そしてプレートをペーパータオル上でひっくり返し、そして軽くたたくことによりプロット乾燥した。次いで捕捉抗体結合ウェルを遮断し、そしてBoNT/A活性を直接検出するために使用した。

【0241】

CLサンドイッチELISA分析によりSNAP-25切断生成物の存在を検出するために、BoNT/Aで処理された細胞からのライゼート50μLを各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを500rpmで回転している振盪機上で4℃で2-4時間から一晚インキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして1×PBS、0.05%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)200μLで各ウェルを3回濯ぐことによりプレートウェルを洗浄した。洗浄後、1×PBS、0.1%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)中2%Amersham遮断試薬を含んでなる1mg/mL α -SNAP-25ポリクローナル抗体／HRP検出抗体溶液100μLを各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを650rpmで回転している振盪機上で室温で1時間インキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを1×PBS、0.05%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)200μLで3回洗浄した。洗浄後、SuperSignal ELISA Pico 1:1混合物(Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL)100μLを各ウェルに添加し、そしてルミノメーター(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を使用して395nmで読み取った。収集されたデータを分析し、そして実施例5に記載されるようにEC₅₀を計算した。これらの結果により、下の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約15:1から約20:1および上の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約20:1から約500:1でEC₅₀のBoNT/A代表値1.0pMが検出される(約0.3pMから約2.0pMの範囲)ことが示された。

【実施例8】

【0242】

マルチプレックスECCLサンドイッチELISAを使用してBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法

以下の実施例はSNAP-25切断生成物に特異的な α -SNAP-25モノクローナル抗体および異なるタンパク質に関する第2の抗体対を使用してSNAP-25切断生成物を検出することによりBoNT/A活性を検出するマルチプレックス免疫基盤の方法を例証する。

【0243】

1. 第2のタンパク質に関する捕捉抗体-検出抗体対の調製および同定

分析のための未処理細胞ライゼートを得るために、SiMa細胞のストック培養物から適当な密度の細胞を、1×RPMI1640、10%FBS、0.1mM非必須アミノ酸、10mM HEPES、1mMピルビン酸ナトリウムおよび100単位/100μgペニシリン-ストレプトマイシンを含有する成長培地40mLを含有するT175フラスコに播種した。これらの細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、細胞がお

よそ70-90%コンフルエントになるまでインキュベートした。細胞を洗浄し、そして新たに調製されたTriton X-100溶解バッファー(20mM Tris(pH7.5)、150mM塩化ナトリウム、0.001M EDTA、1mM EGTAおよび1%Triton-X-100)中4℃でおよそ30分間一定の攪拌を行いながら溶解することにより細胞を採取した。溶解した細胞を3300-3330×g、8℃で40分間遠心して、ベンチトップ遠心を用いてデブリを排除した。

【0244】

第2のタンパク質のための適切な捕捉抗体-検出抗体対を同定するために、5つの異なるタンパク質からなる捕捉および検出抗体対の21個の異なる組み合わせにおいてECLサンドイッチELISA分析を行った(表13)。使用された抗体はα-シンタキシン1 A-HPCマウスモノクローナル抗体S0664(Sigma, St. Louis, MO)、α-GAPDHマウスモノクローナル抗体MAB374(Chemicon, Temecula, CA)、α-シンタキシン1ウサギポリクローナル抗体S1172-1(Sigma, St. Louis, MO)、α-GAPDHウサギポリクローナル抗体2275-PC-1(R&D Systems, Minneapolis, MN)、α-シンタキシン2ウサギポリクローナル抗体S5687(Sigma, St. Louis, MO)、α-ヒトシンタキシン2マウスモノクローナル抗体MAB2936(R&D Systems, Minneapolis, MN)、α-マウスシンタキシン2ヤギポリクローナル抗体AF2568(Sigma, St. Louis, MO)、α-シンタキシン2ウサギポリクローナル抗体AB5596(Sigma, St. Louis, MO)、α-シンタキシン1ウサギポリクローナル抗体S1172-2(Sigma, St. Louis, MO)、α-h、m、rアクチンヒツジポリクローナル抗体AF4000(R&D Systems, Minneapolis, MN)、α-ベータアクチンマウスモノクローナル抗体A1978(Sigma, St. Louis, MO)、α-ベータマウスポリクローナル抗体アクチンA2228(Sigma, St. Louis, MO)、マウスα-GAPDHマウスモノクローナル抗体G8795(Sigma, St. Louis, MO)、α-GAPDHウサギポリクローナル抗体G9595(Sigma, St. Louis, MO)であった。

【0245】

第2のタンパク質捕捉抗体溶液を調製するために、モノクローナル抗体を精製された抗体として購入した。第2のタンパク質検出抗体溶液を調製するために、適切な抗体を製造者の説明書に従って(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)ルテニウム(II)ートリス-スビピリジン-(4-メチルスルホナート)NHSEステル標識試薬(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)に抱合させた。蒸留水で再構成されたMSD SULFO-TAG(商標)ストック溶液30μLを2mg/mLポリクローナル抗体200μLに添加し、そして反応物を暗中室温で2時間インキュベートすることにより抱合反応を実施した。標準的なスピнкаラムプロトコルを用いて標識された抗体を精製し、そして標準的な比色タンパク質アッセイを用いてタンパク質濃度を決定した。分光光度計を使用して抗体/MSD SULFO-TAG(商標)抱合体の吸光度を455nmで測定してリットルあたりのモル濃度を決定した。検出抗体溶液を必要になるまで4℃で保存した。

【0246】

SNAP-25切断生成物に特異的である捕捉抗体を含んでなる固相支持体を調製するために、α-SNAP-25モノクローナル抗体2E2A6溶液(1×PBS中20μg/mL)およそ5μLを96ウェルMSD High Bindプレートの各ウェルに添加し、そして生物学的安全キャビネット内で2-3時間空気乾燥させて溶液を液体蒸発させ、そして次にプレートを密閉し、そして必要になるまで4℃で保存した。次いで3%BSA(Pierce, Rockford, IL)、10%ヤギ血清(Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA)および0.05%TWEEN-20 PBS中Difco 1%脱脂乳(BD BioSciences Franklin Lakes, NJ)を含んでなる遮断バッファー150μLを室温で1-2時間添加することにより、乾燥した捕捉抗体結合ウェルを遮断した。

【0247】

ECLサンドイッチELISA分析によりタンパク質の存在を検出するために、保存されたプレートからの遮断バッファーをウェルから吸引し、前記されたようにBONT/A

で処理された細胞からのライゼート 25 μ L を各ウェルに添加し、そしてプレートを 4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして 1 $\times$ PBS、0.1 %TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）200 μ L で各ウェルを 3 回濯ぐことによりプレートウェルを 3 回洗浄した。洗浄後、前記されたような遮断バッファー中に再懸濁された 5 μ g / mL の適切な第 2 のタンパク質検出抗体溶液 25 μ L を各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを室温で約 1 時間振盪しながらインキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを 1 $\times$ PBS、0.1 %TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）250 μ L で 3 回洗浄した。洗浄後、1 $\times$ リードバッファー（Read Buffer）（Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD）150 μ L を各ウェルに添加し、そしてプレートを SECTOR（商標）Imager 6000 イメージリーダー（Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD）を使用して読み取った。各抗体対に関して未処理細胞ライゼートから得られたシグナルを、各抗体対に関して溶解バッファー対照（0 nM 用量）に関して得られたシグナルにより除することにより比を計算した（表 13）。これらの結果により、試験された抗体対の 21 個の異なる組み合わせの中で 2 個の抗体対のみが試験された高用量に関して 10 : 1 を超えるシグナル対ノイズ比を有した：第 16 対 α -GAPDH マウスモノクローナル抗体 MAB374 および α -GAPDH ウサギポリクローナル抗体 RDS2275-PC-1；ならびに第 21 対： α -GAPDH マウスモノクローナル抗体 MAB374 および α -GAPDH ウサギポリクローナル抗体 G9545。 α -GAPDH マウスモノクローナル抗体 MAB374 および α -GAPDH ウサギポリクローナル抗体 G9545 対をマルチプレックス ECL サンドイッチ ELISA に関する第 2 タンパク質捕捉抗体-検出抗体対として選択した。

10

20

【0248】

【表 1 2 - 1】

表 1 3 第 2 のタンパク質抗体組み合わせのスクリーニング				
抗体対 番号	捕捉抗体	検出抗体	タンパク 質の検出	シグナル／ノイ ズ比 (ライゼート／ バッファー)
1	α －シンタキシン 2 S 5687 pAb	α －シンタキシン 2 M AB2936 mAb	なし	0.92
2	α －シンタキシン 2 A F2568 pAb	α －シンタキシン 2 A B5596 pAb	なし	1.1
3	α －シンタキシン 2 A F2568	α －シンタキシン 2 S5687 pAb	なし	1.11
4	α －シンタキシン 2 A F2936 pAb	α －シンタキシン 2 A B5596 pAb	あり	1.63
5	α －シンタキシン 2 A F2936 pAb	α －シンタキシン 2 S 5687 pAb	あり	1.6
6	α －シンタキシン 2 A B5596 pAb	α －シンタキシン 2 S 5687 pAb	なし	0.82
7	α －シンタキシン 2 A B5596 pAb	α －シンタキシン 2 M AB2936 mAb	なし	0.87
8	α －シンタキシン 2 M AB2936 mAb	α －シンタキシン 2 A B5596 pAb	あり	1.2
9	α －シンタキシン 2 M AB2936 mAb	α －シンタキシン 2 S 5687 pAb	なし	1.07
10	α －シンタキシン S0 664 mAb	α －シンタキシン 1 S 1172－1 pAb	あり	4.23

10

20

30

【表 1 2 - 2】

11	α -シンタキシン S0 664 mAb	α -シンタキシン 1 S 1172-2 pAb	なし	1.21
12	α -シンタキシン 1 S 1172-1 pAb	α -シンタキシン S0 664 mAb	あり	5.5
13	α -シンタキシン 1 S 1172-2 pAb	α -シンタキシン S0 664 mAb	あり	2.5
14	α -h,m,r アクチン AF 4000 pAb	α -beta アクチン A19 78 mAb	なし	1.04
15	α -h,m,r アクチン AF 4000 pAb	α -beta アクチン A22 28 mAb	なし	1.08
16	α -GAPDH MAB374 m Ab	α -GAPDH 2275-PC -1 pAb	あり	20.04
17	α -GAPDH MAB374 m Ab	α -GAPDH G8795 mA b	なし	0.89
18	α -GAPDH 2275-PC -1 pAb	α -GAPDH MAB374 m Ab	なし	1.08
19	α -GAPDH 2275-PC -1 pAb	α -GAPDH G8795 mA b	あり	1.27
20	α -GAPDH G8795 mA b	α -GAPDH 2275-PC -1 pAb	あり	2.74
21	α -GAPDH MAB374 m Ab	α -GAPDH G9545 pA b	あり	≥ 100

10

20

【0 2 4 9】

2. マルチプレックス E C L サンドイッチ E L I S A を使用して B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法

30

分析のための B o N T / A 処理細胞ライゼートを得るために、S i M a 細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う 2 m M GlutaMAX (商標) I、1 $\times$ B 2 7 サプリメント、1 $\times$ N 2 サプリメント、0.1 m M 非必須アミノ酸、10 m M H E P E S を含有する血清不含培地を含有するポリ-D-リジン 9 6 - ウェルプレートに播種した。これらの細胞を 3 7 $^{\circ}$ C のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで (およそ 3 日) インキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そして 0 (未処理試料)、0.6 7 単位 / m L、2.3 5 単位 / m L、8.2 3 単位 / m L、2 8.8 2 単位 / m L、1 0 1 単位 / m L、3 5 3 単位 / m L B o N T / A 複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。2 4 時間の処理の後、細胞を洗浄し、毒素を伴わずにさらに 2 日間インキュベートした。細胞を洗浄し、採取し、そしてセクション 1 にて前記されたように加工した。

40

【0 2 5 0】

α -S N A P - 2 5 捕捉抗体溶液および α -S N A P - 2 5 検出抗体溶液を実施例 7 に記載されるように調製した。 α -G A P D H 捕捉抗体溶液を調製するために、 α -G A P D H モノクローナル抗体マウス M A B 3 7 4 (Chemicon, Temecula, CA) を前記のセクション 1 に記載されるように調製した。 α -G A P D H 検出抗体溶液を調製するために、 α -G A P D H ウサギポリクローナル抗体 G 9 5 4 5 (Sigma, St. Louis, MO) を製造者の説明書に従って (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) ルテニウム (I I) - トリス-ビピリジン- (4-メチルスルホナート) N H S エステル標識試薬 (Meso Scale Dis

50

covery, Gaithersburg, MD) に抱合させた。抱合反応、標識された α -SNAP-25 抗体の精製、濃度決定および保存は前記のセクション 1 に記載されたとおりであった。

【0251】

α -SNAP-25 捕捉抗体および α -GAPDH 捕捉抗体を含んでなる固相支持体を調製するために、 α -SNAP-25 捕捉抗体溶液 ($1 \times \text{PBS}$ 中 $45 \mu\text{g}/\text{mL}$) およそ 2.5 nL および α -GAPDH 捕捉抗体溶液 ($1 \times \text{PBS}$ 中 $120 \mu\text{g}/\text{mL}$) 2.5 nL をロボットシステムを用いてマルチプレックス形式の 96 ウェル MSD High Bind プレートの各ウェルに添加した。生物学的安全キャビネット内で少なくとも 2-3 時間空気乾燥させて溶液を液体蒸発させた。次いで捕捉抗体結合ウェルを遮断し、そして BONT/A 活性および GAPDH タンパク質を直接検出するために使用した。

10

【0252】

マルチプレックス ECL サンドイッチ ELISA 分析によ SNAP-25 切断生成物の存在を検出するために、保存されたプレートからの遮断バッファをウェルから吸引し、前記されたように BONT/A で処理された細胞からのライゼート $25 \mu\text{L}$ を各ウェルに添加し、そしてプレートを 4°C で一晩インキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして $1 \times \text{PBS}$ 、 0.1% TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート) $200 \mu\text{L}$ で各ウェルを 3 回濯ぐことによりプレートウェルを 3 回洗浄した。洗浄後、前記されたような $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ α -SNAP-25 検出抗体溶液 $25 \mu\text{L}$ および $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ α -GAPDH 検出抗体 $25 \mu\text{L}$ を各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを室温で約 1 時間振盪しながらインキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを $1 \times \text{PBS}$ 、 0.1% TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート) $250 \mu\text{L}$ で 3 回洗浄した。洗浄後、 $1 \times$ リードバッファ (Read Buffer) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) $150 \mu\text{L}$ を各ウェルに添加し、そしてプレートを SECTOR (商標) Imager 6000 イメージリーダー (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) を使用して読み取った。収集されたデータを分析し、そして PL A 2.0 ソフトウェア (Stegmann Systems, GmbH, Germany) を使用した以外は実施例 5 に記載されるように正規化されたデータから相対効力を計算する。

20

【0253】

比較として、シングルプレックス ECL サンドイッチ ELISA を用いて実施例 6 に記載されるように SNAP-25 切断生成物の検出をも実施した。

30

【0254】

結果により、シングルプレックス ECL サンドイッチ ELISA から得られた SNAP-25 データにより、またはマルチプレックス ECL サンドイッチ ELISA から得られた非正規化 SNAP-25 データから、用量-応答曲線に適合しなかった 1 つの異常値試料が表されることが示された。しかしながら、SNAP-25 データの GAPDH データに対する正規化により、良好な曲線適合が示され、そして効力が予期された値により近似した。

【実施例 9】

【0255】

マルチプレックス ECL サンドイッチ ELISA を使用して BONT/A 活性を検出する免疫基盤の方法

40

以下の実施例は SNAP-25 切断生成物に特異的な α -SNAP-25 モノクローナル抗体および異なるタンパク質に関する第 2 の抗体対を使用して SNAP-25 切断生成物を検出することにより BONT/A 活性を検出するマルチプレックス免疫基盤の方法を例証する。

【0256】

BONT/A で処理された細胞からライゼートを実施例 6 に記載されるように調製した。 α -SNAP-25 捕捉抗体溶液、 α -SNAP-25 検出抗体溶液および α -SNAP-25 固相支持体を実施例 7 に記載されるように調製した。

50

【0257】

α -GAPDH捕捉抗体溶液を調製するために、 α -GAPDHモノクローナル抗体MAB374 (Millipore, Billerica, MA) を精製された抗体として購入した。 α -GAPDH検出抗体溶液を調製するために、 α -GAPDHポリクローナル抗体G9545 (Sigma, St. Louis, MO) を製造者の説明書に従って (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) に抱合させた。抱合反応、濃度決定および保存は実施例7に記載されたとおりであった。

【0258】

第2のタンパク質に特異的な第2の捕捉抗体を含んでなる固相支持体を調製するために、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ α -GAPDHモノクローナル抗体MAB374を含んでなるモノクローナル抗体溶液およそ $100\mu\text{L}$ を96ウェルGreinerホワイトプレートの各ウェルに添加し、そして 4°C で一晩インキュベートし、そして次に過剰の抗体溶液を捨てた。次いで2%Amersham遮断試薬 (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) および10%ヤギ血清 (VWR, West Chester, PA) を含んでなる遮断バッファー $150\mu\text{L}$ を室温で1時間添加することにより、 α -GAPDH捕捉抗体結合ウェルを遮断した。遮断バッファーを捨て、そしてプレートをペーパータオル上でひっくり返し、そして軽くたたくことによりプロット乾燥した。次いで捕捉抗体結合ウェルを遮断し、そしてBoNT/A活性を直接検出するために使用した。

【0259】

マルチプレックスCLサンドイッチELISA分析によりSNAP-25切断生成物の存在を検出するために、BoNT/Aで処理された細胞からの細胞ライゼート $50\mu\text{L}$ を α -SNAP-25捕捉抗体固相支持体および α -GAPDH捕捉抗体固相支持体の各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを 500rpm で回転している振盪機上で 4°C で2-4時間から一晩インキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして $1\times\text{PBS}$ 、0.05%TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート) $200\mu\text{L}$ で各ウェルを3回濯ぐことによりプレートウェルを3回洗浄した。洗浄後、 $1\times\text{PBS}$ 、0.1%TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート) 中2%Amersham遮断試薬を含んでなる検出抗体溶液 $100\mu\text{L}$ および $1\text{mg}/\text{mL}$ α -SNAP-25ポリクローナル抗体/HRPを、 α -SNAP-25捕捉抗体固相支持体の各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを 650rpm で回転している振盪機上で室温で1時間インキュベートした。類似して $1\times\text{PBS}$ 、0.1%TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート) 中2%Amersham遮断試薬を含んでなる検出抗体溶液 $100\mu\text{L}$ および $0.25\text{mg}/\text{mL}$ α -GAPDH G9545ポリクローナル抗体/HRP (Sigma Co., St Louis, MO) を、 α -GAPDH捕捉抗体固相支持体の各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを室温で 650rpm で回転している振盪機上に室温で1時間置いた。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを $1\times\text{PBS}$ 、0.05%TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート) $200\mu\text{L}$ で3回洗浄した。洗浄後、SuperSignal ELISA Pico 1:1混合物 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) $100\mu\text{L}$ を各ウェルに添加し、ルミノメーター (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を使用して 395nm で読み取った。収集されたデータを分析し、そして実施例5に記載されるように EC_{50} を計算した。結果により、検出された α -SNAP-25抗体-抗原複合体の量に関して収集されたデータポイントは、検出された α -GAPDH抗体-抗原複合体の量に対して正規化された後に良好に適合し、それによりさらに正確な読みを生じることが示された。これらの結果により、下の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約15:1から約20:1および上の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約20:1から約500:1で EC_{50} のBoNT/A代表値 1.0pM が検出される (約 0.3pM から約 2.0pM の範囲) ことが示された。

【0260】

類似の設計を、同じ α -GAPDH 抗体対を伴う ECL サンドイッチ ELISA を用いて BONT/A 切断部位切断可能結合の P₁ 残基でカルボキシル末端を有する SNAP-25 切断生成物に特異的な α -SNAP-25 モノクローナル抗体を使用して SNAP-25 切断生成物を検出することにより BONT/A 活性を検出するマルチプレックス免疫基盤の方法に用いることができる。

【実施例 10】

【0261】

ピコモル濃度の BONT/A を検出するための免疫基盤の方法

以下の実施例はピコモル濃度の、例えば BOTOX（登録商標）、DYSPORT（登録商標）／RELOXIN（登録商標）、PURTOX（登録商標）、XEOMIN（登録商標）、NEURONOX（登録商標）または BTX-A のような BONT/A 医薬品を検出することができる BONT/A 活性を検出する免疫基盤の方法を実施する仕方を例証する。

1. ECL サンドイッチ ELISA を用いて BONT/A を検出する免疫基盤の方法

BONT/A で処理された細胞からライゼートを調製するために、確立された細胞株からおよそ 50,000 から 150,000 セルを、最小必須培地、アール塩を伴う 2 mM GlutaMAX（商標）I、1×B27 サプリメント、1×N2 サプリメント、0.1 mM 非必須アミノ酸、10 mM HEPES および 25 μ g/mL GT1b を含有する血清不含培地 100 μ L を含有する 96 ウェル組織培養ポリ-D-リジンプレートのウェルに蒔いた（実施例 1 および 2 参照）。これらの細胞を 37℃ のインキュベーター中 5% 二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで（およそ 2 から 3 日）インキュベートした。分化型細胞からの培地を各ウェルから吸引し、そして塩化ナトリウム不含溶液で再構成された 0（未処理試料）、0.03 pM、0.1 pM、0.3 pM、0.9 pM、2.8 pM、8.3 pM もしくは 25 pM BONT/A 医薬品；または塩化ナトリウム不含溶液で再構成された 0（未処理試料）、0.7 単位/mL、2.1 単位/mL、6.2 単位/mL、18.5 単位/mL、55.6 単位/mL、166.7 単位/mL もしくは 500 単位/mL BONT/A 医薬品のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。BONT/A 医薬品は塩化ナトリウムを含有するので、培養培地へのその添加は、細胞生存性に有害である高張培地を招いた。高張の問題を免れるために、塩化ナトリウムを伴わずに作成された MEM 培地 200 μ L を使用して BONT/A 医薬品を再構成して、最終濃度 25 pM BONT/A（500 単位/mL）が得られた。希釈を、用いられた最高濃度（25 pM または 500 単位/mL）で存在する賦形剤の量に対応させるために、使用された培地に塩化ナトリウムを添加することにより、全濃度に関して用量-応答曲線に沿ってマトリックスを一定に保った。24 時間の処理の後、細胞を洗浄し、そして毒素を伴わずにさらに 2 日間インキュベートした。細胞を採取するために培地を吸引し、1×PBS で洗浄し、そして 50 mM HEPES、150 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM EGTA、1% Triton X-100 を含んでなる溶解バッファーを各ウェルに添加することにより溶解し、そしてプレートを 500 rpm で回転している振盪機上で 4℃ で 30 分間インキュベートした。プレートを 4000 rpm、4℃ で 20 分間遠心して、細胞デブリをペレット化し、そして上澄を捕捉抗体コーティングされた 96 ウェルプレートに移して検出工程を実施した。

【0262】

α -SNAP-25 捕捉抗体溶液、 α -SNAP-25 検出抗体溶液、および SNAP-25 切断生成物に特異的である捕捉抗体を含んでなる固相支持体を実施例 6 に記載されるように調製した。

【0263】

ECL サンドイッチ ELISA 分析により SNAP-25 切断生成物の存在を検出するために、保存されたプレートから遮断バッファーを吸引し、BONT/A で処理された細胞からのライゼート 25 μ L を各ウェルに添加し、そしてプレートを 4℃ で 2 時間または 24 時間のいずれかでインキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして 1×PBS

、0.1%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）200 μ Lで各ウェルを3回濯ぐことによりプレートウェルを3回洗浄した。洗浄後、1 $\times$ PBS、0.1%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）中2%Amersham遮断試薬を含んでなる5 μ g/mL α -SNAP-2 検出抗体溶液25 μ Lを各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを室温で1時間振盪しながらインキュベートした。 α -SNAP-2 5 検出抗体をインキュベートした後、ウェルを1 $\times$ PBS、0.1%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）200 μ Lで3回洗浄した。洗浄後、プレートを加工し、収集されたデータを分析し、そして実施例5に記載されるようにEC₅₀を計算した。これらの結果により、下の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約15：1から約20：1および上の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約20：1から約500：1でEC₅₀のBoNT/A代表値1.0 pMが検出された（約0.3 pMから約2.0 pMの範囲）（図9）。この方法を実施例8に記載されるようにマルチプレックス様式で実施することもできる。

10

【0264】

2. CLサンドイッチELISAを用いてBoNT/Aを検出する免疫基盤の方法

BoNT/Aで処理された細胞からのライゼートおよび α -SNAP-2 5 捕捉抗体溶液を実施例6に記載されるように調製する。 α -SNAP-2 5 検出抗体溶液およびSNAP-2 5 切断生成物に特異的である捕捉抗体を含んでなる固相支持体を実施例7に記載されるように調製する。

20

【0265】

CLサンドイッチELISA分析によりSNAP-2 5 切断生成物の存在を検出するために、BoNT/Aで処理された細胞からのライゼート25 μ Lを各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを500 rpmで回転している振盪機上で4 $^{\circ}$ Cで2時間または24時間のいずれかでインキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして1 $\times$ PBS、0.05%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）200 μ Lで各ウェルを3回濯ぐことによりプレートウェルを3回洗浄する。洗浄後、1 $\times$ PBS、0.1%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）中2%Amersham遮断試薬を含んでなる1mg/mL α -SNAP-2 5 ポリクローナル抗体/HRP検出抗体溶液100 μ Lを各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを650 rpmで回転している振盪機上で室温で1時間インキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを1 $\times$ PBS、0.05%TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）200 μ Lで3回洗浄する。洗浄後、SuperSignal ELISA Pico 1：1 混合物（Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL）100 μ Lを各ウェルに添加し、ルミノメーター（Molecular Devices, Sunnyvale, CA）を使用して395 nmで読み取る。収集されたデータを分析し、そして実施例5に記載されるようにEC₅₀を計算する。この方法を実施例8に記載されるようにマルチプレックス様式で実施することもできる。

30

【実施例11】

40

【0266】

α -BoNT/A中和抗体を検出する免疫基盤の方法

以下の実施例は α -BoNT/A中和抗体の存在を検出することができる免疫基盤の方法を実施する仕方を例証する。

BoNT/Aは現在、筋肉運動亢進、眼科、胃腸管、泌尿器科および化粧品を含む広範囲の医療適用に使用されている。BoNT/Aの長期間処置を繰り返すと、患者は毒素に対する α -BoNT/A中和抗体を発達させて、免疫抵抗性に至り得る。 α -BoNT/A中和抗体はBoNT/Aの結合ドメイン（H_C）および/または転位置ドメイン（H_N）に結合することにより、毒素のニューロン細胞への取り込みを停止させることによりBoNT/A活性を阻止する。いくつかの研究により、ジストニアに関してBoNT/Aの

50

処方で繰り返し処置された患者の5-10%までが、 α -B o N T / A 中和抗体を発達させることによる免疫抵抗性を有することが示唆されている。患者の血液中の α -B o N T / A 中和抗体の存在を決定するための確立されたアッセイは、マウス保護アッセイ (M P A) である。現在はB o N T / A はマウスへの注射の前に患者の血清と共にインキュベートされる。抗体の存在は、動物における神経毒に対する応答の低下により顕在化される。M P A はビボ基盤のアッセイであるので、それが細胞基盤のアッセイで置き換えられると、費用および時間がさらに効率的になるであろう。

【0267】

α -B o N T / A 中和抗体の存在または不在を検出するために、本明細書に開示されるB o N T / A 活性を決定する免疫基盤の方法を用いることができる。1つの方式はウェスタンブロット検出法を用いて、種々の濃度のB o N T / A での処理の後に存在するS N A P - 2 5 切断生成物の量を決定することであり、もう1つの方式はE C L サンドイッチ E L I S A 検出法を用いることであった。

【0268】

α -B o N T / A 中和抗体および、 α -B o N T / A 中和抗体を欠如することが解っている陰性対照試料を含んでなる試料を調製するために、異なる個体の血液から血清を単離した。免疫が減衰している個体をナイーブな個体と称した。免疫を獲得している個体を免疫された個体と称した。血液を凝固促進剤 (BD Biosciences, Bedford, MA) の入った血清管に入れた。血液を1,000×g、4℃で10分間遠心することにより血清が得られた。2人のドナーの血清が得られた：一方の固体はB o N T / A に対して免疫されたが、他方はされなかった。

【0269】

B o N T / A を含んでなる試料で処理された細胞からライゼートを調製するために、S i M a 細胞を実施例6に記載されるようにポリ-D-リジン96ウェルプレートに播種し、そして分化させた。血清不含培地を使用して2.5倍増でヒト血清を1:100-1:152,000に連続希釈した。B o N T / A をS i M a 培養培地0.5mL中10pMの濃度で懸濁した。B o N T / A および α -B o N T / A 抗体を含有する培地を混合し、そして室温で15分間または1時間インキュベートした。ヒト血清を伴うB o N T / A で細胞を2時間処理し、続いて新鮮成長培地中15時間インキュベートした。細胞をまたさらなるインキュベーション時間なしに15時間処理した。

【0270】

ウェスタンブロット分析によりS N A P - 2 5 切断生成物の存在を検出するために、培地を各ウェルから吸引し、細胞をS D S - P A G E 負荷バッファー50μLに懸濁し、そして次に95℃まで5分間加熱した。12%26ウェルCriterionゲル (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を使用して採取された試料をS D S - P A G E により分離する以外は実施例1に記載されるように、各採取された試料からのアリコートウェスタンブロットにより分析し、そしてウサギポリクローナル α -S N A P - 2 5_{1,9,7}抗体血清を一次抗体として使用した (実施例4参照)。結果により、陰性対照試料と比較した場合、被験試料はS N A P 25の切断低減を招いたことが示され、それにより免疫された個体からの血清が α -B o N T / A 中和抗体を含有したことが実証される。

【0271】

E C L サンドイッチ E L I S A によりS N A P - 2 5 切断生成物の存在を検出するために、培地を各ウェルから除去し、そして細胞を実施例5に記載されるように溶解した。 α -S N A P - 2 5 捕捉抗体溶液、 α -S N A P - 2 5 検出抗体溶液および α -S N A P - 2 5 固相支持体を実施例7に記載されるように調製した。上澄を α -S N A P - 2 5 固相支持体に移し、そしてE C L サンドイッチ E L I S A アッセイを実施例5に詳記されるように実施した。収集されたデータを分析し、そしてE C₅₀がB o N T / A の活性をその最大の1/2まで阻止するために必要な血清希釈であり、そして血清の最高希釈で得られたS N A P - 2 5 切断生成物シグナルを最低血清希釈で得られたシグナルで除することにより、最大シグナル (シグナル_{M a x}) の最小シグナル (シグナル_{M i n}) に対する比が

10

20

30

40

50

得られた以外は実施例 5 に記載されるように EC_{50} を計算した。

【0272】

結果により、ヒト血清における α -BoNT/A 中和の存在を検出できることが示される。免疫された個体からの血清中でインキュベートされた BoNT/A 複合体の活性は血清希釈が低下するにつれて低下したが、一方ナイーブな血清の存在は試験されたどの希釈でもアッセイに及ぼす影響力はなかった。処方された BoNT/A 医薬品、バルク BoNT/A 複合体または精製された神経毒を使用してこのアッセイを実施することができる。

【実施例 12】

【0273】

操作された細胞を使用して BoNT/A 活性を検出する免疫基盤の方法

以下の実施例は BoNT/A 受容体をコードするポリヌクレオチド分子を確立された細胞株からの細胞に導入して、BoNT/A 中毒に対する感受性をさらに改善するか、または BoNT/A 取り込み受容力を改善する仕方を例証する。

外因性 BoNT/A 受容体を確立された細胞株を含んでなる細胞に導入するために、カチオン性脂質法により配列番号：59 の FGFR2 をコードする配列番号：130 のポリヌクレオチド分子、または配列番号：25 の FGFR3 をコードする配列番号：139 のポリヌクレオチド分子を含んでなる発現構築物を確立された細胞株からの細胞にトランスフェクトした。適当な密度（約 5×10^6 セル）の確立された細胞株からの細胞を、完全培養培地 5 mL を含有する 100 mm 組織培養皿に蒔き、そして 37°C のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下で、細胞がトランスフェクションに適切な密度に到達するまで成長させる。室温で 5 分間インキュベートされた LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 60 μ L を含有する OPTI-MEM 還元型血清培地 1.5 mL を、FGFR2 もしくは FGFR3 をコードする発現構築物 24 μ g、または緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする対照発現構築物を含有する OPTI-MEM 還元型血清培地 1.5 mL に添加することによりトランスフェクション溶液 3 mL を調製する。このトランスフェクション混合物を室温でおよそ 30 分間インキュベートした。完全培地をトランスフェクション溶液 3 mL で置き換え、そして細胞を 37°C のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下でおよそ 8 時間インキュベートする。トランスフェクション培地を新鮮完全培地 3 mL で置き換え、そして細胞を 37°C のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下でおよそ 24 時間インキュベートする。培地を、およそ 1 mM G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を含有する新鮮完全培地 3 mL で置き換える。細胞を 37°C のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下でおよそ 1 週間インキュベートし、古い培地を、0.5 mM G418 を含有する新鮮完全培養培地で置き換える。一度抗生物質抵抗性コロニーが確立されると、抵抗性コロニーを、およそ 0.5 mM G418 を補充した新鮮完全培養培地を含有する新しい 100 mm 培養プレートに、これらの細胞が 6 から 20×10^5 セル/mL の密度に到達するまで再度蒔く。

【0274】

BoNT/A 受容体の過剰発現が BoNT/A 中毒に対する細胞感受性を改善したか、または BoNT/A 取り込み受容力を改善したかどうかを決定するために、様々な用量の BoNT/A 複合体で処理された細胞を使用して用量-応答曲線を作成した。BoNT/A で処理された細胞からライゼートを調製するために、確立されたトランスフェクトされた細胞株からの適当な密度の細胞を、適切な血清不含培地（表 5）100 μ L を含有する 96 ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。これらの細胞を 37°C のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで（およそ 3 日）インキュベートした。分化型細胞からの培地を各ウェルから吸引し、そして SiMa または PC12 トランスフェクトされた細胞株を含んでなる細胞に関しては 0（未処理試料）、0.01 nM、0.04 nM、0.12 nM、0.37 nM、1.1 nM、3.3 nM および 10 nM BoNT/A 複合体；ならびに Neuro-2a トランスフェクトされた細胞株を含んでなる細胞

10

20

30

40

50

に関しては0（未処理試料）、0.14 nM、0.40 nM、1.2 nM、3.7 nM、11 nM、33 nMおよび100 nM B o N T / A 複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。細胞をB o N T / A 含有培地で6時間処理し、続いて新鮮培地を伴って15時間インキュベートし、そして2×SDS-PAGE負荷バッファ40 μlを添加し、そしてプレートを95℃まで5分間加熱することにより採取した。

【0275】

S N A P - 2 5 切断生成物の存在を検出するために、12%26ウェルCriterionゲル（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA）を使用して採取された試料をSDS-PAGEにより分離する以外は実施例1に記載されるように、各採取された試料からのアリコートをウェスタンブロットにより分析し、そして以下の一次抗体を使用した：1：1,000希釈のウサギポリクローナルα-S N A P - 2 5 抗体血清（実施例4）（A G N、ポリクローナル抗体）、1：500希釈のα-F G F R 2 ウサギポリクローナルC-17（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）または1：500希釈のα-F G F R 3 ウサギポリクローナルC-15（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）。各試料からの目的のタンパク質の強度をImage Quant（GE Healthcare, Piscataway, NJ）を用いて計算し、そして細胞株の各々に関するE C ₅₀をSigmaPlotソフトウェアを用いて推定した。

10

【0276】

結果により、F G F R 2 またはF G F R 3 でトランスフェクトされた細胞は、G F P でトランスフェクトされた細胞よりもさらにB o N T / A に対して鋭敏であり、そしてまた高レベルのS N A P - 2 5 切断を示したことが示される（表14）。F G F R 2 またはF G F R 3 を過剰発現する細胞に関するE C ₅₀値は、G F P を過剰発現する細胞により呈されるE C ₅₀値よりも低く、それはF G F R 2 またはF G F R 3 の導入がB o N T / A 中毒に対する細胞感受性を改善したか、またはB o N T / A 取り込み受容力を改善したことを示している。

20

【0277】

【表13】

表14 外因性B o N T / A 受容体の導入のB o N T / A 中毒またはB o N T / A 取り込みに対する細胞感受性に及ぼす効果

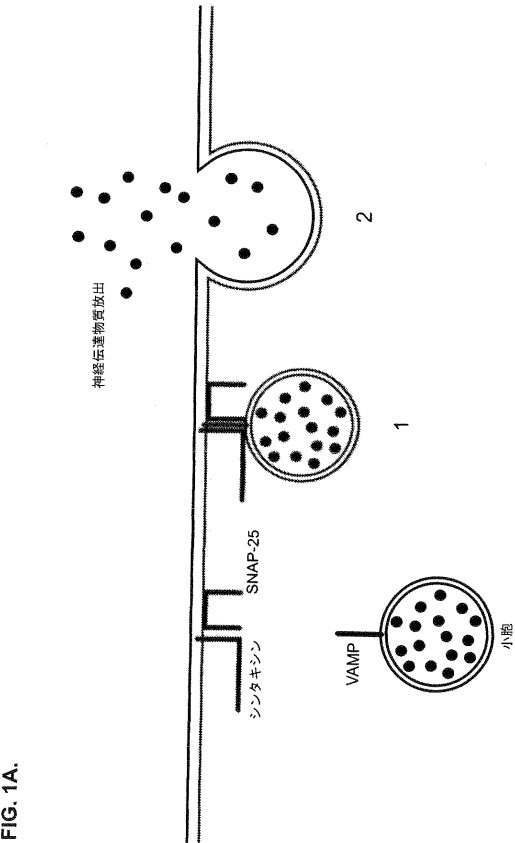
細胞	トランスフェクトされた遺伝子	E C ₅₀ (nM)	最大シグナル
SiMa	GFP	0.0812 ± 0.010	22,733,787
SiMa	FGFR2	0.0459 ± 0.003	26,136,578
SiMa	FGFR3	0.0377 ± 0.006	24,326,271
PC-12	GFP	3.3362 ± 1.881	26,956,063
PC-12	FGFR2	0.3429 ± 0.059	25,376,114
PC-12	FGFR3	0.2634 ± 0.026	24,102,459
Neuro-2a	GFP	61.80 ± 9.710	4,605,974
Neuro-2a	FGFR2	31.59 ± 8.800	23,279,765
Neuro-2a	FGFR3	11.55 ± 5.240	28,347,413

30

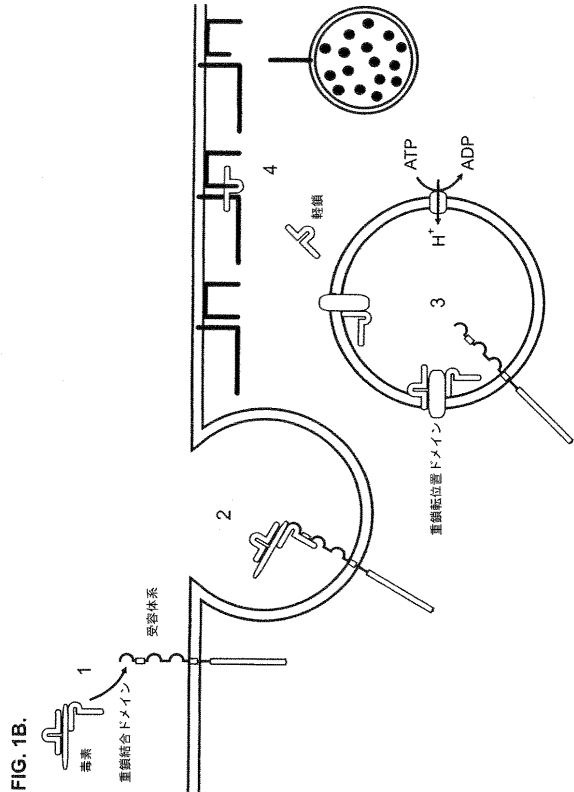
40

S N A P - 2 5 切断生成物の存在に関する検出を実施例6-10に記載されるようにサンドイッチE L I S Aを用いて実施することもできる。

【図 1 A】



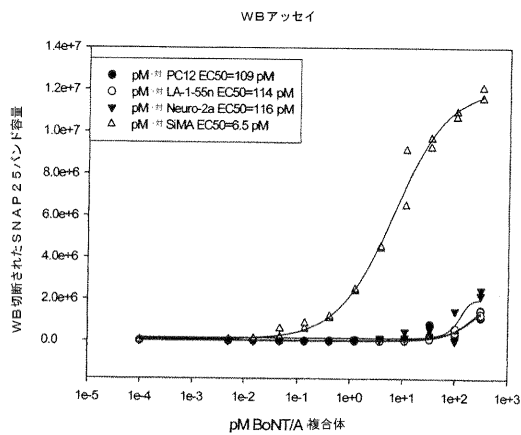
【図 1 B】



【図 2】

FIG. 2.

A

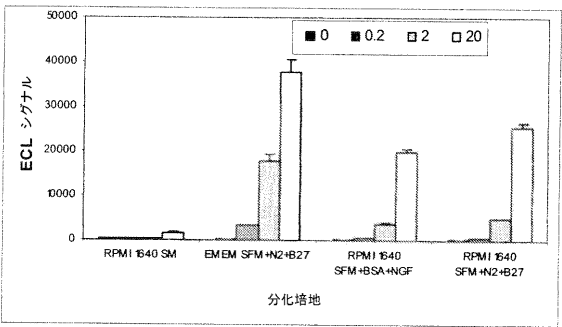


B

シグナル対ノイズ比	PC12	LA-1-55n	Neuro-2a	SiMa
300pM/0pM	197	121	184	412
1.2pM/0pM	3	2	6	35

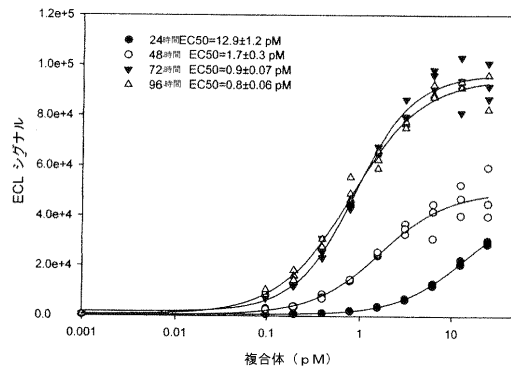
【図 3】

FIG. 3.



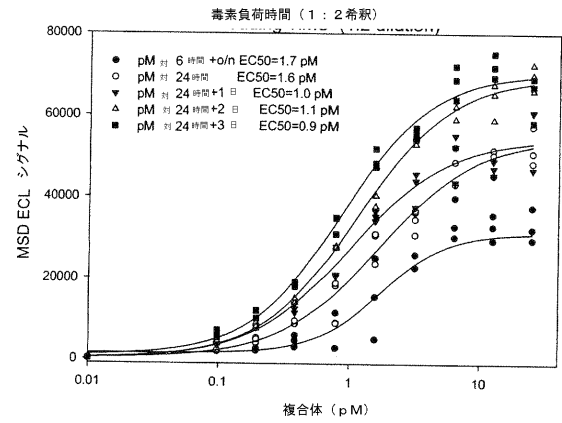
【図 4】

FIG. 4.



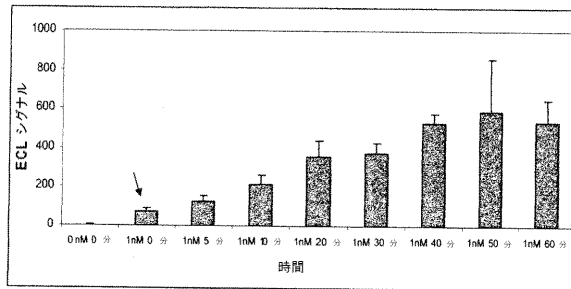
【図 5】

FIG. 5.



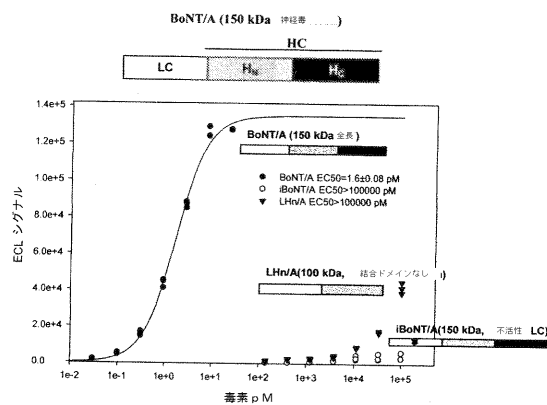
【図 6】

FIG. 6.



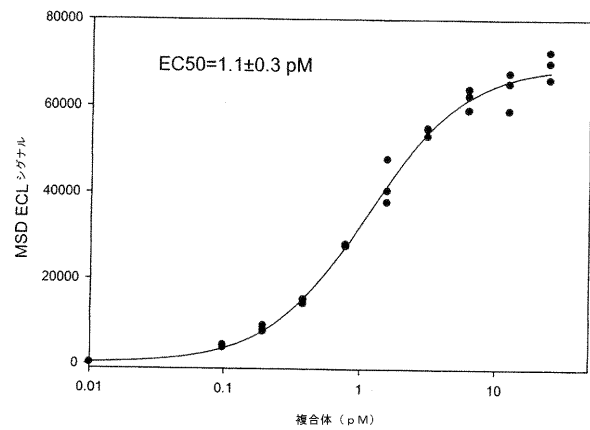
【図 7】

FIG. 7.



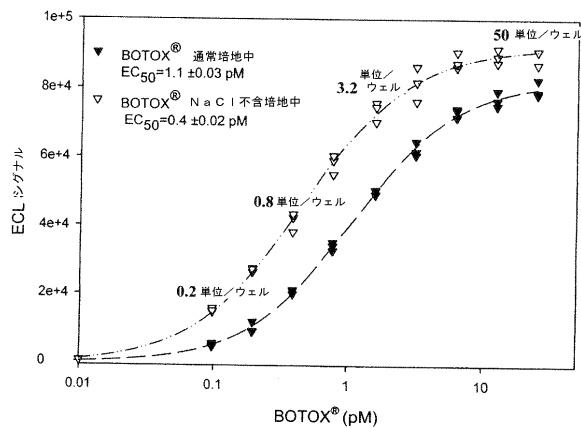
【図 8】

FIG. 8.



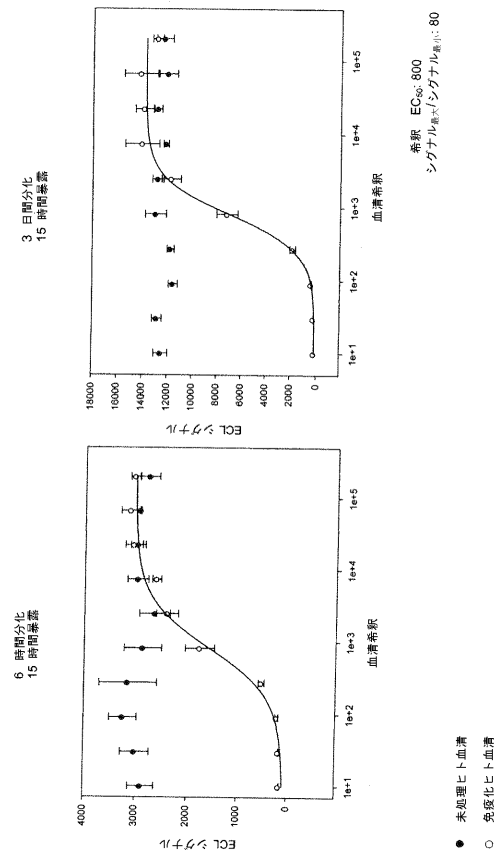
【図 9】

FIG.9.



【図 10】

FIG. 10.



【配列表】

2013100304000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年1月18日(2013.1.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ボツリヌス神経毒血清A型（BoNT/A）を含んでなる医薬組成物であって、医薬の製造の間の効力が、

a) BoNT/Aによって切断可能な配列番号：5を含んでなるヒトSNAP-25の少なくとも部分から本質的になるSNAP-25ポリペプチドを発現する確立された細胞株からの細胞を該医薬と接触させる工程、ここで、配列番号：38のC-末端アミノ酸配列を含んでなる前記SNAP25ポリペプチドのフラグメントを生じさせるBoNT/Aによる前記SNAP-25ポリペプチドの酵素切断によって示されるように、該確立された細胞株は、培養培地リットルあたり約500 pmolまたは未満のBoNT/AでBoNT/A中毒に感受性が高い；

b) 該細胞からポリペプチドを単離する工程；

c) 該ポリペプチドを、配列番号：38の該ペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体に接触させる工程、ここで、前記抗体は、0.450 nM未満の平衡解離定数で配列番号：38の該C-末端アミノ酸配列を含んでなる前記SNAP25ポリペプチドの前記フラグメントのエピトープに特異的に結合する、そして、ここで、前記抗体は、配列番

号：5を含んでなるインタクトなSNAP-25ポリペプチドのエピトープに関して $1 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満の会合速度定数を有する；および

d) 配列番号：38の該C-末端アミノ酸配列を含んでなる前記SNAP-25ポリペプチドの該フラグメントおよび該抗体を含んでなる任意の抗体-抗原複合体の存在を検出する工程、ここで、検出される該抗体-抗原複合体の量が多いことは、該医薬におけるBONT/Aの量が多いことと相関する、
の工程によって決定される、医薬組成物。

【請求項2】

ボツリヌス神経毒血清A型（BONT/A）を含んでなる医薬組成物であって、該医薬組成物の製造の間の効力が、

a) BONT/Aを含んでなる前記医薬組成物の試料で確立された細胞株からの細胞を処理する工程、ここで、確立された細胞株からの該細胞は、約500 pM以下のBONT/AによるBONT/A中毒に感受性が高い；

b) 該BONT/A切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを有するSNAP-25切断生成物を含んでなるSNAP-25構成要素を該処理された細胞から単離する工程；

c) 固相支持体に連結した α -SNAP-25抗体に該SNAP-25構成要素を接触させる工程、

ここで、該 α -SNAP-25抗体は、SNAP-25切断生成物からの該BONT/A切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し、該 α -SNAP-25抗体は、SNAP-25切断生成物からの該BONT/A切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含まないSNAP-25からのエピトープに関して $1 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満の会合速度定数を有する；および該 α -SNAP-25抗体は、該エピトープに関して0.450 nM未満の平衡解離定数を有する；

d) 該BONT/A切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する該SNAP-25切断生成物、および該 α -SNAP-25抗体を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出する工程；

ここで、該抗体-抗原複合体による検出は、BONT/A活性の指標である、
の工程を含んでなる方法によって決定される、医薬組成物。

【請求項3】

該SNAP-25切断生成物がSNAP-25₁₉₇である、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

抗体-抗原複合体の存在がサンドイッチELISAを使用して検出される、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項5】

該方法が、下の漸近線で少なくとも3：1のシグナル対ノイズ比、および上の漸近線で少なくとも10：1のシグナル対ノイズ比を有する、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項6】

該試料が、多くても100 pMのBONT/Aを含んでなる、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項7】

確立された細胞株からの該細胞が約100 pM以下のBONT/AによるBONT/A中毒に感受性が高い、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項8】

該方法が、シングルプレックス様式またはマルチプレックス様式で実施される、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項9】

該SNAP-25ポリペプチドが、配列番号：5を含んでなるヒトSNAP-25の少なくとも部分から本質的になる、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

該 S N A P－25 切断生成物が配列番号：38 の C－末端アミノ酸配列を含んでなる、請求項 2～9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

該抗体が、配列番号：38 のペプチドに特異的に結合する、請求項 10 に記載の医薬組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/543	(2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A
C 0 7 K 14/33	(2006.01)	C 0 7 K 14/33	
C 0 7 K 16/12	(2006.01)	C 0 7 K 16/12	

(74)代理人 100170520

弁理士 澤本 真奈美

(72)発明者 エステル・フェルナンデス・サラス

アメリカ合衆国 9 2 8 3 1 カリフォルニア州フラートン、ロッキー・ロード 1 7 1 0 番

(72)発明者 ジョアン・ワン

アメリカ合衆国 9 2 6 2 0 カリフォルニア州アーバイン、ブリストルコーン 3 7 番

(72)発明者 パットン・イー・ガレイ

アメリカ合衆国 9 0 8 0 8 カリフォルニア州ロング・ビーチ、イースト・ページェントリー・スト
リート 5 5 0 3 番

(72)発明者 リナ・エス・ウォング

アメリカ合衆国 9 2 6 2 0 カリフォルニア州アーバイン、イングルサイド 6 番

(72)発明者 ディアン・ディ・ホッジス

アメリカ合衆国 9 2 7 8 0 カリフォルニア州タスティン、パインウッド・ロード 1 4 3 5 1 番

(72)発明者 ケイ・ロジャー・アオキ

アメリカ合衆国 9 2 6 7 9 カリフォルニア州コト・デ・カサ、ジンジャー・リリー・コート 2 番

F ターム (参考) 4C084 AA02 BA01 BA08 BA22 CA04 CA53 DA33 NA20 ZA06 ZA08

ZA29 ZA30 ZA33

4H045 BA10 CA11 DA76 DA86 EA20

【外国語明細書】

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays

[01] This patent application claims priority pursuant to 35 U.S.C. § 119(e) to U. S. Provisional Patent Application Serial No. 61/036,723 filed March 14, 2008, which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[02] 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 the U.S. for the treatment of cervical dystonia in adults to decrease the severity of abnormal head position and neck pain associated with cervical dystonia; for the treatment of severe primary axillary hyperhidrosis that is inadequately managed with topical agents; and for the treatment of strabismus and blepharospasm associated with dystonia, including benign essential blepharospasm or VII nerve disorders in patients 12 years of age and above.

[03] At present the mouse LD₅₀ bioassay, a lethality test, remains the "gold standard" used by all pharmaceutical manufacturers to express the potency of their preparations. S. S. Arnon et al., JAMA 285: 1059-1070 (2001). In fact, the units on the pharmaceutical preparations' labels are mouse LD₅₀ units and the number of animals needed to produce statistically useful LD₅₀ data is large. The advantage of the mouse LD₅₀ bioassay is that it measures all the steps necessary for botulinum toxin uptake (*e.g.*, toxin binding to a cell surface receptor, internalization of the toxin-receptor complex, light chain translocation into the cytoplasm, light chain cleavage of substrate), instead of merely determining the activity for only part of this intoxication process, such as, *e.g.*, in vitro assays that only measure light chain enzymatic activity. Unfortunately, the mouse LD₅₀ bioassay suffers from many drawbacks including high operational cost due to the large numbers of laboratory animals required, a lack of specificity since all BoNT serotypes will cause the same measurable end-point, and the potential for inaccuracy unless large animal groups are used. In addition, animal rights groups have exerted pressure on regulatory agencies in the U.S. (FDA/NICEATM/ICCVAM) and Europe (MHRA and EDQM), and on pharmaceutical companies manufacturing botulinum neurotoxin products to reduce animal testing and more importantly replace the mouse LD₅₀ bioassay for product release. The regulatory agencies are engaging pharmaceutical companies to apply the three "Rs" principle to the potency testing of botulinum neurotoxins: Reduce, Refine, Replace. D. Straughan, *Progress in Applying the Three Rs to the Potency*

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

Testing of Botulinum Toxin Type A, Altern. Lab. Anim. 34(3): 305-313 (2006). In recent years, several steps have been already taken to reduce and refine the mouse LD₅₀ bioassay in order to standardize the protocol and produce more consistent data using fewer animals per assay.

[04] Thus, a simple, reliable, validated and governmental agency acceptable botulinum toxin activity assay that can evaluate the integrity of all the steps necessary in botulinum toxin uptake would be of significant value because such a non-animal based assay would alleviate the need for animal testing and all the disadvantages, costs and ethical concerns associated with this type of animal-based assay. The present specification provides novel compositions, cells, and methods for assaying the activity of a botulinum toxin A 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 neurotoxin action.

DETAILED DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[05] 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.

[06] FIG. 2 shows a comparison of BoNT/A uptake in four cell lines by Western blot analysis. FIG. 2A shows a graph of SNAP-25 cleavage product detected based on amount of BoNT/A used to treat the cell line. The data were analyzed in SigmaPlot using a 4 parameter logistic model and EC₅₀ values were obtained for each cell line. Ranking of SNAP-25 cleavage product signals detected was: SiMa>> Neuro-2a>LA1-55n> PC12. FIG. 2B shows the signal-to-noise ratios of the raw signals at 300 pM vs. 0 pM and

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

1.2 pM vs. 0 pM were calculated for the assay. SiMa cells generated the highest signal-to-noise ratios and the lowest EC₅₀ values.

[07] FIG. 3 shows optimization of cell differentiation media for established cell lines useful in an immuno-based method of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification.

[08] FIG. 4 shows optimization of cell differentiation time for cells comprising an established cell line useful in an immuno-based method of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification.

[09] FIG. 5 shows optimization of BoNT/A treatment of cells comprising an established cell line useful in an immuno-based method of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification. The results indicate an EC₅₀ of less than 2 pM was achieved with any of the BoNT/A treatments tested.

[010] FIG. 6 shows the sensitivity of an immuno-based method of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification. The results indicated that uptake of BoNT/A by the cells took less than one minute before producing significant amounts of SNAP-25 cleavage product over background.

[011] FIG. 7 shows the specificity of an immuno-based method of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification. The results indicate that the immuno-based methods of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification can measure all the steps involved in BoNT/A intoxication.

[012] FIG. 8 shows a dose response curve of differentiated SiMa cells treated with a BoNT/A complex using an immuno-based method of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification.

[013] FIG. 9 shows the results of an immuno-based BoNT/A activity assay for a formulated BoNT/A pharmaceutical product using an immuno-based method of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification.

[014] FIG. 10 show the detection of neutralizing α -BoNT/A antibodies in human serum using an immuno-based method of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification.

DETAILED DESCRIPTION

[015] The present specification provides novel assays for determining the presence or absence of an active BoNT/A in a sample and for determining the activity/potency of a BoNT/A preparation. The novel cell-based assays disclosed in the present specification rely on cells, reagents and detection methods that enable the assay to detect picomolar quantities of BoNT/A in a sample. The cell-based assays disclosed in the present specification reduce the need for animal toxicity studies, yet serve to analyze multiple functions BoNT/A, namely, binding and cellular uptake of toxin, translocation into the cell cytosol,

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

and protease activity. 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 toxins and formulated toxin products and further are amenable to automated high throughput assay formats.

[016] Thus, one aspect disclosed in the present specification provides compositions for producing α -SNAP-25 antibodies that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. Compositions can comprise an adjuvant and a composition including a SNAP-25 antigen, a carrier linked to a SNAP-25 antigen, or a 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 bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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 bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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 compositions useful for making α -SNAP-25 antibodies that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product include, without limitation, a 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 a 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 bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. Aspects of this method comprise the steps of (a) administering to an animal a 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 bind an epitope comprising a carboxyl-terminus glutamine from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product or α -SNAP-25 polyclonal antibodies that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus glutamine from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[018] Still another aspect disclosed in the present specification provides α -SNAP-25 antibodies that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. 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 bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, 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 methods of detecting BoNT/A activity. Aspects of this method comprise the steps of (a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a BoNT/A, wherein the cell from an established cell line is susceptible to BoNT/A intoxication; (b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; (c) contacting the SNAP-25 component with an α -SNAP-25 antibody that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from 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 BoNT/A 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 methods of detecting BoNT/A activity. Aspects of this method comprise the steps of (a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a BoNT/A, wherein the cell from an established cell line can uptake a BoNT/A; (b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; (c) contacting the SNAP-25 component with an α -SNAP-25 antibody that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from 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 BoNT/A 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 BoNT/A immuno-resistance in a mammal. Aspects of this method comprise the steps of (a) adding a BoNT/A to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α -BoNT/A 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 BoNT/A intoxication; (c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; (d) contacting the SNAP-25 component with an α -SNAP-25 antibody

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from 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 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 -BoNT/A 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 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] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a composition for producing α -SNAP-25 antibodies that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. Other aspects of the present disclosure comprise, in part, an immune response inducing composition for producing α -SNAP-25 antibodies that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. 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 bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. 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.

[026] A 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 P₁ 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 P₁ 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 lacking a carboxyl-terminus at the P₁ 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.

[027] The sequence surrounding a BoNT/A cleavage site present in SNAP-25 is denoted as P₅-P₄-P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅', with P₁-P₁' representing the scissile bond. Upon cleavage by BoNT/A, the resulting cleavage products produced comprise a fragment including the P₅-P₄-P₃-P₂-P₁ sequence and a fragment including the P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅'. Thus, as used herein, the term "SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond" refers to any SNAP-25 having the P₁ residue as its carboxyl-terminal amino acid. For example, Q₁₉₇-R₁₉₈ of human SNAP-25 (SEQ ID NO: 5) represents the P₁-P₁' 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 Q₁₉₇ of the scissile bond. As another example, K₂₀₄-H₂₀₅ of *Torpedo marmorata* SNAP-25 (SEQ ID NO: 16) represents the P₁-P₁' 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

product having a lysine at its carboxyl-terminal amino acid where the lysine represents K₂₀₄ of the scissile bond.

[028] The SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 P₁ 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 P₁ 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 bind.

[029] 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.

[030] Thus, an embodiment, a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 P₁ 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 P₁ 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.

[031] In another embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 32. In aspects of this embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises 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. In a further embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 38.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[032] In yet another embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 39. In aspects of this embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 or SEQ ID NO: 44. In a further embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 45.

[033] It is envisioned that any and all SNAP-25 antigens that triggers an immune response that produces α -SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148 can be useful as a SNAP-25 antigen to trigger an immune response that produces α -SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. 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: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148. 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: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148.

[034] 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

antigen must be the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, a carrier must be linked to the amino end of the SNAP-25 antigen.

[035] 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 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.

[036] 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: 55), and GGGGS (SEQ ID NO: 56) or an A-spacers such as AAA, AAAA (SEQ ID NO: 57) and AAAAV (SEQ ID NO: 58). A flexible spacer is linked in-frame to the SNAP-25 antigen as a fusion protein.

[037] 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 P₁ 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 lacking a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[038] It is envisioned that compositions 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 composition refers to any substance or mixture of substances that increases or diversifies the immune response to a SNAP-25 antigen. An adjuvant can, for example, serve to reduce the number of immunizations or the amount of antigen required for protective immunization. The use of 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); saponin 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 adjuvant may be used in a SNAP-25 composition disclosed in the present specification as long as the adjuvant satisfies the requisite characteristics for inducing an immune response.

[039] 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.

[040] Thus, in an embodiment, a SNAP-25 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: 147, or SEQ ID NO: 148. In another aspect of this embodiment, a SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 38. In

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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).

[041] In another embodiment, a SNAP-25 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: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 or SEQ ID NO: 44. In another aspect of this embodiment, a SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 45. 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 yet another embodiment, a SNAP-25 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: 147, or SEQ ID NO: 148. 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.

[043] In still another embodiment, a SNAP-25 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: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 or SEQ ID NO: 44. 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.

[044] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a method for producing α -SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. An α -SNAP-25 antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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. 1 (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).

[045] As a non-limiting example, α -SNAP-25 polyclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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 a composition disclosed in the present specification. As another non-limiting example, α -SNAP-25 polyclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product can be produced by injecting an egg, such as, e.g., a chicken egg, with one or more injections of a 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 binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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.

[046] As another non-limiting example, α -SNAP-25 monoclonal antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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 P₁ 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. 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 P₁ 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond and bind with sufficiently high avidity are chosen for further characterization and study.

[047] Another alternative for preparing an α -SNAP-25 monoclonal antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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 P₁ 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

[048] 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 that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. It is envisioned that any and all samples that can contain an α -SNAP-25 antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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 binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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 binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. 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 bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, an appropriate sample can be a blood sample containing such α -SNAP-25 antibodies, whereas when isolating an α -SNAP-25 monoclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, an appropriate sample can be an α -SNAP-25 antibody-producing cell such as a spleen cell or hybridoma.

[049] Aspects of the present disclosure comprise, in part, isolating an α -SNAP-25 antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product from the sample. Methods of isolating an such α -SNAP-25 antibodies, such as, e.g., α -SNAP-25 polyclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product or α -SNAP-25 monoclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product by immunoaffinity chromatography. An α -SNAP-25 monoclonal antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product 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.

[050] Thus, in an embodiment, a method of producing an α -SNAP-25 antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product comprises the steps (a) administering to an animal a 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 binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product is a polyclonal antibody. In another aspect of this embodiment, an α -SNAP-25 antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product is a monoclonal antibody. In a further aspect of this embodiment, an α -SNAP-25 monoclonal antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product produced is an IgG subtype. In other aspects of this embodiment, SNAP-25 composition further comprises an adjuvant, such as, e.g., polyethylene glycol (PEG), monomethoxypolyethylene glycol (mPEG), or polyvinyl alcohol (PVA).

[051] In another embodiment, a method of producing α -SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product comprises the steps (a) administering to an animal a 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 bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product is a polyclonal antibody. In another aspect of this embodiment, α -SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product is a monoclonal antibody. In a further aspect of this embodiment, an α -SNAP-25 monoclonal antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product produced in an IgG subtype. In other aspects of this embodiment, SNAP-25 composition further comprises an adjuvant, such as, e.g., polyethylene glycol (PEG), monomethoxypolyethylene glycol (mPEG), or polyvinyl alcohol (PVA).

[052] 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. As used herein, the term "isolated" refers to separating a molecule from its natural environment by the use of human intervention. 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 " α -SNAP-25" is synonymous with "anti-SNAP-25" and refers to an antibody that binds to a SNAP-25 antigen. 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, Rosenberg 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.

[053] 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.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[054] 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 dimer 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.

[055] 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.

[056] 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

[057] 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, or SEQ ID NO: 82. 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.

[058] 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, or SEQ ID NO: 124.

[059] 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.

[060] 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, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148. 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.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[061] 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 bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product" 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-25₁₉₇ 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-25₂₀₄ 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.

[062] 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," 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.

[063] 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

antibody's equilibrium dissociation constant (KD), which is defined as the ratio K_d/K_a at equilibrium. Where K_a is the antibody's association rate constant and k_d 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 (K_a), or on-rate constant (K_{on}), 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: $[Ab] \times [Ag] \times K_{on}$. 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 (K_d), or off-rate constant (K_{off}), 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: $[Ab + Ag] \times K_{off}$. 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 $K_{off}/K_{on} = [Ab] \times [Ag]/[Ab + Ag]$, 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.

[064] 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 $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, less than $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, less than $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, or less than $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. 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 $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, more than $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, more than $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, or more than $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. 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 $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ to $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ to $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ to $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, or $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ to $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$.

[065] 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 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$, less than $1 \times 10^{-4} s^{-1}$, or less than $1 \times 10^{-5} s^{-1}$. 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

scissile bond can have a disassociation rate constant of, e.g., less than $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, less than $2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, less than $3.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, less than $4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, less than $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, less than $6.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, less than $7.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, less than $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, or less than $9.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. 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 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, more than $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, or more than $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. 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 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, more than $2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, more than $3.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, more than $4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, more than $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, more than $6.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, more than $7.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, more than $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, or more than $9.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

[066] 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.

[067] 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 $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, less than $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, less than $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, less than $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, or less than $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. 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 $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at most $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at most $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at most $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, or at most $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[068] 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

compare the K_{on} association rate of the antibody for a molecule containing its epitope relative to the K_{on} association rate of the antibody for a molecule that does not contain that epitope. For example, comparing the association rate constant (K_a) 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 (K_a) for a SNAP-25 not comprising its epitope(s) of, e.g., less than $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, less than $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, less than $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, less than $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ or less than $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. 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 (K_a) for a SNAP-25 not comprising its epitope(s) of, e.g., at most $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at most $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at most $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at most $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ or at most $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[069] 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 (K_a) 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 (K_a) 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 (K_a) 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 (K_a) 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.

[070] 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'

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 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 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 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.

[071] 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.

[072] 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148.

[073] Aspects of the present disclosure comprise, in part, an immuno-based method of detecting BoNT/A 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.

[074] 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 P₁ 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.

[075] Thus, in an embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification can detect the LOD of BoNT/A 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 BoNT/A. 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 BoNT/A. 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 BoNT/A. 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 BoNT/A. 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 BoNT/A.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[076] In another aspect of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, e.g., 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 BoNT/A. 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 BoNT/A. 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 BoNT/A. 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 BoNT/A, 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 BoNT/A. In still other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, e.g., 1000 fM or less, 900 fM or less, 800 fM or less, 700 fM or less, 600 fM or less, 500 fM or less, 400 fM or less, 300 fM or less, 200 fM or less, or 100 fM or less of a BoNT/A. In still other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, e.g., 100 fM or less, 90 fM or less, 80 fM or less, 70 fM or less, 60 fM or less, 50 fM or less, 40 fM or less, 30 fM or less, 20 fM or less, or 10 fM or less of a BoNT/A. In still other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOD of, e.g., 10 fM or less, 9 fM or less, 8 fM or less, 7 fM or less, 6 fM or less, 5 fM or less, 4 fM or less, 3 fM or less, 2 fM or less, or 1 fM or less of a botulinum neurotoxin A.

[077] 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.

[078] Thus, in an embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification can detect the LOQ of BoNT/A 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 BoNT/A. 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

less of a BoNT/A. 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 BoNT/A. 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 BoNT/A. 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 BoNT/A.

[079] In another aspect of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, e.g., 10 nM 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 BoNT/A. 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 BoNT/A. 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 BoNT/A. 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 BoNT/A, 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 BoNT/A. In still other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, e.g., 1000 fM or less, 900 fM or less, 800 fM or less, 700 fM or less, 600 fM or less, 500 fM or less, 400 fM or less, 300 fM or less, 200 fM or less, or 100 fM or less of a BoNT/A. In still other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, e.g., 100 fM or less, 90 fM or less, 80 fM or less, 70 fM or less, 60 fM or less, 50 fM or less, 40 fM or less, 30 fM or less, 20 fM or less, or 10 fM or less of a BoNT/A. In still other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, e.g., 10 fM or less, 9 fM or less, 8 fM or less, 7 fM or less, 6 fM or less, 5 fM or less, 4 fM or less, 3 fM or less, 2 fM or less, or 1 fM or less of a BoNT/A.

[080] 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 no 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 no more than 4%, no more than 3%, no more than 2%, or no more than 1%.

[081] 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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%.

[082] 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.

[083] 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 BoNT/A from a partially-active BoNT/A 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 BoNT/A.

[084] 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 toxin, 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. System suitability is stressed in FDA guidance referring to the fact that equipment, electronics, assay performance, and samples to be

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

[085] 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 BoNT/A intoxication by a BoNT/A or any eukaryotic cell that can uptake a BoNT/A. 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 BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate and encompasses the binding of a BoNT/A to a BoNT/A receptor, the internalization of the neurotoxin/receptor complex, the translocation of the BoNT/A 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 BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate and encompasses the binding of a BoNT/A to a BoNT/A receptor, the internalization of the neurotoxin/receptor complex, the translocation of the BoNT/A light chain from an intracellular vesicle into the cytoplasm and the proteolytic cleavage of a SNAP-25. Also referred to as a genetically-engineered cell line, cells from such an established cell line may, *e.g.*, express an exogenous FGFR2, an exogenous FGFR3, an exogenous SV2, an exogenous SNAP-25, or any combination thereof.

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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

refer to cells that can undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate and encompasses the binding of a BoNT/A to a BoNT/A receptor, the internalization of the neurotoxin/receptor complex, the translocation of the BoNT/A light chain from an intracellular vesicle into the cytoplasm and the proteolytic cleavage of a SNAP-25. By definition, cell(s) that can uptake BoNT/A must express, or be engineered to express, at least one BoNT/A receptor and at least one SNAP-25 substrate.

[087] Thus in an embodiment, cells from an established cell line are susceptible to BoNT/A intoxication. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line are susceptible to BoNT/A intoxication by, *e.g.*, about 500 pM or less, about 400 pM or less, about 300 pM or less, about 200 pM or less, or about 100 pM or less of a BoNT/A. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are susceptible to BoNT/A intoxication by, *e.g.*, about 90 pM or less, about 80 pM or less, about 70 pM or less, about 60 pM or less, about 50 pM or less, about 40 pM or less, about 30 pM or less, about 20 pM or less, or about 10 pM or less of a BoNT/A. In still other aspects, cells from an established cell line are susceptible to BoNT/A intoxication by, *e.g.*, about 9 pM or less, about 8 pM or less, about 7 pM or less, about 6 pM or less, about 5 pM or less, about 4 pM or less, about 3 pM or less, about 2 pM or less, or about 1 pM or less of a BoNT/A. In yet other aspects, cells from an established cell line are susceptible to BoNT/A intoxication by, *e.g.*, about 0.9 pM or less, about 0.8 pM or less, about 0.7 pM or less, about 0.6 pM or less, about 0.5 pM or less, about 0.4 pM or less, about 0.3 pM or less, about 0.2 pM, or about 0.1 pM or less of a BoNT/A. 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.

[088] In another embodiment, cells comprising an established cell line can uptake a BoNT/A. In aspects of this embodiment, cells comprising an established cell line can uptake, *e.g.*, about 500 pM or less, about 400 pM or less, about 300 pM or less, about 200 pM or less, or about 100 pM or less of a BoNT/A. In other aspects of this embodiment, cells comprising an established cell line possess the ability to uptake about 90 pM or less, about 80 pM or less, about 70 pM or less, about 60 pM or less, about 50 pM or less, about 40 pM or less, about 30 pM or less, about 20 pM or less, or about 10 pM or less of a BoNT/A. In still other aspects, cells comprising an established cell line possess the ability to uptake about 9 pM or less, about 8 pM or less, about 7 pM or less, about 6 pM or less, about 5 pM or less, about 4 pM or less, about 3 pM or less, about 2 pM or less, or about 1 pM or less of a BoNT/A. In yet other aspects, cells comprising an established cell line possess the ability to uptake about 0.9 pM or less, about 0.8 pM or less, about 0.7 pM or less, about 0.6 pM or less, about 0.5 pM or less, about 0.4 pM or less, about 0.3 pM or less, about 0.2 pM or less, or about 0.1 pM or less of a BoNT/A.

[089] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a BoNT/A. As used herein, the term "BoNT/A" is synonymous with "botulinum neurotoxin serotype A" or "botulinum neurotoxin type A" and refers to both a naturally-occurring BoNT/A or a non-naturally occurring BoNT/As thereof, and includes

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

BoNT/A complex comprising the about 150 kDa BoNT/A neurotoxin and associated non-toxin associated proteins (NAPs), as well as the about 150 kDa BoNT/A neurotoxin alone. Non-limiting examples of BoNT/A complexes include, e.g., the 900-kDa BoNT/A complex, the 500-kDa BoNT/A complex, the 300-kDa BoNT/A complex. Non-limiting examples of the about 150 kDa BoNT/A neurotoxin include, e.g., SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4.

[090] As used herein, the term "naturally occurring BoNT/A" refers to any BoNT/A produced by a naturally-occurring process, including, without limitation, BoNT/A isoforms produced from a post-translational modification, an alternatively-spliced transcript, or a spontaneous mutation, and BoNT/A subtypes, such as, e.g., a BoNT/A1 subtype, BoNT/A2 subtype, BoNT/A3 subtype, BoNT/A4 subtype, and BoNT/A5 subtype. A naturally occurring BoNT/A includes, without limitation, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, 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 amino acids from SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4. Commercially available pharmaceutical compositions of a naturally-occurring BoNT/A includes, without limitation, 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.

[091] As used herein, the term "non-naturally occurring BoNT/A" refers to any BoNT/A whose structure was modified with the aid of human manipulation, including, without limitation, a BoNT/A with an altered amino acid sequence produced by genetic engineering using random mutagenesis or rational design and a BoNT/A produced by in vitro chemical synthesis. Non-limiting examples of non-naturally occurring BoNT/As are described in, e.g., Steward, L.E. et al., *Post-translational Modifications and Clostridial Neurotoxins*, U.S. Patent 7,223,577; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins*, U.S. Patent No. 7,419,676; Steward, L.E. et al., *Clostridial Neurotoxin Compositions and Modified Clostridial Neurotoxins*, US 2004/0220386; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins With Enhanced Targeting Capabilities For Endogenous Clostridial Toxin Receptor Systems*, U.S. Patent Publication No. 2008/0096248; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins With Altered Targeting Capabilities For Clostridial Toxin Target Cells*, U.S. Patent Publication No. 2008/0161543; 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 No. 2008/0241881, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[092] Thus in an embodiment, the BoNT/A activity being detected is from a naturally occurring BoNT/A. In aspects of this embodiment, the BoNT/A activity being detected is from a BoNT/A isoform or a BoNT/A subtype. In aspects of this embodiment, the BoNT/A activity being detected is from the BoNT/A of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4. In other aspects of this embodiment, the BoNT/A activity being detected is from a BoNT/A having, e.g., at least 70%, at least 75%, at least 80%, at

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 BoNT/A activity being detected is from BOTOX®, DYSPORT®/RELOXIN®, PURTOX®, XEOMIN®, NEURONOX®, or BTX-A.

[093] In another embodiment, the BoNT/A activity being detected is from a non-naturally occurring BoNT/A. In other aspects of this embodiment, the BoNT/A activity being detected is from a non-naturally occurring BoNT/A variant 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 BoNT/A activity being detected is from a non-naturally occurring BoNT/A 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 non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4. In yet other aspects of this embodiment, the BoNT/A activity being detected is from a non-naturally occurring BoNT/A 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 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4.

[094] 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 BoNT/A. As used herein, the term "preferentially cleaved" refers to that the cleavage rate of BoNT/A substrate by a BoNT/A is at least one order of magnitude higher than the cleavage rate of any other substrate by BoNT/A. In aspects of this embodiment, the cleavage rate of BoNT/A substrate by a BoNT/A 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 than that the cleavage rate of any other substrate by BoNT/A.

[095] 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:

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

[096] 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., *Lipophilic 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.

[097] 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.

[098] 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:

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

[099] 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, and SK-N-BE(2)-C.

[0100] 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.

[0101] 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

[0102] 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.

[0103] 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

[0104] Assays that detect the cleavage of a BoNT/A substrate after exposure to a BoNT/A 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 BoNT/A 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.

[0105] As non-limiting examples, Western blot analysis using an antibody that recognizes BoNT/A SNAP-25-cleaved product or both the cleaved and uncleaved forms of SNAP-25 can be used to assay for uptake of BoNT/A. 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 CI 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), α -SNAP-25 mouse monoclonal antibody CI 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).

[0106] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a BoNT/A receptor. As used herein, the term "BoNT/A receptor" refers to either a naturally-occurring BoNT/A receptor or a non-naturally occurring BoNT/A receptor which preferentially interacts with BoNT/A in a manner that elicits a BoNT/A intoxication response. As used herein, the term "preferentially interacts" refers to that the equilibrium dissociation constant (KD) of BoNT/A for a BoNT/A receptor is at least one order of magnitude less than that of BoNT/A for any other receptor at the cell surface. The equilibrium dissociation constant, a specific type of equilibrium constant that measures the propensity of an BoNT/A-BoNT/A receptor complex to separate (dissociate) reversibly into its component molecules, namely the BoNT/A and the BoNT/A receptor, is defined as $KD=K_a/K_d$ at equilibrium. The association constant (K_a) is defined as $K_a=[C]/[L][R]$ and the disassociation constant (K_d) is defined as $K_d=[L][R]/[C]$, where [L] equals the molar concentration of BoNT/A, [R] is the molar concentration of a BoNT/A receptor, and [C] is the molar concentration of the BoNT/A-BoNT/A 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 BoNT/A is to

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

its receptor, or the higher the binding affinity between BoNT/A and BoNT/A receptor. In aspects of this embodiment, the disassociation constant of BoNT/A for a BoNT/A 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 BoNT/A for any other receptor. In other aspects of this embodiment, the binding affinity of a BoNT/A that preferentially interacts with a BoNT/A 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 BoNT/A that preferentially interacts with a BoNT/A 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 BoNT/A intoxication response" refers to the ability of a BoNT/A receptor to interact with a BoNT/A to form a neurotoxin/receptor complex and the subsequent internalization of that complex into the cell cytoplasm.

[0107] As used herein, the term "naturally occurring BoNT/A receptor" refers to any BoNT/A receptor produced by a naturally-occurring process, including, without limitation, BoNT/A receptor isoforms produced from a post-translational modification, an alternatively-spliced transcript, or a spontaneous mutation, and BoNT/A receptor subtypes. A naturally occurring BoNT/A receptor includes, without limitation, a fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), a fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3), a synaptic vesicle glycoprotein 2 (SV2), and a complex ganglioside like GT1b, such as those described in Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays*, U.S. Patent Publication 2008/0003240; Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays*, U.S. Patent Publication 2008/0182799; Min Dong et al., *SV2 is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A*, *Science* (2006); S. Mahrhold et al., *The Synaptic Vesicle Protein 2C Mediates the Uptake of Botulinum Neurotoxin A into Phrenic Nerves*, 580(8) *FEBS Lett.* 2011-2014 (2006), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. A naturally occurring FGFR2 includes, without limitation, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, and SEQ ID NO: 70, 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, and SEQ ID NO: 70. A naturally occurring FGFR3 includes, without limitation, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, and SEQ ID NO: 27, 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, SEQ ID NO: 26, and SEQ ID NO: 27. A naturally occurring SV2 includes, without limitation, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, and 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: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, and SEQ ID NO: 31.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[0108] As used herein, the term "non-naturally occurring BoNT/A receptor variant" refers to any BoNT/A receptor produced with the aid of human manipulation or design, including, without limitation, a BoNT/A receptor produced by genetic engineering using random mutagenesis or rational design and a BoNT/A receptor produced by chemical synthesis. Non-limiting examples of non-naturally occurring BoNT/A variants include, e.g., conservative BoNT/A receptor variants, non-conservative BoNT/A receptor variants, BoNT/A receptor chimeric variants and active BoNT/A receptor fragments.

[0109] As used herein, the term "non-naturally occurring BoNT/A receptor" refers to any BoNT/A receptor whose structure was modified with the aid of human manipulation, including, without limitation, a BoNT/A receptor produced by genetic engineering using random mutagenesis or rational design and a BoNT/A receptor produced by in vitro chemical synthesis. Non-limiting examples of non-naturally occurring BoNT/A receptors are described in, e.g., Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays*, U.S. Patent Publication 2008/0003240; Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays*, U.S. Patent Publication 2008/0182799, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. A non-naturally occurring BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70.

[0110] Thus in an embodiment, a BoNT/A receptor is a naturally occurring BoNT/A receptor such as, e.g., FGFR2, FGFR3 or SV2. In aspects of this embodiment, the BoNT/A receptor is a BoNT/A receptor isoform or a BoNT/A receptor subtype. In aspects of this embodiment, the naturally occurring BoNT/A receptor is the naturally occurring BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In other aspects of this embodiment, the BoNT/A receptor is a naturally occurring BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70.

[0111] In another embodiment, a BoNT/A receptor is a non-naturally occurring BoNT/A receptor, such as, e.g., a genetically-engineered FGFR2, a genetically-engineered FGFR3, or a genetically-engineered SV2. In other aspects of this embodiment, the BoNT/A receptor is a non-naturally occurring BoNT/A receptor having, e.g., at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95%

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In other aspects of this embodiment, the BoNT/A receptor is a non-naturally occurring BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In yet other aspects of this embodiment, the BoNT/A receptor is a non-naturally occurring BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70.

[0112] A BoNT/A receptor can be an endogenous BoNT/A receptor or an exogenous BoNT/A receptor. As used herein, the term "endogenous BoNT/A receptor" refers to a BoNT/A receptor naturally present in the cell because it is naturally encoded within the cell's genome, such that the cell inherently expresses the BoNT/A receptor without the need an external source of BoNT/A receptor or an external source of genetic material encoding a BoNT/A receptor. Expression of an endogenous BoNT/A 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 BoNT/A receptor: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa, and SK-N-BE(2)-C. An endogenous BoNT/A receptor can only be a naturally-occurring BoNT/A receptor or naturally-occurring variants thereof.

[0113] As used herein, the term "exogenous BoNT/A receptor" refers to a BoNT/A receptor expressed in a cell through the introduction of an external source of BoNT/A receptor or an external source of genetic material encoding a BoNT/A receptor by human manipulation. The expression of an exogenous BoNT/A 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 BoNT/A receptors by transient or stably transfection of a polynucleotide molecule encoding a BoNT/A receptor, such as, e.g., a FGFR2, a FGFR3, or a SV2. As another non-limiting example, cells from an established cell line can express one or more exogenous BoNT/A receptors by protein transfection of the BoNT/A receptors, such as, e.g., a FGFR2, a FGFR3, or a SV2. An exogenous

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

BoNT/A receptor can be a naturally-occurring BoNT/A receptor or naturally occurring variants thereof, or non-naturally occurring BoNT/A receptor or non-naturally occurring variants thereof.

[0114] Thus in an embodiment, cells from an established cell line express an endogenous BoNT/A receptor. In aspects of this embodiment, the endogenous BoNT/A receptor expressed by cells from an established cell line is a naturally-occurring BoNT/A receptor. In other aspects of this embodiment, the endogenous BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In yet aspects of this embodiment, the endogenous BoNT/A receptor expressed by cells from an established cell line is a naturally occurring BoNT/A receptor, such as, e.g., a BoNT/A receptor isoform or a BoNT/A receptor subtype. In other aspects of this embodiment, the endogenous BoNT/A receptor expressed by cells from an established cell line is a naturally occurring BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70.

[0115] In another embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express an exogenous BoNT/A receptor. In an aspect of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally-occurring BoNT/A receptor. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express the naturally-occurring BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally occurring BoNT/A receptor, such as, e.g., a BoNT/A receptor isoform or a BoNT/A 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 BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70.

[0116] In another aspect of the embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring BoNT/A receptor. In other aspects of this embodiment,

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring BoNT/A 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: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70.

[0117] In another embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express an exogenous FGFR2, an exogenous FGFR3, an exogenous SV2, 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 FGFR2, a naturally-occurring FGFR3, a naturally-occurring SV2, 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 FGFR2, a non-naturally-occurring FGFR3, a non-naturally-occurring SV2, 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 FGFR2 or a non-naturally-occurring FGFR2, a naturally-occurring FGFR3 or a non-naturally-occurring FGFR3, a naturally-occurring SV2 or a non-naturally-occurring SV2, or any combination thereof.

[0118] Cells that express one or more endogenous or exogenous BoNT/A receptors can be identified by routine methods including direct and indirect assays for toxin uptake. Assays that determine BoNT/A binding or uptake properties can be used to assess whether a cell is expressing a BoNT/A receptor. Such assays include, without limitation, cross-linking assays using labeled BoNT/A, such as, e.g., [125I] BoNT/A, [125I], 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*

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

of botulinum type C1, 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 BoNT/A 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 toxin using labeled or unlabeled antibodies. Antibodies useful for these assays include, without limitation, antibodies selected against BoNT/A, antibodies selected against a BoNT/A receptor, such as, e.g., FGFR2, FGFR3, or SV2, and/or antibodies selected against a ganglioside, such as, e.g., GD1a, GD1b, GD3, GQ1b, or GT1b. 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 BoNT/A uptake properties or characteristics can be useful in identifying cells expressing endogenous or exogenous or BoNT/A receptors.

[0119] Assays that monitor the release of a molecule after exposure to BoNT/A can also be used to assess whether a cell is expressing one or more endogenous or exogenous BoNT/A receptors. In these assays, inhibition of the molecule's release would occur in cells expressing a BoNT/A receptor after BoNT/A 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,

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 BoNT/A receptors.

[0120] Assays that detect the cleavage of a BoNT/A substrate after exposure to a BoNT/A can also be used to assess whether a cell is expressing one or more endogenous or exogenous BoNT/A receptors. In these assays, generation of a BoNT/A substrate cleavage-product, or disappearance of the intact BoNT/A substrate, would be detected in cells expressing a BoNT/A receptor after BoNT/A 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 BoNT/A substrate cleavage can be useful in identifying cells expressing endogenous or exogenous BoNT/A receptors.

[0121] As non-limiting examples, Western blot analysis using an antibody that recognizes BoNT/A SNAP-25-cleaved product or both the cleaved and uncleaved forms of SNAP-25 can be used to assay for uptake of BoNT/A. Examples of α -SNAP-25 antibodies useful for these assays include, without limitation, SMI-81 α -SNAP-25 mouse monoclonal antibody (Sternberger 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).

[0122] Aspects of the present disclosure provide cells that through genetic manipulation or recombinant engineering are made to express an exogenous SNAP-25 and/or one or more exogenous BoNT/A receptors. Cells useful to express an exogenous SNAP-25 and/or one or more exogenous BoNT/A 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 BoNT/A receptors. It is further understood that such genetically manipulated or recombinantly engineered cells may express an exogenous SNAP-25 and one or more exogenous BoNT/A 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 express an exogenous SNAP-25 and/or one or more exogenous BoNT/A receptors and is capable of undergoing BoNT/A intoxication.

[0123] 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 BoNT/A

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate, such as, e.g., a SNAP-25, a FGFR2, a FGFR3, or a SV2, 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 BoNT/A 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 BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate as follows: FGFR2 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, or SEQ ID NO: 138; FGFR3 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, or SEQ ID NO: 141; SV2 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, or SEQ ID NO: 144; and SNAP-25 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 145, or SEQ ID NO: 146.

[0124] 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., CellPfect 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).

[0125] 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-*

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

[0126] 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-Clontech, Palo Alto, CA) and BD™ Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems User Manual, PT3001-1, BD Biosciences Clontech, (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.

[0127] Thus, in an embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication transiently contain a polynucleotide molecule encoding a component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate. In

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

another embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication transiently contain a polynucleotide molecule encoding a plurality of components necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication transiently contain a polynucleotide molecule encoding FGFR2, FGFR3, SV2 or SNAP-25. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication transiently contain the polynucleotide molecule encoding FGFR2 of SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, or SEQ ID NO: 138. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication transiently contain the polynucleotide molecule encoding FGFR3 of SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, or SEQ ID NO: 141. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication transiently contain the polynucleotide molecule encoding SV2 of SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, or SEQ ID NO: 144. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication transiently contain the polynucleotide molecule encoding SNAP-25 of SEQ ID NO: 145, or SEQ ID NO: 146.

[0128] In another embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication stably contain a polynucleotide molecule encoding a component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate. In another embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication stably contain a polynucleotide molecule encoding a plurality of components necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication stably contain a polynucleotide molecule encoding FGFR2, FGFR3, SV2 or SNAP-25. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication stably contain the polynucleotide molecule encoding FGFR2 of SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, or SEQ ID NO: 138. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication stably contain the polynucleotide molecule encoding FGFR3 of SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, or SEQ ID NO: 141. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication stably contain the polynucleotide molecule encoding SV2 of SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, or SEQ ID NO: 144. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line susceptible to BoNT/A intoxication stably contain the polynucleotide molecule encoding SNAP-25 of SEQ ID NO: 145, or SEQ ID NO: 146.

[0129] As mentioned above, an exogenous component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate, such as, e.g., a SNAP-25, a FGFR2, a FGFR3, or a SV2 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate, such as, e.g., a SNAP-25, a FGFR2, a FGFR3, or a SV2 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.

[0130] A delivery agent can also be an agent that enables or enhances cellular uptake of a covalently linked component, like FGFR2, FGFR3, SV2, or SNAP-25, 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 Moiety*, 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.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[0131] A delivery agent can also be an agent that enables or enhances cellular uptake of a non-covalently associated component, like FGFR2, FGFR3, SV2c, or SNAP-25. 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).

[0132] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a sample comprising a BoNT/A. As used herein, the term "sample comprising a BoNT/A" refers to any biological matter that contains or potentially contains an active BoNT/A. A variety of samples can be assayed according to a method disclosed in the present specification including, without limitation, purified, partially purified, or unpurified BoNT/A; recombinant single chain or di-chain toxin with a naturally or non-naturally occurring sequence; recombinant BoNT/A with a modified protease specificity; recombinant BoNT/A with an altered cell specificity; bulk BoNT/A; a formulated BoNT/A product, including, e.g., BOTOX®, DYSPORT®/RELOXIN®, XEOMIN®, PURTOX®, NEURONOX®, BTX-A 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 BoNT/A activity can be useful for determining the presence or activity of a BoNT/A in a food or beverage sample; to assay a sample from a human or animal, for example, exposed to a BoNT/A or having one or more symptoms of botulism; to follow activity during production and purification of bulk BoNT/A; to assay a formulated BoNT/A product used in pharmaceutical or cosmetics applications; or to assay a subject's blood serum for the presence or absence of neutralizing α -BoNT/A antibodies.

[0133] Thus, in an embodiment, a sample comprising a BoNT/A is a sample comprising any amount of a BoNT/A. In aspects of this embodiment, a sample comprising a BoNT/A 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 BoNT/A. In other aspects of this embodiment, a sample comprising a BoNT/A comprises about 1 μ M or

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

less, about 100 nM or less, about 10 nM or less, about 1 nM or less, about 100 pM or less, about 10 pM or less, about 1 pM or less, about 100 fM or less, about 10 fM or less, or about 1 fM or less of a BoNT/A.

[0134] 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 P₁ 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 P₁ 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.

[0135] 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.

[0136] 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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), chemiluminescence (CL), electrochemiluminescence (ECL), bioluminescence (BL), fluorescence,

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

resonance energy transfer, plane polarization, colorimetric, 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 Electrogenenerated Chemiluminescence*, Trends Anal. Chem. 18(1): 47-62 (1999); K. A. Fahrnich, et al., *Recent Applications of Electrogenenerated 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); *Electrogenenerated Chemiluminescence*, (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0137] 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, including, without exception, MSD sandwich ELISA-ECL detection platform (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

[0138] 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[0139] Aspects of the present disclosure can be practiced in a singleplex or multiplex fashion. An immuno-based method of detecting BoNT/A 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. An immuno-based method of detecting BoNT/A 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 P₁ 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.

[0140] Thus, in one embodiment, an immuno-based method of detecting BoNT/A 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. In another embodiment, immuno-based method of detecting BoNT/A 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 P₁ 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.

[0141] Aspects of the present disclosure provide, in part, a method of determining BoNT/A immunoresistance. As used herein, the term "BoNT/A immunoresistance" means a mammal that does not fully respond to a BoNT/A therapy, or shows a reduced beneficial effect of a BoNT/A 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 -BoNT/A antibody that binds to a BoNT/A toxin in a manner that reduces or prevents the specificity or activity of the toxin. As used herein, the term "BoNT/A therapy" means a treatment, remedy, cure,

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

healing, rehabilitation or any other means of counteracting something undesirable in a mammal requiring neuromodulation using a BoNT/A toxin or administering to a mammal one or more controlled doses of a medication, preparation or mixture of a BoNT/A toxin that has medicinal, therapeutic, curative, cosmetic, remedial or any other beneficial effect. BoNT/A 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. An exemplary, well-known BoNT/A therapy is a BOTOX® therapy.

[0142] Aspects of the present disclosure provide, in part, a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α -BoNT/A neutralizing antibodies. As used herein, the term "test sample" refers to any biological matter that contains or potentially contains at least one α -BoNT/A antibody. An α -BoNT/A antibody can be a neutralizing anti-BoNT/A antibody or a non-neutralizing anti-BoNT/A antibody. As used herein, the term "neutralizing anti-BoNT/A antibodies" means any α -BoNT/A antibody that will, under physiological conditions, bind to a region of a BoNT/A toxin in such a manner as to reduce or prevent the toxin from exerting its effect in a BoNT/A therapy. As used herein, the term "non-neutralizing α -BoNT/A antibodies" means any α -BoNT/A antibody that will, under physiological conditions, bind to a region of a BoNT/A toxin, but not prevent the toxin from exerting its effect in a BoNT/A therapy. It is envisioned that any and all samples that can contain α -BoNT/A 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 -BoNT/A antibodies against a BoNT/A toxin 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 BoNT/A toxin, after a single BoNT/A treatment, after multiple BoNT/A toxin treatments, before onset of resistance to a BoNT/A therapy, or after onset of resistance to a BoNT/A therapy.

[0143] 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 -BoNT/A antibodies, a negative control sample can be obtained from an individual who had never been exposed to BoNT/A and may include, without limitation, a sample from the same individual supplying the test sample, but taken before undergoing a BoNT/A therapy; a sample taken from a different individual never been exposed to BoNT/A; a pooled sample taken from a plurality of different individuals never been exposed to BoNT/A. With respect to neutralizing α -BoNT/A antibodies, a positive control sample can be obtained from an individual manifesting BoNT/A immunoresistance and includes, without limitation, individual testing

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

positive in a patient-based testing assays; individual testing positive in an *in vivo* bioassay; and individual showing hyperimmunity, e.g., a BoNT/A vaccinated individual.

[0144] It is further foreseen that α -BoNT/A antibodies can be purified from a sample. Anti-BoNT/A 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. 1 (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.

[0145] 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.

[0146] Aspects of the present disclosure provide, in part, comparing the amount of SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 P₁ 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 BoNT/A 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 BoNT/A immunoresistance in the mammal. In another embodiment, the amount of SNAP-25 cleavage product in

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 BoNT/A 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 BoNT/A immunoresistance in the mammal.

[0147] It is envisioned that any and all assay conditions suitable for detecting the present of a neutralizing α -BoNT/A 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 BoNT/A is in excess. In another aspect of this embodiment, the assay amount of a BoNT/A is rate-limiting. In another aspect of this embodiment, the assay amount of a test sample is rate-limiting.

[0148] Aspects of the present disclosure can also be described as follows:

1. A composition comprising a carrier linked to a flexible linker linked to SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.
2. The composition of 1, wherein the the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond is glutamine or lysine.
3. The composition of 1, wherein the SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 147.
4. The composition of 1, wherein the flexible linker and the SNAP-25 antigen amino acid sequence is SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 46.
5. An isolated α -SNAP-25 antibody, wherein the isolated α -SNAP-25 antibody binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product.
6. The isolated α -SNAP-25 antibody of 5, 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 $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; and wherein the α -SNAP-25 antibody has an equilibrium disassociation constant for the epitope of less than 0.450 nM.
7. The isolated α -SNAP-25 antibody of 5, 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

8. The isolated α -SNAP-25 antibody of 5, 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.
9. The isolated α -SNAP-25 antibody of 5, 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.
10. The isolated α -SNAP-25 antibody of 5, 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.
11. The isolated α -SNAP-25 antibody of 5, 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.
12. The isolated α -SNAP-25 antibody of 5, 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.
13. The isolated α -SNAP-25 antibody of 5, 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.
14. The isolated α -SNAP-25 antibody of 5, 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.
15. The isolated α -SNAP-25 antibody of 5, 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.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

16. The isolated α -SNAP-25 antibody of 5, 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.
17. A method of detecting BoNT/A activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a BoNT/A, wherein the cell from an established cell line is susceptible to BoNT/A intoxication by a BoNT/A; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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 BoNT/A activity.
18. A method of detecting BoNT/A activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a BoNT/A, wherein the cell from an established cell line is susceptible to BoNT/A intoxication by a BoNT/A; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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 BoNT/A activity.
19. A method of detecting BoNT/A activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a BoNT/A, wherein the cell from an established cell line is susceptible to BoNT/A intoxication by a BoNT/A; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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 BoNT/A activity.
20. A method of detecting BoNT/A activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a BoNT/A, wherein the cell from an established cell line

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

can uptake BoNT/A; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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 BoNT/A activity.

21. A method of detecting BoNT/A activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a BoNT/A, wherein the cell from an established cell line can uptake BoNT/A; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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 BoNT/A activity.
22. A method of detecting BoNT/A activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a BoNT/A, wherein the cell from an established cell line can uptake BoNT/A; b) isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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 BoNT/A activity.
23. A method of determining BoNT/A immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a BoNT/A to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α -BoNT/A 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 BoNT/A intoxication; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 BoNT/A and a serum known not to contain α -BoNT/A 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 -BoNT/A neutralizing antibodies.

24. A method of determining BoNT/A immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a BoNT/A to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α -BoNT/A 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 BoNT/A intoxication; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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 BoNT/A and a serum known not to contain α -BoNT/A 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 -BoNT/A neutralizing antibodies.
25. A method of determining BoNT/A immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a BoNT/A to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α -BoNT/A 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 BoNT/A intoxication; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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 BoNT/A and a serum known not to contain α -BoNT/A 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 -BoNT/A neutralizing antibodies.

26. A method of determining BoNT/A immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a BoNT/A to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α -BoNT/A 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 BoNT/A; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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 BoNT/A and a serum known not to contain α -BoNT/A 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 -BoNT/A neutralizing antibodies.
27. A method of determining BoNT/A immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a BoNT/A to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α -BoNT/A 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 BoNT/A; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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 BoNT/A and a serum known not to contain α -BoNT/A 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 -BoNT/A neutralizing antibodies.
28. A method of determining BoNT/A immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a BoNT/A to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α -BoNT/A neutralizing antibodies; b) treating a cell from an established cell line with the test sample,

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

wherein the cell from an established cell line can uptake BoNT/A; c) isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ 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 epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ 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 BoNT/A and a serum known not to contain α -BoNT/A 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 -BoNT/A neutralizing antibodies.

29. The method of 17-22 and 23-25, wherein the cell is susceptible to BoNT/A intoxication by about 500 pM or less, by about 400 pM or less, by about 300 pM or less, by about 200 pM or less, by about 100 pM or less of a BoNT/A.
30. The method of 20-22 and 26-28, wherein the cell can uptake about 500 pM or less, by about 400 pM or less, by about 300 pM or less, by about 200 pM or less, by about 100 pM or less of BoNT/A.
31. The method of 17-22, 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 BoNT/A
32. The method of 17-22, wherein the sample comprises about 100 nM or less, about 10 nM or less, about 1 nM or less, about 100 pM or less, about 10 pM or less, about 1 pM or less, about 100 fM or less, about 10 fM or less, or about 1 fM or less of a BoNT/A.
33. The method of 17-28, wherein the α -SNAP-25 antibody is the isolated α -SNAP-25 antibody of 5-16.
34. The method of 17-28, wherein the presence of an antibody-antigen complex is detected by an immuno-blot analysis, an immunoprecipitation analysis, an ELISA, or a sandwich ELISA
35. The method of 17-28, wherein the immuno-based 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.
36. The method of 17-28, wherein the immuno-based 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.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

37. The method of 17-28, wherein the immuno-based method can detect the EC₅₀ 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.
38. The method of 17-28, wherein the immuno-based method can detect the EC₅₀ activity of, e.g., at least 10 nM, at least 5 nM, at least 100 pM, at least 50 pM, at least 10 pM, at least 5 pM, at least 100 fM, at least 50 fM, at least 10 fM, at least 5 fM, or at least 1 fM.
39. The method of 17-28, wherein the immuno-based 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 BoNT/A.
40. The method of 17-28, wherein the immuno-based method has an LOD of, e.g., 100 fM or less, 90 fM or less, 80 fM or less, 70 fM or less, 60 fM or less, 50 fM or less, 40 fM or less, 30 fM or less, 20 fM or less, or 10 fM or less of a BoNT/A.
41. The method of 17-28, wherein the immuno-based 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 BoNT/A.
42. The method of 17-28, wherein the immuno-based method has an LOQ of, e.g., 100 fM or less, 90 fM or less, 80 fM or less, 70 fM or less, 60 fM or less, 50 fM or less, 40 fM or less, 30 fM or less, 20 fM or less, or 10 fM or less of a BoNT/A.
43. The method of 17-28, wherein the immuno-based method can distinguish a fully-active BoNT/A from a partially-active BoNT/A 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 BoNT/A.

EXAMPLES

Example I

Screening of Candidate Cell Lines

[0149] The following example illustrates how to identify established cell lines susceptible to BoNT/A intoxication or have BoNT/A uptake capacity required for a method of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification.

1. Growth of Stock Culture of candidate cell lines.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[0150] To grow the cell lines, a suitable density of cells from the cell line being tested were plated in a 162 cm² 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
Kelly SiMa	RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-Glutamine
NB69	RPMI 1640, 15% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin
CHP-126	RPMI 1640, 20% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin
N4TG3	RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 100 µM 6-thioguanine
MHH-NB-11	RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids
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
N18TG2	DMEM (11885-084, Gibco), 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 100 µM 6-thioguanine
N1E-115 N18 ND8/34 NG108-15 NG115-401L NS20Y SK-N-SH	90 % DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM Glutamine, 2 mM glucose
SK-N-DZ SK-N-F1	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 BE(2)-M17 CHP-212 LA-1-55n LA-N-1 MC-1XC 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,
NB4 1A3	Ham's F10 (12471-017, Gibco), 2.5% heat-inactivated fetal bovine serum, 15% heat-inactivated horse serum, 2 mM Glutamine
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. Single-dose screening of candidate cell lines using 1 nM BoNT/A.

[0151] One parameter tested to improve the sensitivity of a cell-based assay was to identify suitable cell lines that exhibited a good capacity to uptake a Clostridial neurotoxin and adhere to a substrate surface. Initially, cell lines were tested for their ability to uptake 1 nM BoNT/A and their ability to attach to a surface. To determine whether a cell line was able to uptake 1 nM BoNT/A, 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).

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

The growth media was aspirated from each well and replaced with either 1) fresh growth media containing no toxin (untreated cell line) or 2) fresh growth media containing 1 nM of a BoNT/A complex (treated cell line). After an overnight incubation, the cells were washed by aspirating the growth media and rinsing each well with 200 μ l of 1 x PBS. To harvest the cells, the 1 x PBS was aspirated, the cells were lysed by adding 50 μ l 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.

[0152] 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 μ l 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 BoNT/A treatment as a parameter to assess the amount of BoNT/A 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, 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

settings (350 to 600, normally 400) depended on the individual blot. Table 2 indicates the cell lines where a SNAP-25 cleavage product was detected when treated with 1 nM BoNT/A. The following cell lines exhibited both an uptake of 1 nM BoNT/A and appropriate attachment to a substrate surface: BE(2)-M17, IMR-32, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa and SK-N-BE(2)-C.

[0153] To determine whether a cell line was able to attach to a surface, 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 growth media (Table 1). The cells were grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until cells reach the desired density (approximately 18 to 24 hours). Cell attachment was assessed by the percentage of cells that adhered to the bottom well surface of the tissue plate relative to the total number of cells seeded. Cell lines CHP-126, IMR-32, LA-N-1, MC-IXC, NG115-401L, SK-N-BE(2)-C, SK-N-F1 and SK-N-MC were deemed unsuitable because each cell line exhibited less than 50% attachment (Table 2). All other cells lines tested exhibited suitable cell attachment characteristics (Table 2).

Table 2. Single-Dose Screening of Candidate Cell Lines Using 1 nM BoNT/A.				
Cell Line	Description	Source	1 nM BoNT/A Uptake	Attachment
BE(2)-C	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2268	No	>60%
BE(2)-M17	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2267	Yes	>60%
CHP-126	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 304	No	<50%
CHP-212	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2273	No	>60%
HCN-1a	Brain cortical neuron	ATCC CRL-10442	No	>60%
HCN-2	Brain cortical neuron	ATCC CRL-10742	No	>60%
IMR-32	Human neuroblastoma	ATCC CRL-127	Yes	<50%
Kelly	Human neuroblastoma	ECACC 92110411	Yes	>60%
Kelly	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 355	Yes	>60%
LA1-55n	Human neuroblastoma	ECACC 06041203	Yes	>60%
LA-N-1	Human neuroblastoma	ECACC 06041201	—	<25%
MC-IXC	Human neuroepithelioma	ATCC CRL-2270	—	<25%
MHH-NB-11	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 157	No	>60%
N1E-115	Mouse neuroblastoma	ATCC CCL-2263	Yes	>60%
N4TG3	Mouse neuroblastoma	DSMZ ACC 101	No	>60%
N18TG2	Mouse neuroblastoma	DSMZ ACC 103	No	>60%
NB4 1A3	Mouse neuroblastoma	ECACC 89121405	No	>60%
ND3	Mouse neuroblastoma/primary neonatal rat DRG hybrid	ECACC 92090901	No	>60%
ND7/23	Mouse neuroblastoma/primary rat DRG hybrid	ECACC 92090903	No	>60%

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

ND8	Mouse neuroblastoma/primary neonatal rat DRG hybrid	<u>ATCC</u>	No	>60%
ND8/34	Mouse neuroblastoma	ECACC 92090904	No	>60%
ND15	Mouse neuroblastoma/primary neonatal rat DRG hybrid	ECACC 92090907	No	>60%
ND27	Mouse neuroblastoma/primary rat DRG hybrid	ECACC 92090912	No	>60%
NB69	Human neuroblastoma	ECACC 99072802	No	>60%
NDC	Mouse neuroblastoma/primary neonatal rat DRG hybrid	ECACC 92090913	No	>60%
Neuro-2a	Mouse neuroblastoma	ATCC CCL-131	Yes	>60%
NG108-15	Mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid	ECACC 88112302	Yes	>60%
NG115-401L	Mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid	ECACC 87032003	No	<50%
NS20Y	Mouse neuroblastoma	DSMZ ACC 94	No	>60%
PC12	Rat pheochromocytoma	ATCC CRL-1721	Yes	>60%
SH-SY5Y	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2266	Yes	>60%
SiMa	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 164	Yes	>60%
SK-N-BE(2)-C	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2271	Yes	<50%
SK-N-AS	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2137	No	>60%
SK-N-DZ	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2149	No	>60%
SK-N-F1	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2142	No	<50%
SK-N-MC	Human neuroblastoma	ATCC HTB-10	—	<25%
SK-N-SH	Human neuroblastoma	ECACC 86012802	No	>60%
TE 189.T	Spinal cord	ATCC CRL-7947	No	>60%

Example II

Evaluation of Growth Conditions on Neurotoxin Uptake in Candidate Cell Lines

[0154] The following example illustrates how to determine growth conditions for established cell lines that maximize susceptible to BoNT/A intoxication or have BoNT/A uptake capacity.

1. Effects of cell differentiation on neurotoxin uptake of candidate cell lines.

[0155] To determine whether cell differentiation improved neurotoxin uptake, cell lines exhibiting uptake of 1 nM BoNT/A were transferred into serum-free medium to induced differentiation. 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 a serum-free medium containing Minimum Essential Medium with 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES, 1 mM Sodium Pyruvate, 100 units/mL Penicillin, and 100 µg/mL Streptomycin. These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 the cell line being tested was plated into the wells of 24-well tissue culture plates containing 1 mL of an appropriate growth medium (Table 1). 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), 0.1 nM, 0.3 nM, or 1 nM of a BoNT/A complex. After an overnight incubation, the cells were washed and harvested as described in Example I.

[0156] To detect for the presence of cleaved SNAP-25 products, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that harvested samples are separated by SDS-PAGE using 12 % 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the rabbit polyclonal α -SNAP-25₁₉₇ antibody serum was used as the primary antibody (see Example IV). Table 3 indicates the cell lines that exhibited a SNAP-25 cleavage product when treated with 0.1 nM BoNT/A. Of the cell lines tested, only the SiMa and Neuro-2a cell lines exhibited an uptake of 0.1 nM BoNT/A in the undifferentiated state. However, besides SiMa and Neuro-2a, the cell lines N18, LA1-55n, PC12, and SH-SY5Y all exhibited an uptake of 0.1 nM BoNT/A in the differentiated state.

Table 3. Effects of Cell Differentiation on Neurotoxin Uptake of Candidate Cell Lines.				
Cell Line	Description	Source	0.1 nM BoNT/A Uptake	
			Undifferentiated	Differentiated
BE(2)-M17	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2267	No	No
Kelly	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 355	No	No
LA1-55n	Human neuroblastoma	ECACC 06041203	No	Yes
N1E-115	Mouse neuroblastoma	ATCC CCL-2263	No	Not Tested
N4TG3	Mouse neuroblastoma	DSMZ ACC 101	No	Not Tested
N18	Mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid	ECACC 88112301	No	Yes
Neuro-2a	Mouse neuroblastoma	ATCC CCL-131	Yes	Yes
NG108-15	Mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid	ECACC 88112302	No	Not Tested
PC12	Rat pheochromocytoma	ATCC CRL-1721	No	Yes
SH-SY5Y	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2266	No	Yes
SiMa	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 164	Yes	Yes
SK-N-BE(2)-C	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2271	No	Not Tested

2. Effects of ganglioside treatment on neurotoxin uptake of differentiated candidate cell lines.

[0157] To determine whether treatments improving low-affinity binding of neurotoxin could improve neurotoxin uptake, differentiated cell lines exhibiting uptake of 1 nM BoNT/A were treated with ganglioside GT1b. A suitable density of cells from a stock culture of the cell line being tested was plated

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

into the wells of 24-well tissue culture plates containing serum-free medium as described above, with or without 25 µg/mL GT1b (Alexis Biochemicals, San Diego, CA). 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 as described above. The media was aspirated from each well and replaced with fresh serum-free media containing either 0 (untreated sample), 1.9 pM, 3.7 pM, 7.4 pM, 14.8 pM, 29.7 pM, 59.4 pM, 118.8 pM, 237.5 pM, 574 pM, 950 pM, and 1900 pM of a BoNT/A complex. The cell lines were incubated at two different times, 24 hours and 48 hours. After toxin incubation, the cells were washed and harvested as described in Example I.

[0158] To detect for the presence of cleaved SNAP-25 products, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that harvested samples are separated by SDS-PAGE using 12% 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the rabbit polyclonal α-SNAP-25₁₉₇ antibody serum was used as the primary antibody (see Example IV). Table 4 indicates the effects of gangliosides treatment on the ability of differentiated cell lines to uptake BoNT/A. These results indicate the lowest concentration of BoNT/A that will produce a detectable band of SNAP-25 cleavage product in the Western blot.

Table 4. Effects of Ganglioside Treatment on Neurotoxin Uptake of Candidate Cell Lines.				
Cell Line	Description	Source	BoNT/A Uptake	
			24 Hour Incubation	48 Hour Incubation
BE(2)-M17	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2267	237.5 pM	118.8 pM
Kelly	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 355	Not Tested	Not Tested
LA1-55n	Human neuroblastoma	ECACC 06041203	15 pM	7.4 pM
N1E-115	Mouse neuroblastoma	ATCC CCL-2263	Not Tested	Not Tested
N4TG3	Mouse neuroblastoma	DSMZ ACC 101	Not Tested	Not Tested
N18	Mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid	ECACC 88112301	14.8 pM	7.4 pM
Neuro-2a	Mouse neuroblastoma	ATCC CCL-131	7.4 pM	7.4 pM
NG108-15	Mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid	ECACC 88112302	Not Tested	Not Tested
PC12	Rat pheochromocytoma	ATCC CRL-1721	7.4 pM	7.4 pM
SH-SY5Y	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2266	Not Tested	Not Tested
SiMa	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 164	1.9 pM	1.9 pM
SK-N-BE(2)-C	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2271	Not Tested	Not Tested

3. Development of serum-free media with cell differentiating properties that enhanced neurotoxin uptake of candidate cell lines.

[0159] To determine whether treatment improvements that induce cell differentiation could improve neurotoxin uptake, SiMa, Neuro-2a and PC12 cell lines were grown in various serum-free medium to

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

induced differentiation. 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 various test serum-free medium. Parameters tested were 1) the effect of different basal media on BoNT/A uptake (MEM and RPMI 1649); 2) the effect of the presence or absence of neurotrophic factors on BoNT/A uptake (N2 supplement and B27 supplement); 3) the effect of the presence or absence of differentiation factors on BoNT/A uptake (retinoic acid and nerve growth factor); and 4) the effect of the presence or absence of serum on BoNT/A uptake (serum-free media and reduced serum media). As a control, 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 a control serum-free media (Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES, 1 mM Sodium Pyruvate, 100 units/mL Penicillin, and 100 µg/mL Streptomycin). 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). The media was aspirated from each well and replaced with fresh serum-free media containing either 0 (untreated sample), 0.005 pM, 0.015 pM, 0.05 pM, 0.14 pM, 0.42 pM, 1.2 pM, 3.7 pM, 11 pM, 33 pM, 100 pM and 300 pM of a BoNT/A complex. In addition, the differentiated cells were treated with BoNT/A for 24 hrs followed by a media change and 48 hrs incubation in fresh media without toxin to allow for the accumulation of SNAP-25 cleavage product. The cells were then washed and harvested as described in Example I.

Table 5. Serum Free Media Used for Differentiating Cell Lines.	
Cell Line	Test Serum Free Media Composition
LA1-55n	Minimum Essential Medium with 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 0.1 mM Non-Essential Amino-Acids, 10 mM HEPES, 1x N2 supplement, and 1 x B27 supplement
Neuro-2a	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
PC12	RPMI 1640, 2 mM GlutaMAX™, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 1% Penicillin-Streptomycin and 50 ng/mL Nerve Growth Factor
SiMa	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

[0160] To detect for the presence of a SNAP-25 cleavage product, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that harvested samples are separated by SDS-PAGE using 12 % 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and an α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibody serum was used (see Example IV). The most optimized media determined for each cell line is shown in Table 5. Table 6 indicates the lowest amount of a SNAP-25 cleavage product detected when the cell lines were grown in this optimized serum-free medium. Use of the optimized serum-free medium resulted in the detection of BoNT/A activity signals with acceptable signal-to-noise ratios in LA1-55n, Neuro-2a, PC-12, and SiMa cell lines (FIG. 2). For example, optimized differentiation conditions resulted in a 5-fold increase in SNAP-25 cleavage product detection as compared to the control serum-free media for Neuro-2a and PC12 cells, and almost 50-fold for SiMa cells. In addition, a minimal signal to noise ratio of 3:1 for the lower asymptote and 10:1 for the upper asymptote is required to develop a robust assay amenable for validation. With the exception of LA-1-55n,

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

all optimized cell lines provided a signal to noise ratio for the lower asymptote of at least 3:1 when the signal detected from the 1.2 pM dose was compared to the background signal of 0 pM BoNT/A (FIG. 2). In addition, all optimized cell lines provided a signal to noise ratio for the upper asymptote of at least 100:1 when the signal from the 300 pM dose was compared to the background signal of 0 pM BoNT/A (FIG. 2). These results indicate that any of these cell lines could be used to develop an immuno-based method for detecting BoNT/A activity as disclosed in the present specification because the assay was detecting the presence of pM amounts of BoNT/A.

Table 6. Effects of Optimized Serum-Free Media on Neurotoxin Uptake of Candidate Cell Lines.				
Cell Line	Description	Source	BoNT/A Uptake	
			Control Serum-Free Media	Optimized Serum-Free Media
BE(2)-M17	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2267	Not Tested	Not Tested
Kelly	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 355	Not Tested	Not Tested
LA1-55n	Human neuroblastoma	ECACC 06041203	7.4 pM	3.7 pM
N1E-115	Mouse neuroblastoma	ATCC CCL-2263	Not Tested	Not Tested
N4TG3	Mouse neuroblastoma	DSMZ ACC 101	Not Tested	Not Tested
N18	Mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid	ECACC 88112301	Not Tested	Not Tested
Neuro-2a	Mouse neuroblastoma	ATCC CCL-131	3.7 pM	0.8 pM
NG108-15	Mouse neuroblastoma/rat glioma hybrid	ECACC 88112302	Not Tested	Not Tested
PC12	Rat pheochromocytoma	ATCC CRL-1721	2.0 pM	0.42 pM
SH-SY5Y	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2266	Not Tested	Not Tested
SiMa	Human neuroblastoma	DSMZ ACC 164	0.23 pM	0.005 pM
SK-N-BE(2)-C	Human neuroblastoma	ATCC CRL-2271	Not Tested	Not Tested

Example III

Development of α -SNAP-25 Monoclonal Antibodies that Selectively Bind a SNAP-25 Epitope Having a Free Carboxyl-terminus at the P₁ Residue of the BoNT/A Cleavage Site Scissile Bond

[0161] 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

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

[0162] To develop monoclonal α -SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, the 13-residue peptide CDSNKTRIDEANQ_{COOH} (SEQ ID NO: 38) was designed as a SNAP-25

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

[0163] A similar strategy based on other SNAP-25 antigens disclosed in the present specification is used to develop α -SNAP-25 monoclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. 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.

[0164] 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 P₁ 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-25₁₃₄₋₁₉₇ of SEQ ID NO: 48 and the BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ of SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ 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-25₁₃₄₋₂₀₆ 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-25₁₃₄₋₁₉₇ and the BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆. The BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ and the BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 μ l 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 μ l 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-25₁₃₄₋₁₉₇ coated plates, but not the BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ coated plates, indicated that the α -SNAP-25 antibody preferentially recognized the SNAP-25₁₉₇ cleavage product. The results 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

[0165] 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 μ l of the following Substrate Solution: Rows A-C were coated with 100 μ l of BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ at twelve different concentrations; Rows D-H were coated with 100 μ l of BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ at 10 μ g/mL. The plates were washed by aspirating the Substrate Solution and rinsing each well three times with 200 μ l 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 μ M ZnCl₂, 10 mM dithiothreitol) and 100 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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-25₁₉₇ 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,

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

[0166] For cell-based cleavage assay, a suitable density of PC12 cells were plated into 60 mm² 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-25₁₉₇ 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-25₁₉₇ 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

3. Production of hybridomas.

[0167] To make hybridomas producing α-SNAP-25 monoclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P₁ 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-25₁₃₄₋₁₉₇ and the BirA-HisTag[®]-SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ peptides coated in two separate plates. The comparative ELISA provided a quick screen method to identify hybridomas producing antibodies specific for the cleaved SNAP-25₁₉₇. 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 7).

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

Table 7. 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	—	—

[0168] 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-25₁₉₇ cleavage product relative to the SNAP-25₂₀₆ uncleaved substrate and detected the SNAP-25₁₉₇-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-25₂₀₆ uncleaved substrate relative to the SNAP-25₁₉₇ cleavage product and detected the SNAP-25₂₀₆-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.

[0169] 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, ascites from clones 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5, and 3C3E2 were used to

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

detect SNAP-25 cleavage product using the cell-based activity assay, immunocytochemistry and immunoprecipitation.

[0170] 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-25₂₀₆ substrate and the cleaved SNAP-25₁₉₇ product by Western blot analysis. A suitable density of PC12 cells were plated into 60 mm² 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 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-25₂₀₆ substrate and the cleaved SNAP-25₁₉₇ 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-25₂₀₆ substrate and the cleaved SNAP-25₁₉₇ 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-25₂₀₆ substrate and the cleaved SNAP-25₁₉₇ 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-25₁₉₇ product, was used at a 1:100 dilution according to the manufacturer's recommendations.

[0171] Table 8 indicates the α -SNAP-25 antibody-containing ascites that detected only the SNAP-25₁₉₇ 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-25₁₉₇ cleavage product that allows for the selective recognition of this cleavage product relative to the SNAP-25₂₀₆ uncleaved substrate. Commercial antibody SMI-81 detected the SNAP-25₂₀₆ uncleaved substrate, but only poorly recognized the SNAP-25₁₉₇ cleavage product (Table 8). Surprisingly, commercial antibody MC-6050 only detected the SNAP-25₂₀₆ uncleaved substrate, and failed to recognize the SNAP-25₁₉₇ cleavage product (Table 8). Even more surprisingly, commercial antibody MC-6050 only detected the SNAP-25₂₀₆ uncleaved substrate, and failed to recognize the SNAP-25₁₉₇ cleavage product, even though the manufacturer advertises that this antibody selectively detects the SNAP-25₁₉₇ cleavage product (Table 8). Thus, this analysis indicates that while 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, and 3C3E2 exhibit suitable selectivity for the SNAP-25₁₉₇ cleavage product, 1G10A12 and 2F11B6 do not. In addition, commercial antibodies SMI-81, MC-6050 and MC-6053 all are unsuitable for

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

the immuno-based methods disclosed in the present application because all failed to selectively detect the SNAP-25₁₉₇ cleavage product.

[0172] For immunocytochemistry analysis, binding specificity was determined by analyzing the ability of α -SNAP-25 antibody-containing ascites to detect the uncleaved SNAP-25₂₀₆ substrate and the cleaved SNAP-25₁₉₇ 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 8 indicates that the α -SNAP-25 antibody-containing ascites that specifically detected the SNAP-25₁₉₇-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-25₁₉₇ cleavage product that allows for the preferential recognition of this cleavage product relative to the SNAP-25₂₀₆ uncleaved substrate.

[0173] 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-25₂₀₆ substrate and the cleaved SNAP-25₁₉₇ 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 μ l 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 μ g 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 μ l 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 μ l 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-25₂₀₆ substrate and the cleaved SNAP-25₁₉₇ 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 IV) and the secondary antibody used was a 1:20,000 of rabbit α -IgG Horseradish Peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Table 8 indicates the α -SNAP-25 antibody-containing ascites that specifically pulled down the SNAP-25₁₉₇-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-25₁₉₇ cleavage product that allows for the preferential recognition of this cleavage product relative to the SNAP-25₂₀₆ uncleaved substrate.

Table 8. 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.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[0175] To determine the binding affinity of an α -SNAP-25 monoclonal antibody showing high binding specificity for either the SNAP-25₁₉₇ cleavage product or the SNAP-25₂₀₆ 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 μ L/min. SNAP-25 peptides comprising amino acids 134-197 of SEQ ID NO: 5 (SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇) or amino acids 134-206 of SEQ ID NO: 5 (SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆) 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-hydroxysuccinimide; the SNAP-25 peptides were then injected in 10 mM sodium acetate (pH 4.0) for 20 min at a flow rate of 10 μ L/min; and unreacted succinimide esters were blocked by a 7-min injection of 1 M ethanolamine hydrochloride, pH 8.5. The immobilized amount of SNAP-25₁₃₄₋₁₉₇ or SNAP-25₁₃₄₋₂₀₆ on the chip was reflected by a 100-150 increase in response units (about 0.10-0.15 ng/mm²). 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 μ L/min. Sensorgram curves were fitted to a 1:1 kinetic binding model with the BIAevaluation 3.0 software.

[0176] The results indicate that both 2E2A6 and 3C1A5 were highly specific for cleaved SNAP-25₁₉₇ product over SNAP-25 uncleaved substrate (Table 9). When compared to the binding affinities of MC-6050 and MC-6053, 1D3B8 had an approximately 10-fold higher equilibrium disassociation constant for the SNAP-25 cleavage product relative to these commercial antibodies (Table 9). 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 9). As neither of these commercial α -SNAP-25 antibodies selectively recognized the SNAP-25 cleavage product (Table 8), 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 about at least one-fold slower off rate/dissociation constant (6.74×10^{-5} versus $8.82 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $1.18 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)(Table 9). 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 $5.78 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (Table 9).

Table 9. Analysis of Binding Affinity α -SNAP-25 Monoclonal Antibodies				
SPR Parameter	1D3B8		2E2A6*	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^a	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^b
Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	1.06×10^6	—	1.70×10^6 (1.66×10^6)	— (—)
Kd (s ⁻¹)	5.78×10^{-5}	—	1.53×10^{-4} (6.74×10^{-5})	— (—)

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

KD (nM)	0.050	—	0.090 (0.405)	— (—)
SPR Parameter	3C1A5		2C9B10	
	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆ ^c	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-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-25 ₁₉₇	SNAP-25 ₂₀₆	SNAP-25 ₁₉₇	SNAP-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 Two independent runs were conducted for this antibody with two different chips. ^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.				

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

[0177] 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 P₁ 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 V_L chains and consensus sequences were determined (Table 10). 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

[0178] 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 variant 1 (SEQ ID NO: 77), 3C1A5 V_H variant 2 (SEQ ID NO: 79), 3C3E2 V_H (SEQ ID NO: 81); 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 variant 1 (SEQ ID NO: 78), 3C1A5 V_H variant 2 (SEQ ID NO: 80), 3C3E2 V_H (SEQ ID NO: 82); 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 10.

Table 10. 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 variant 2	93
V_H CDR 1	TFTNYVIH	3C1A5 variant 1 3C3E2	94
V_H CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V_H CDR 2	YLFPGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5 variant 2	97
V_H CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C1A5 variant 1 3C3E2	98
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V_H CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5 variant 2	100
V_H CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
V_H CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C1A5 variant 1 3C3E2	102
V_L CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
V_L CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
V_L CDR 1	RASKSVSTSGYSYMH	2E2A6	105
V_L CDR 1	KASQDIKSYLS	3C1A5	106

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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	LVSNLES	2E2A6	110
V _L CDR 2	YATSLAD	3C1A5	111
V _L CDR 2	YASQSIG	3C3E2	112
V _L CDR 3	FQGSHVPPT	1D3B8	113
V _L CDR 3	QHGYGTPYT	2C9B10	114
V _L CDR 3	QHIRELTRS	2E2A6	115
V _L CDR 3	LQHGESPFT	3C1A5	116
V _L CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

[0179] 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 variant 2; V_H CDR1 variant SEQ ID NO: 120 for 3C1A5 V_H variant 1 and 3C3E2; 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 variant 2; V_H CDR2 variant SEQ ID NO: 123 for 3C1A5 V_H variant 1, and 3C3E2; V_H CDR3 variant MDY for 1D3B8 and 2C9B10; V_H CDR3 variant MGY for 2E2A6 and 3C1A5 V_H variant 2; and V_H CDR3 variant SEQ ID NO: 124 for 3C1A5 V_H variant 1 and 3C3E2. 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 IV

Development of α -SNAP-25 Polyclonal Antibodies that Selectively Bind a SNAP-25 Epitope Having a Free Carboxyl-terminus at the P₁ Residue of the BoNT/A Cleavage Site Scissile Bond

[0180] 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 P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

[0181] To develop α -SNAP-25 polyclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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.

[0182] A similar strategy based on other SNAP-25 antigens disclosed in the present specification is used to develop α -SNAP-25 polyclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. 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, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148.

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

[0183] 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 P₁ 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 P₁ 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.

[0184] To purify α -SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P₁ 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.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[0185] 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 P₁ 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, immunocytochemistry 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-25₁₉₇ cleavage product that allows for the preferential recognition of this cleavage product relative to the SNAP-25₂₀₆ uncleaved substrate. Affinity for the antigens can be determined using SPR in the BiAcore as described in Example III.

Example V

Component and Condition Preparation for a Sandwich ELISA

[0186] 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 BoNT/A activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using a α -SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

1. Preparation of cell lysates from cells treated with BoNT/A.

[0187] To obtain a BoNT/A 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 BoNT/A complex. 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 MgCl₂, 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.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

2. Preparation and identification of sandwich ELISA components.

[0188] 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).

[0189] 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.

[0190] To prepare the detection antibody solution, the appropriate α -SNAP-25 antibody was conjugated to Ruthenium(II)-tris-bipyridine-(4-methylsulfonate) 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 μ L of distilled water reconstituted MSD SULFO-TAG™ stock solution to 200 μ L 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.

[0191] To prepare the solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleavage product, approximately 5 μ L of the appropriate α -SNAP-25 monoclonal antibody solution (20 μ g/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 μ L 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.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[0192] 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 μ L of a lysate from cells treated with BoNT/A, 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 μ L 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20[®] (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 μ L of 5 μ g/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 μ L 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20[®] (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 150 μ L 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 12). 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 12. 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

19	S9684 rabbit pAb	C-18 goat pAb	No	No	0.7:1
20	S9684 rabbit pAb	SMI-81 mouse 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

3. Optimization of cell differentiation conditions.

[0193] To determine the optimal differentiation condition for a cell line comprising cells susceptible to BoNT/A intoxication when using a sandwich ELISA detection system, both various cell culture media and length of differentiation time were tested.

[0194] To determine an optimal differentiation medium, a suitable density of cells from a SiMa cell line was plated into the wells of Collagen IV coated 24-well cell culture plates containing 1 mL of one of the following medias and differentiation supplements: 1) RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-Glutamine, and 25 µg/mL GT1b; 2) RPMI-1640, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, and 25 µg/mL GT1b; 3) Minimum Essential Medium, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, and 25 µg/mL GT1b; and 4) RPMI-1640, 10% BSA, 1 x N2 supplement, 1 x NGF supplement, and 25 µg/mL GT1b. 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 3 days). The media was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.2 pM, 2 pM, or 20 pM of a BoNT/A complex. After an overnight treatment, the cells were washed, incubated for an additional two days without toxin to allow for the cleavage of the SNAP-25 substrate, and harvested as described above in Section 1. The protein concentrations of cell lysates were measured by Bradford assay. Detection of the presence of cleaved SNAP-25 product by ECL sandwich ELISA analysis was performed as described above using Antibody Pair 1. As discussed in Example I, undifferentiated cells did not take up toxin as effectively as differentiated cells. The most effective differentiation medium for increasing BoNT/A uptake and consequently SNAP-25 cleavage medium 3 (MEM+N2+B27), followed by medium 2 (RPMI-1640+N2+B27), and medium 4 (RPMI-1640 +N2+NGF+BSA) (FIG. 3). Cells cultured in medium 2 resulted in more cleavage of the SNAP-25 as compared to the other media.

[0195] To determine an optimal differentiation time, a suitable density of cells from a SiMa cell line was plated into the wells of poly-D-lysine coated 96-well cell culture plates containing 100 µL 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 and 25 µg/mL

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

GT1b. Cells were plated at four different days to obtain a differentiation time course testing 6 hrs, 24 h, 48 hrs, and 72 hrs, and were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide. The media was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.1 pM, 0.2 pM, 0.4 pM, 0.8 pM, 1.6 pM, 3.1 pM, 6.25 pM, 12.5 pM, or 25 pM of a BoNT/A complex. After an overnight treatment, the cells were washed, incubated for an additional two days without toxin to allow for the cleavage of the SNAP-25 substrate, and harvested as described above in Section 1. After harvesting, the protein concentrations of cell lysates and detection of the presence of cleaved SNAP-25 product by ECL sandwich ELISA analysis were performed as described above. The raw data obtained from the ECL imager was then transferred to SigmaPlot v. 9.0 and a 4-parameter logistics fit was used to define the dose-response curves. There were no constraints used for the 4-parameter logistic function when plotting the data. Graphical reports were generated using the following analysis: R2 (correlation coefficient), a (Max for data set), b (hillslope), and $X0 \pm SE$ (EC_{50} value $\pm$ standard error). The results indicated that EC_{50} values of less than 2 pM could be achieved with cells differentiated for 48-72 hrs (FIG. 4). The finding that differentiated cells could be used between 48 hrs to 72 hrs of differentiation, with no significant changes on the performance of the cells, highlights the robustness of the assay. Although differentiation time periods less than 48 hrs may not be suitable for picomolar testing of formulated product, these lesser differentiation times are sensitive enough for bulk drug substance testing.

4. Optimization of BoNT/A treatment time.

[0196] To determine the optimal length of time cells from a cell line need to be treated with a BoNT/A, various lengths of BoNT/A treatment times were tested. A suitable density of cells from a SiMa cell line was plated into the wells of poly-D-lysine coated 96-well cell culture plates containing 100 μ L 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 and 25 μ g/mL GT1b. Cells were plated and 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 3 days). The media was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.1 pM, 0.2 pM, 0.4 pM, 0.8 pM, 1.6 pM, 3.1 pM, 6.3 pM, 12.5 pM, or 25 pM of a BoNT/A complex in RPMI 1640 growth medium in triplicate to generate a full dose-response. Five different BoNT/A treatment length regimens were performed: 1) a 6 hrs BoNT/A treatment, removal and washing of cells, an incubation of cells for 18 hr without BoNT/A, and harvesting of cells as described above in Section 1; 2) a 24 hrs BoNT/A treatment, removal and washing of cells, and harvesting of cells as described above in Section 1; 3) a 24 hrs BoNT/A treatment, removal and washing of cells, an incubation of cells for 24 hr without BoNT/A, and harvesting of cells as described above in Section 1; 4) a 24 hrs BoNT/A incubation, removal and washing of cells, an incubation of cells for 48 hr without BoNT/A, and harvesting of cells as described above in Section 1; and 5) a 24 hrs BoNT/A incubation, removal and washing of cells, an incubation of cells for 72 hr without BoNT/A, and harvesting of cells as described above in Section 1. After harvesting, the protein concentrations of cell

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

lysates, detection of SNAP-25 cleavage product by ECL sandwich ELISA performed, and the EC_{50} calculated as described above. The results indicate that EC_{50} values of less than 2 pM could be achieved with any of the BoNT/A treatments tested (FIG. 5). Interestingly, the 24 hrs + 24 hrs, 24 hrs + 48 hrs, and 24 hrs + 73 hrs BoNT/A treatment regimes generated essentially the same EC_{50} values, 1.0 pM, 1.1 pM and 0.9 pM respectively. The EC_{50} values generated for the 6 hrs + 18 hrs and 24 hrs + 0 hrs BoNT/A treatment regimes were 1.7 pM and 1.6 pM respectively. Although the amount of signal obtained was lower, these results indicate that BoNT/A treatment times between 6 hrs to 24 hrs plus one day to three days post-treatment incubation can be used to generate an EC_{50} that is adequate for detecting BoNT/A activity and give flexibility in the assay's overall time course.

5. Sensitivity of immuno-based method of detecting BoNT/A activity.

[0197] To evaluate the sensitivity of the immuno-based methods of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification, the timing of BoNT/A uptake by cells susceptible to BoNT/A intoxication was determined. A suitable density of cells from a SiMa cell line was plated into the wells of poly-D-lysine coated 96-well cell culture plates containing 100 μ L 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 and 20 μ g/mL GT1b. 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 3 days). The media was aspirated from each well, replaced with fresh media containing 1 nM of a BoNT/A complex, and the BoNT/A treated cells were incubated at six different time points of 0 min (neurotoxin added and then immediately removed), 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, and 60 min. A negative control of media with no BoNT/A (0 nM) was used. After incubation, the cells were washed and harvested as described above in Section 1. After harvesting, the protein concentrations of cell lysates, detection of SNAP-25 cleavage product by ECL sandwich ELISA performed, and the EC_{50} calculated as described above. The results indicated that uptake of BoNT/A by the cells took less than one minute before producing significant amounts of SNAP-25 cleavage product over background (FIG. 6).

6. Specificity of immuno-based method of detecting BoNT/A activity.

[0198] To evaluate the specificity of the immuno-based methods of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification, the capacity of cells susceptible to BoNT/A intoxication to accurately distinguish BoNT/A to the exclusion of partially inactivated BoNT/A was determined. A suitable density of cells from a SiMa cell line was plated into the wells of poly-D-lysine coated 96-well cell culture plates containing 100 μ L 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 and 25 μ g/mL GT1b. 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

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

and neurite extension (approximately 3 days). The media was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 1) 0 (untreated sample), 0.03 pM, 0.1 pM, 0.31 pM, 0.93 pM, 2.78 pM, 8.33 pM, and 25 pM, of a BoNT/A complex; 2) 0, 0.14 nM, 0.41 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.11 nM, 33.33 nM, and 100 nM of an inactive BoNT/A (iBoNT/A); or 3) 0, 0.14 nM, 0.41 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.11 nM, 33.33 nM, and 100 nM of an LH_N/A fragment. The iBoNT/A contains a mutation in the zinc binding domain of the light chain that completely inactivates the metalloprotease activity of the neurotoxin, see, e.g., Liqing Zhou, et al., *Expression and Purification of the Light Chain of Botulinum Neurotoxin A: A Single Mutation Abolishes its Cleavage of SNAP-25 and Neurotoxicity after Reconstitution with the Heavy Chain*, *Biochemistry* 34: 15175-15181 (1995), which is hereby incorporated by reference in its entirety. The LH_N/A fragment lacks the binding domain, but contains an intact translocation domain and light chain, see, e.g., Clifford C. Shone, et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. Patent 6,461,617, which is hereby incorporated by reference in its entirety. After 24 hrs treatment, the cells were washed, incubated for an additional two days without toxin to allow for the cleavage of SNAP-25 substrate, and harvested as described above in Section 1. After harvesting, the protein concentrations of cell lysates, detection of SNAP-25 cleavage product by ECL sandwich ELISA performed, and the EC₅₀ calculated as described above. The results indicate that the binding affinity of cells for iBoNT/A and LH_N/A (EC₅₀ > 100 nM) are at least 60,000 lower than the binding affinity for BoNT/A (EC₅₀ = 1.6 pM) (FIG. 7). No SNAP-25 cleavage product was detected in cells treated with iBoNT/A at all concentrations tested. Although a low amount of SNAP-25 cleavage product was detected in cells treated with the highest dose of the LH_N/A fragment, this activity is due to non-specific uptake of this fragment due to the activity of the translocation domain. Thus, the results indicate that the immuno-based methods of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification can measure all the steps involved in the intoxication process whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate and encompasses the binding of a BoNT/A to a BoNT/A receptor, the internalization of the neurotoxin/receptor complex, the translocation of the BoNT/A light chain from an intracellular vesicle into the cytoplasm and the proteolytic cleavage of a SNAP-25.

Example VI

Immuno-Based method of Detecting BoNT/A Activity Using ECL Sandwich ELISA

[0199] The following example illustrates immuno-based methods of detecting BoNT/A activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using a α -SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond using ECL sandwich ELISA.

[0200] To prepare a lysate from cells treated with a BoNT/A, a suitable density of cells from an established cell line was plated into the wells of 96-well tissue culture plates containing 100 μ L 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 and 25 μ g/mL GT1b (see Examples I and II). These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 3 days). The media from the differentiated cells was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.03 pM, 0.1 pM, 0.3 pM, 0.9 pM, 2.8 pM, 8.3 pM, and 25 pM of a BoNT/A complex. After a 24 hr treatment, the cells were washed, and incubated for an additional two days without toxin. To cells were harvested as described in Example V.

[0201] 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-methylsulfonate) 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 V.

[0202] To prepare the solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleaved product, approximately 5 μ L of α -SNAP-25 monoclonal antibody 2E2A6 solution (20 μ g/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 BoNT/A activity.

[0203] 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 μ L of a lysate from cells treated with BoNT/A 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 μ L 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20[®] (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 μ L of 5 μ g/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 μ L 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20[®] (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 150 μ L 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 EC₅₀ calculated as described in Example V. A representative result is shown in FIG. 8. These results indicated that on average 1.0 pM of BoNT/A at the EC₅₀ was detected (a range of about 0.3 pM to about 2.0 pM) 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 20:1 to about 500:1.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

Example VII**Immuno-Based method of Detecting BoNT/A Activity Using CL Sandwich ELISA**

[0204] The following example illustrates immuno-based methods of detecting BoNT/A activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using a α -SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond by CL sandwich ELISA.

[0205] Lysate from cells treated with a BoNT/A and the α -SNAP-25 capture antibody solution were prepared as described in Example VI.

[0206] To prepare the α -SNAP-25 detection antibody solution, α -SNAP-25 polyclonal antibody S9684 (Sigma, St. Louis, MO) was conjugated to Horseradish peroxidase (HRP) according to the manufacturer's instructions (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). The conjugation reaction was performed by adding to 500 μ L of 1 mg/mL α -SNAP-25 polyclonal antibodies to a vial containing lyophilized activated peroxidase, mixing the components, and then adding 10 μ L of sodium cyanoborohydride. This reaction mixture was incubated at room temperature for 1 hour in a fume hood. After quenching the reaction, 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 polyclonal antibody/HRP conjugate was measured at 455 nm using a spectrophotometer to determine the concentration in moles per liter. The α -SNAP-25 detection antibody solution was stored at 4 °C until needed.

[0207] To prepare the solid phase support comprising the α -SNAP-25 capture antibody that is specific for the SNAP-25 cleaved product, approximately 100 μ L of α -SNAP-25 monoclonal antibody 2E2A6 solution (1 mg/mL in 1 x PBS) was added to each well of a 96-well Greiner white plate and the plates were incubated at 4 °C overnight, and then any excess antibody solution was discarded. The capture antibody-bound wells were then blocked by adding 150 μ L 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 was discarded and the plates were blotted dry on paper towels by inverting and tapping. The capture antibody-bound wells were then blocked and used directly to detect BoNT/A activity.

[0208] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by CL sandwich ELISA analysis, 50 μ L of a lysate from cells treated with BoNT/A was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated on a shaker rotating at 500 rpm at 4 °C for 2-4 hours to overnight. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 μ L 1 x PBS, 0.05 % TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 100 μ L of 1 mg/mL α -SNAP-25 polyclonal antibody/HRP detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 on a shaker rotating at 650 rpm at room temperature for 1 hour. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 200 μ l 1 x PBS, 0.05% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 100 μ l of SuperSignal ELISA Pico 1:1 mixture (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) was added to each well and the plates were read using a luminometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 395 nm. The collected data was analyzed and the EC_{50} calculated as described in Example V. These results indicated that on average 1.0 pM of BoNT/A at the EC_{50} was detected (a range of about 0.3 pM to about 2.0 pM) 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 20:1 to about 500:1.

Example VIII

Immuno-Based method of Detecting BoNT/A Activity Using Multiplex ECL Sandwich ELISA

[0209] The following example illustrates multiplex immuno-based methods of detecting BoNT/A activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using a α -SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 cleavage product and a second antibody pair for a different protein.

1. Preparation and identification of capture antibody-detection antibody pair for a second protein.

[0210] To obtain an untreated cell lysate for analysis, a suitable density of cells from a stock culture of SiMa cells were seeded into a T175 flask containing 40 mL of a growth medium containing 1X RPMI 1640, 10% FBS, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 100 U/100 μ g of penicillin-streptomycin. These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells were approximately 70-90% confluent. The cells were washed and harvested by lysing in freshly prepared Triton X-100 Lysis Buffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 0.001M EDTA, 1 mM EGTA, and 1% Triton-X-100) at 4°C for approximately 30 minutes with constant agitation. Lysed cells were centrifuged at approximately 3300-3330 x g for 40 minutes at 8°C to eliminate debris using a bench-top centrifuge.

[0211] To identify an appropriate capture antibody-detection antibody pair for a second protein, an ECL sandwich ELISA analysis was conducted on 21 different combinations of capture and detection antibody pairs comprising of five different proteins (Table 13). The antibodies used were α -Syntaxin 1A-HPC mouse monoclonal antibody S0664 (Sigma, St. Louis, MO), α -GAPDH mouse monoclonal antibody MAB374 (Chemicon, Temecula, CA), α -Syntaxin 1 rabbit polyclonal antibody S1172-1 (Sigma, St. Louis, MO), α -GAPDH rabbit polyclonal antibody 2275-PC-1 (R & D Systems, Minneapolis, MN), α -Syntaxin 2 rabbit polyclonal antibody S5687 (Sigma, St. Louis, MO), α -human syntaxin 2 mouse monoclonal antibody MAB2936 (R & D Systems, Minneapolis, MN), α -mouse syntaxin 2 goat polyclonal antibody

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

AF2568 (Sigma, St. Louis, MO), α -Syntaxin 2 rabbit polyclonal antibody AB5596 (Sigma, St. Louis, MO), α -Syntaxin 1 rabbit polyclonal antibody S1172-2 (Sigma, St. Louis, MO), α -h, m, r actin sheep polyclonal antibody AF4000 (R & D Systems, Minneapolis, MN), α -beta actin mouse monoclonal antibody A1978 (Sigma, St. Louis, MO), α -beta mouse polyclonal antibody actin A2228 (Sigma, St. Louis, MO), mouse α -GAPDH mouse monoclonal antibody G8795 (Sigma, St. Louis, MO), α -GAPDH rabbit polyclonal antibody G9595 (Sigma, St. Louis, MO).

[0212] To prepare the second protein capture antibody solution, the monoclonal antibodies were purchased as purified antibodies. To prepare the second protein detection antibody solution, the appropriate antibody was conjugated to Ruthenium(II)-tris-bipyridine-(4-methylsulfonate) 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 μ L of distilled water reconstituted MSD SULFO-TAG™ stock solution to 200 μ L of 2 mg/mL 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 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.

[0213] To prepare the solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleaved product, approximately 5 μ L of α -SNAP-25 monoclonal antibody 2E2A6 solution (20 μ g/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, and then the plates were sealed and stored at 4 °C until needed. The dried capture antibody-bound wells were then blocked by adding 150 μ L of Blocking Buffer comprising of 3% BSA (Pierce, Rockford, IL) 10% goat serum (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA), and Difco 1% skim milk (BD BioSciences Franklin Lakes, NJ) in 0.05% Tween-20 PBS at room temperature for 1-2 hours.

[0214] To detect the presence of protein by ECL sandwich ELISA analysis, the Blocking Buffer from stored plates was aspirated from the wells, 25 μ L of a lysate from cells treated with BoNT/A, 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 μ L 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 μ L of 5 μ g/mL the appropriate second protein detection antibody solution, resuspended in the blocking buffer as described above, was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated at room temperature for about 1 hour with shaking. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 250 μ L 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 150 μ L 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,

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

Gaithersburg, MD). A ratio was calculated by dividing the signal obtained from the untreated cell lysates for each antibody-pair by the signal obtained for the lysis buffer control (0 nM dose) for each antibody-pair (Table 13). These results indicated that among the twenty-one different combinations of antibody pairs tested, only two antibody pairs had signal-to-noise ratios above 10:1 for the higher dose tested: Pair No. 16 α -GAPDH mouse monoclonal antibody MAB374 and α -GAPDH rabbit polyclonal antibody RDS2275-PC-1; and Pair 21: α -GAPDH mouse monoclonal antibody MAB374 and α -GAPDH rabbit polyclonal antibody G9545. The α -GAPDH mouse monoclonal antibody MAB374 and α -GAPDH rabbit polyclonal antibody G9545 pair was selected as the second protein capture antibody-detection antibody pair for the multiplex ECL sandwich ELISA.

Table 13. Screening of Second Protein Antibody Combinations				
Antibody Pair No.	Capture Antibody	Detection Antibody	Detection of Protein	Signal/Noise Ratio (lysate/buffer)
1	α -syntaxin 2 S5687 pAb	α -syntaxin 2 MAB2936 mAb	No	0.92
2	α -syntaxin 2 AF2568 pAb	α -syntaxin 2 AB5596 pAb	No	1.1
3	α -syntaxin 2 AF2568	α -syntaxin 2 S5687 pAb	No	1.11
4	α -syntaxin 2 AF2936 pAb	α -syntaxin 2 AB5596 pAb	Yes	1.63
5	α -syntaxin 2 AF2936 pAb	α -syntaxin 2 S5687 pAb	Yes	1.6
6	α -syntaxin 2 AB5596 pAb	α -syntaxin 2 S5687 pAb	No	0.82
7	α -syntaxin 2 AB5596 pAb	α -syntaxin 2 MAB2936 mAb	No	0.87
8	α -syntaxin 2 MAB2936 mAb	α -syntaxin 2 AB5596 pAb	Yes	1.2
9	α -syntaxin 2 MAB2936 mAb	α -syntaxin 2 S5687 pAb	No	1.07
10	α -syntaxin S0664 mAb	α -syntaxin 1 S1172-1 pAb	Yes	4.23
11	α -syntaxin S0664 mAb	α -syntaxin 1 S1172-2 pAb	No	1.21
12	α -syntaxin 1 S1172-1 pAb	α -syntaxin S0664 mAb	Yes	5.5
13	α -syntaxin 1 S1172-2 pAb	α -syntaxin S0664 mAb	Yes	2.5
14	α -h,m,r actin AF4000 pAb	α -beta actin A1978 mAb	No	1.04
15	α -h,m,r actin AF4000 pAb	α -beta actin A2228 mAb	No	1.08
16	α -GAPDH MAB374 mAb	α -GAPDH 2275-PC-1 pAb	Yes	20.04
17	α -GAPDH MAB374 mAb	α -GAPDH G8795 mAb	No	0.89
18	α -GAPDH 2275-PC-1 pAb	α -GAPDH MAB374 mAb	No	1.08
19	α -GAPDH 2275-PC-1 pAb	α -GAPDH G8795 mAb	Yes	1.27
20	α -GAPDH G8795 mAb	α -GAPDH 2275-PC-1 pAb	Yes	2.74
21	α -GAPDH MAB374 mAb	α -GAPDH G9545 pAb	Yes	≥ 100

2. Immuno-based method of detecting BoNT/A activity using multiplex ECL sandwich ELISA.

[0215] To obtain a BoNT/A treated cell lysate for analysis, a suitable density of cells from a stock culture of a SiMa cell line were seeded into a poly-D-lysine 96-well plate containing 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 3 days). The media

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.67 U/mL, 2.35 U/mL, 8.23 U/mL, 28.82 U/mL, 101 U/mL, 353 U/mL of a BoNT/A complex. After a 24 hr treatment, the cells were washed, incubated for an additional two days without toxin. The cells were washed, harvested, and processed as described above in Section 1.

[0216] The α -SNAP-25 capture antibody solution and the α -SNAP-25 detection antibody solution, were prepared as described in Example VII. To prepare the α -GAPDH capture antibody solution, the α -GAPDH monoclonal antibody mouse MAB374 (Chemicon, Temecula, CA) was prepared as described in Section 1 above. To prepare the α -GAPDH detection antibody solution, α -GAPDH rabbit polyclonal antibody G9545 (Sigma, St. Louis, MO) was conjugated to Ruthenium(II)-tris-bipyridine-(4-methylsulfonate) 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 Section 1 above.

[0217] To prepare the solid phase support comprising the α -SNAP-25 capture antibody and the α -GAPDH capture antibody, approximately 2.5 nL of the α -SNAP-25 capture antibody solution (45 μ g/mL in 1 x PBS) and 2.5 nL of the α -GAPDH capture antibody solution (120 μ g/mL in 1 x PBS) were added to each well of a 96-well MSD High Bind plate in a multiplex format using a robotic system. The solution is allowed to air dry in a biological safety cabinet for at least 2-3 hours in order to liquid evaporate the solution. The capture antibody-bound wells were then blocked and used directly to detect BoNT/A activity and the GAPDH protein.

[0218] To detect the presence of SNAP-25 cleavage product by multiplex ECL sandwich ELISA analysis, the Blocking Buffer from stored plates was aspirated from the wells, 25 μ L of a lysate from cells treated with BoNT/A, 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 μ L 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 μ L of 5 μ g/mL the α -SNAP-25 detection antibody solution and 25 μ L of 5 μ g/mL the α -GAPDH detection antibody solution, as described above, was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated at room temperature for about 1 hour with shaking. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 250 μ L 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 150 μ L 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 relative potency from the normalized data is calculated as described in Example V, except that PLA 2.0 software (Stegmann Systems, GmbH, Germany) was used.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[0219] As a comparison, the detection of SNAP-25 cleavage product was also performed using the singleplex ECL sandwich ELISA as described in Example VI.

[0220] The results indicated that the SNAP-25 data obtained from the singleplex ECL sandwich ELISA, or from the non-normalized SNAP-25 data obtained from the multiplex ECL sandwich ELISA, revealed one outlier sample dose that did not fit into the dose-response curve. However, normalization of the SNAP-25 data against the GAPDH data gave a better curve fit and the potency was closer to the expected value.

Example IX

Immuno-Based method of Detecting BoNT/A Activity Using Multiplex EC Sandwich ELISA

[0221] The following example illustrates multiplex immuno-based methods of detecting BoNT/A activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using a α -SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 cleavage product and a second antibody pair for a different protein.

[0222] The lysate from cells treated with a BoNT/A was prepared 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 VII.

[0223] To prepare α -GAPDH capture antibody solution, α -GAPDH monoclonal antibody MAB374 (Millipore, Billerica, MA) was purchased as a purified antibody. To prepare the α -GAPDH detection antibody solution, an α -GAPDH polyclonal antibody G9545 (Sigma, St. Louis, MO) was conjugated to Horseradish peroxidase (HRP) according to the manufacturer's instructions (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). The conjugation reaction, concentration determination and storage were as described in Example VII.

[0224] To prepare the solid phase support comprising a second capture antibody specific for the second protein, approximately 100 μ L of monoclonal antibody solution comprising 1 μ g/mL α -GAPDH monoclonal antibody MAB374 was added to each well of a 96-well Greiner white plate and the plates were incubated at 4 °C overnight, and then any excess antibody solution was discarded. The α -GAPDH capture antibody-bound wells were then blocked by adding 150 μ L 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 was discarded and the plates were blotted dry on paper towels by inverting and tapping. The capture antibody-bound wells were then blocked and used directly to detect BoNT/A activity.

[0225] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by multiplex CL sandwich ELISA analysis, 50 μ L of cell lysates from cells treated with BoNT/A was added to each well of the α -SNAP-25 capture

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

antibody solid phase support and the α -GAPDH capture antibody solid phase support, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated on a shaker rotating at 500 rpm at 4 °C for 2-4 hours to overnight. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 μ L 1 x PBS, 0.05 % TWEEN-20[®] (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 100 μ L of a detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20[®] (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate), and 1 mg/mL α -SNAP-25 polyclonal antibody/HRP was added to each well of the α -SNAP-25 capture antibody solid phase support, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated on a shaker rotating at 650 rpm at room temperature for 1 hour. Similarly, 100 μ L of a detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20[®] (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate), and 0.25 mg/mL α -GAPDH G9545 polyclonal antibody/HRP (Sigma Co., St Louis, MO) was added to each well of the α -GAPDH capture antibody solid phase support, the plate was sealed, and the sealed plate was placed on a shaker rotating at 650 rpm at room temperature for 1 hour. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 200 μ L 1 x PBS, 0.05% TWEEN-20[®] (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 100 μ L of SuperSignal ELISA Pico 1:1 mixture (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) was added to each well and the plates were read using a luminometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 395 nm. The collected data was analyzed and the EC_{50} calculated as described in Example V. The results indicated that the data points collected for the amounts of α -SNAP-25 antibody-antigen complex detected were a better fit after normalization to the amounts of α -GAPDH antibody-antigen complex detected, thereby producing a more accurate reading. These results indicated that on average 1.0 pM of BoNT/A at the EC_{50} was detected (a range of about 0.3 pM to about 2.0 pM) 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 20:1 to about 500:1.

[0226] A similar design can be used for multiplex immuno-based methods of detecting BoNT/A activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using a α -SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P₁ residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond using ECL sandwich ELISA with the same α -GAPDH antibody pair.

Example X

Immuno-Based Method to Detect Picomolar Amounts of BoNT/A

[0227] The following example illustrates how to perform immuno-based methods of detecting BoNT/A activity that can detect picomolar amounts of the BoNT/A pharmaceutical product, such as, e.g., BOTOX[®], DYSPORT[®]/RELOXIN[®], PURTOX[®], XEOMIN[®], NEURONOX[®], or BTX-A.

1. Immuno-based method of detecting BoNT/A using ECL sandwich ELISA.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[0228] To prepare a lysate from cells treated with a BoNT/A, approximately 50,000 to 150,000 cells from an established cell line were plated into the wells of 96-well tissue culture poly-D-lysine plates containing 100 μ L 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 and 25 μ g/mL GT1b (see Examples I and II). 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). The media from the differentiated cells was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.03 pM, 0.1 pM, 0.3 pM, 0.9 pM, 2.8 pM, 8.3 pM, or 25 pM of a BoNT/A pharmaceutical product reconstituted in a sodium chloride free solution; or 0 (untreated sample), 0.7 U/mL, 2.1 U/mL, 6.2 U/mL, 18.5 U/mL, 55.6 U/mL, 166.7 U/mL or 500 U/mL of a BoNT/A pharmaceutical product reconstituted in a sodium chloride free medium. Because the BoNT/A pharmaceutical product contains sodium chloride, its addition to the culture medium resulted in a hypertonic media that was detrimental to cell viability. To circumvent the hypertonicity issue, 200 μ L of MEM media made without sodium chloride was used to reconstitute the BoNT/A pharmaceutical product giving a final concentration of 25 pM BoNT/A (500 U/mL). The matrix was kept constant for all concentrations along the dose-response curve by adding sodium chloride in the media used to make the dilutions match the amount of excipients present at the highest concentration used (25 pM or 500 U/mL). After a 24 hr treatment, the cells were washed, and incubated for an additional two days without toxin. To harvest the cells, the medium was aspirated, washed with 1 x PBS, and lysed by adding 30 μ L of Lysis Buffer comprising 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 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.

[0229] 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 VI.

[0230] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by ECL sandwich ELISA analysis, the Blocking Buffer from stored plates was aspirated, 25 μ L of a lysate from cells treated with BoNT/A was added to each well and the plates were incubated at 4 °C for either 2 hrs or 24 hrs. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 μ L 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 μ L of 5 μ g/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 μ L 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, the plates were processed, collected data

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

was analyzed, and the EC_{50} calculated as described in Example V. These results indicated that on average 1.0 pM of BoNT/A at the EC_{50} was detected (a range of about 0.3 pM to about 2.0 pM) 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 20:1 to about 500:1 (FIG. 9). This method can also be performed in a multiplex fashion as described in Example VIII.

2. Immuno-based method of detecting BoNT/A using CL sandwich ELISA.

[0231] Lysate from cells treated with a BoNT/A and the α -SNAP-25 capture antibody solution will be prepared as described in Example VI. 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 VII.

[0232] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by CL sandwich ELISA analysis, 25 μ L of a lysate from cells treated with BoNT/A will be added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated on a shaker rotating at 500 rpm at 4 °C for either 2 hrs or 24 hrs. Plate wells will be washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 μ L 1 x PBS, 0.05 % TWEEN-20[®] (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 100 μ L 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 was sealed, and the sealed plate was 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 μ L 1 x PBS, 0.05% TWEEN-20[®] (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 100 μ L 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 V. This method can also be performed in a multiplex fashion as described in Example VIII.

Example XI

Immuno-Based Method to Detect Neutralizing α -BoNT/A Antibodies

[0233] The following example illustrates how to perform an immuno-based method that can detect the presence of neutralizing α -BoNT/A antibodies.

[0234] BoNT/A, is currently used for a wide range of medical indications including muscle hyperactivity, ophthalmologic, gastrointestinal, urologic, and cosmetic. With repeated long-term treatment of BoNT/A, a patient may develop neutralizing α -BoNT/A antibodies to the toxin leading to immunoresistance. Neutralizing α -BoNT/A antibodies inhibit BoNT/A activity by stopping the toxin's uptake into neuronal cells by binding to the binding domain (H_C) and/or the translocation domain (H_N) of BoNT/A. Some studies

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

have suggested that up to 5-10% of patients repeatedly treated for dystonia with formulations of BoNT/A have immunoresistance due to the development of neutralizing α -BoNT/A antibodies. The established assay to determine the presence of the neutralizing α -BoNT/A antibodies in patient's blood is the mouse protection assay (MPA). Currently, BoNT/A is incubated with a patient's serum prior to injection into mice. The presence of antibodies is manifested by a decreased response to the neurotoxin in the animal. Since the MPA is an in vivo based assay, it would be more cost and time efficient if it was replaced with a cell-based assay.

[0235] To detect the presence or absence of neutralizing α -BoNT/A antibodies, the immuno-based methods of determining BoNT/A 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 BoNT/A using a Western blot detection method, the other way was to use an ECL sandwich ELISA detection method.

[0236] To prepare a sample comprising neutralizing α -BoNT/A antibodies and a negative control sample known to lack α -BoNT/A neutralizing antibodies, serum was isolated from blood of different individuals. Individuals declining immunizations were referred to as naïve individuals. Individuals accepting immunization were referred to as immunized individuals. The blood was drawn into a serum tube with a clot activator (BD Biosciences, Bedford, MA). Serum was obtained by centrifugation of the blood at 1000xg for 10 minutes at 4°C. The serum of two donors was obtained: one individual was immunized to BoNT/A while the other was not.

[0237] To prepare a lysate from cells treated with a sample comprising BoNT/A, SiMa cells were seeded in a poly-D-lysine 96-well plate and differentiated as described in Example VI. The human serums were serially diluted 1:100 – 1:152,000 by 2.5 fold increments using serum-free media. The BoNT/A was suspended in 0.5 mL SiMa culture media at a concentration of 10 pM. The media containing BoNT/A and α -BoNT/A antibodies were mixed and incubated for 15 min or 1 hr at room temperature. The cells were treated with BoNT/A with human serum for 2 hr followed by a 15 hr incubation in fresh growth media. The cells were also treated for 15 hr with no additional incubation time.

[0238] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by Western blot analysis, the media was aspirated from each well, the cells suspended in 50 μ L of SDS-PAGE loading buffer, and then heated to 95 °C for 5 minutes. An aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that harvested samples are separated by SDS-PAGE using 12 % 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the rabbit polyclonal α -SNAP-25₁₉₇ antibody serum was used as the primary antibody (see Example IV). The results indicate that test samples resulted in reduced cleavage of SNAP25 when compared to the negative control sample, demonstrating that the serum from the immunized individual contained neutralizing α -BoNT/A antibodies.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

[0239] 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 V. 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 VII. Supernatants were transferred to the α -SNAP-25 solid phase support and an ECL sandwich ELISA assay was performed as detailed in Example V. The collected data was analyzed and the EC_{50} calculated as described in Example V, except that the EC_{50} is the serum dilution needed to inhibit the activity of the BoNT/A to $\frac{1}{2}$ 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 serum by the signal obtained with the lowest serum dilution.

[0240] The results indicate that the presence of neutralizing α -BoNT/A in human serum could be detected. The activity of the BoNT/A complex incubated in serum from the immunized individual decreased as the serum dilution decreased, whereas, the presence of naïve serum had no impact on the assay at every dilution tested. This assay can be performed using a formulated BoNT/A pharmaceutical product, a bulk BoNT/A complex, or a purified neurotoxin.

Example XII

Immuno-Based Method to Detect BoNT/A Activity Using Engineered Cells

[0241] The following example illustrates how to introduce a polynucleotide molecule encoding a BoNT/A receptor into cells from an established cell line to further improve susceptibility to BoNT/A intoxication or improve BoNT/A uptake capacity.

[0242] To introduce an exogenous BoNT/A receptor into cells comprising an established cell line, an expression construct comprising a polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 130 encoding the FGFR2 of SEQ ID NO: 59, or a polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 139 encoding the FGFR3 of SEQ ID NO: 25, was transfected into cells from an established cell line by a cationic lipid method. A suitable density (about 5×10^6 cells) of cells from an established cell line are plated in a 100 mm tissue culture dish containing 5 mL of complete culture media and grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells reached a density appropriate for transfection. A 3 mL transfection solution is prepared by adding 1.5 mL of OPTI-MEM Reduced Serum Medium containing 60 μ L of LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) incubated at room temperature for 5 minutes to 1.5 mL of OPTI-MEM Reduced Serum Medium containing 24 μ g of an expression construct encoding a FGFR2 or a FGFR3, or a control expression construct encoding a green fluorescent protein (GFP). This transfection mixture was incubated at room temperature for approximately 30 minutes. The complete media is replaced with the 3 mL transfection solution and the cells are incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for approximately 8 hours. Transfection media is replaced with 3 mL of fresh complete culture media and the cells are incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for approximately 24 hours. Media is replaced with 3 mL of fresh complete culture media containing approximately 1mM G418 (Invitrogen,

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

Carlsbad, CA). Cells are incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for approximately 1 week, the old media is replaced with fresh complete culture media containing 0.5 mM G418. Once antibiotic-resistant colonies are established, resistant clones are replated to new 100 mm culture plates containing fresh complete culture media, supplemented with approximately 0.5 mM G418 until these cells reached a density of 6 to 20x10⁵ cells/mL.

[0243] To determine if the overexpression of BoNT/A receptors improved cell susceptibility to BoNT/A intoxication or improved BoNT/A uptake capacity, a dose-response curve was generated using cells treated with different doses of a BoNT/A complex. To prepare a lysate from cells treated with a BoNT/A, a suitable density of cells from an established transfected cell line was plated into the wells of 96-well tissue culture plates containing 100 µL of an appropriate serum-free medium (Table 5). 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 3 days). The media from the differentiated cells was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.01 nM, 0.04 nM, 0.12 nM, 0.37 nM, 1.1 nM, 3.3 nM, and 10 nM of a BoNT/A complex for cells comprising a SiMa or a PC12 transfected cell line; and 0 (untreated sample), 0.14 nM, 0.40 nM, 1.2 nM, 3.7 nM, 11 nM, 33 nM, and 100 nM of a BoNT/A complex for cells comprising a Neuro-2a transfected cell line. The cells were treated with BoNT/A containing media for 6 hrs followed by incubation with fresh media for 15 hrs and harvested by adding 40 µL of 2 x SDS-PAGE loading buffer and heating the plate to 95 °C for 5 min.

[0244] To detect for the presence of SNAP-25 cleavage product, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that harvested samples are separated by SDS-PAGE using 12% 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the following primary antibodies were used a 1:1,000 dilution of rabbit polyclonal α-SNAP-25 antibody serum (Example IV) (AGN, polyclonal antibody), a 1:500 dilution of α-FGFR2 rabbit polyclonal C-17 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), or a 1:500 dilution of α-FGFR3 rabbit polyclonal C-15 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The intensity of the protein of interest from each sample was calculated using Image Quant (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and the EC₅₀ for each of the cells lines was estimated using SigmaPlot software.

[0245] The results indicate that cells transfected with FGFR2 or FGFR3 were more sensitive to BoNT/A than cells transfected with GFP and also showed a higher level of SNAP-25 cleavage (Table 14). The EC₅₀ values for cells over-expressing FGFR2 or FGFR3 were lower than the EC₅₀ values exhibited by cells over-expressing GFP, indicating that introduction of FGFR2 or FGFR3 improved cell susceptibility to BoNT/A intoxication or improved BoNT/A uptake capacity.

Table 14. Effects of Introducing Exogenous BoNT/A Receptors on Cell Susceptibility to BoNT/A Intoxication or BoNT/A Uptake

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

Cells	Transfected Gene	EC ₅₀ (nM)	Max Signal
SiMa	GFP	0.0812 ± 0.010	22,733,787
SiMa	FGFR2	0.0459 ± 0.003	26,136,578
SiMa	FGFR3	0.0377 ± 0.006	24,326,271
PC-12	GFP	3.3362 ± 1.881	26,956,063
PC-12	FGFR2	0.3429 ± 0.059	25,376,114
PC-12	FGFR3	0.2634 ± 0.026	24,102,459
Neuro-2a	GFP	61.80 ± 9.710	4,605,974
Neuro-2a	FGFR2	31.59 ± 8.800	23,279,765
Neuro-2a	FGFR3	11.55 ± 5.240	28,347,413

[0246] Detection for the presence of SNAP-25 cleavage product can also be performed using sandwich ELISA as described in Examples VI-X.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

What is claimed:

1. A composition comprising a carrier, a flexible linker and a SNAP-25 antigen, wherein the flexible linker comprises at least three amino acids and the SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 148.

2. The composition of Claim 2, wherein the flexible linker and the SNAP-25 antigen amino acid sequence is SEQ ID NO: 38.

3. An isolated α -SNAP-25 antibody,

wherein the isolated α -SNAP-25 antibody binds an epitope comprising a carboxyl-terminus glutamine from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product;

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 $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; and

wherein the α -SNAP-25 antibody has an equilibrium disassociation constant for the epitope of less than 0.450 nM.

4. The isolated α -SNAP-25 antibody of Claim 3, wherein the epitope is SEQ ID NO: 32.

5. An isolated α -SNAP-25 antibody comprising,

- a. a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, or SEQ ID NO: 82; and

- b. a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, or SEQ ID NO: 92.

6. An isolated α -SNAP-25 antibody comprising,

- a. a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 121, or SEQ ID NO: 100; and

- b. a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110, or SEQ ID NO: 115.

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

7. An isolated α -SNAP-25 antibody comprising at least a V_H CDR3 of SEQ ID NO: 100, a V_H CDR3 of SEQ ID NO: 101, or a V_H CDR3 of SEQ ID NO: 102.
8. A method of detecting BoNT/A activity, the method comprising the steps of:
 - a. treating a cell from an established cell line with a sample comprising a BoNT/A, wherein the cell from an established cell line is susceptible to BoNT/A intoxication by about 500 pM or less of a BoNT/A;
 - 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 epitope 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 $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 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 BoNT/A activity.
9. The method of Claim 8, wherein the SNAP-25 cleavage product is SNAP-25₁₉₇.
10. The method of Claim 8, wherein the presence of an antibody-antigen complex is detected using a sandwich ELISA.
11. The method of Claim 8, 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.
12. The method of Claim 8, wherein the sample comprises at most 100 pM of a BoNT/A

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

13. The method of Claim 8, wherein the cell from an established cell line is susceptible to BoNT/A intoxication by about 100 pM or less of a BoNT/A.
14. The method of Claim 8, wherein the method is performed in a singleplex fashion or a multiplex fashion.
15. A method of determining BoNT/A immuno-resistance in a mammal comprising the steps of:
- a. adding a BoNT/A to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α -BoNT/A 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 BoNT/A intoxication;
 - c. isolating from the treated cells a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus glutamine from 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;
- wherein the α -SNAP-25 antibody binds an epitope 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 $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; and the α -SNAP-25 antibody has an equilibrium disassociation constant for the epitope of less than 0.450 nM;
- 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 glutamine from the BoNT/A cleavage site scissile bond;
 - f. repeating steps b-e with a negative control sample instead of a test sample, the negative control sample comprising a BoNT/A and a serum known not to contain α -BoNT/A 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,

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

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 -BoNT/A neutralizing antibodies.

(57) **Abstract:** The present specification discloses SNAP-25 compositions, methods of making α -SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, α -SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P₁ residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, methods of detecting BoNT/A activity, and methods of detecting neutralizing α -BoNT/A antibodies.

FIG. 1A.

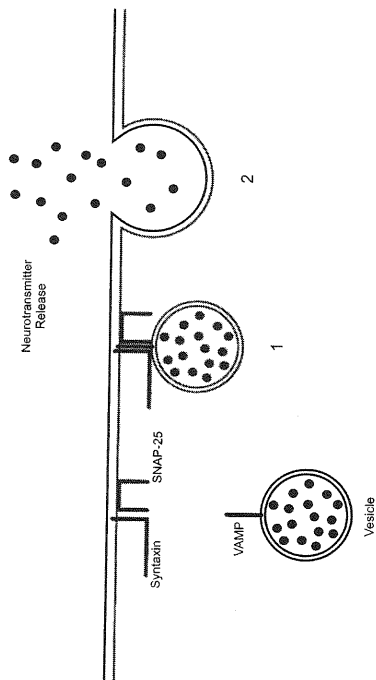
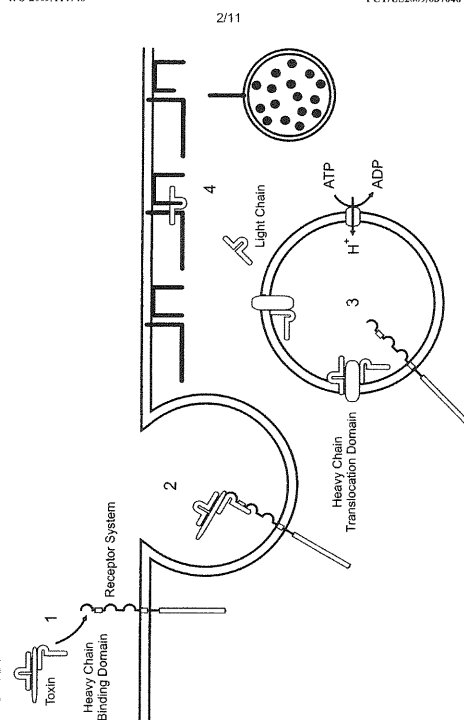
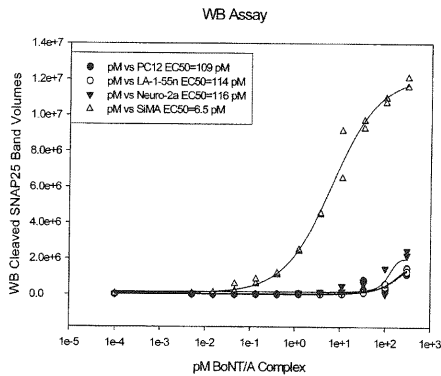


FIG. 1B.



WO 2009/114748 PCT/US2009/037046

FIG. 2. 3/11 A



B

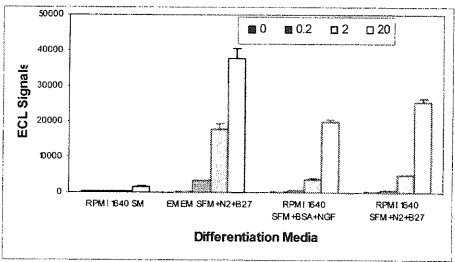
Signal Noise Ratio	PC12	LA-1-55n	Neuro-2a	SiMa
300pM/0pM	107	121	184	412
1.2pM/0pM	3	2	8	35

NSDCCID: <WO_2009114748A1_1_>

NSDCCID: <WO_2009114748A1_1_>

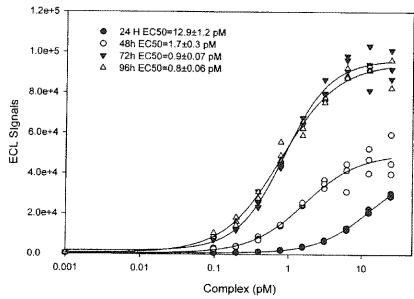
WO 2009/114748 PCT/US2009/037046

FIG. 3. 4/11



WO 2009/114748 PCT/US2009/037046

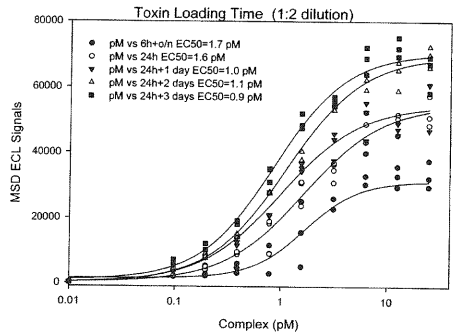
FIG. 4. 5/11



NSDCCID: <WO_2009114748A1_1_>

WO 2009/114748 PCT/US2009/037046

FIG. 5. 6/11



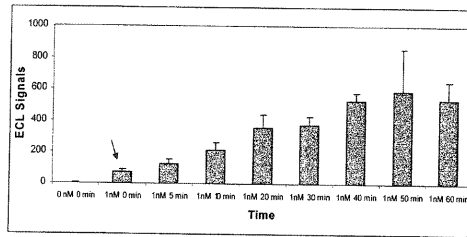
NSDCCID: <WO_2009114748A1_1_>

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

FIG. 6.

7/11

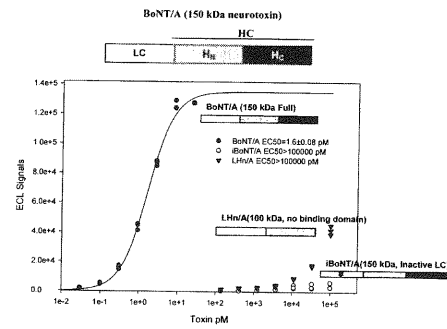


WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

FIG. 7.

8/11



VSCC/D: <WO_2009114748A1_1>

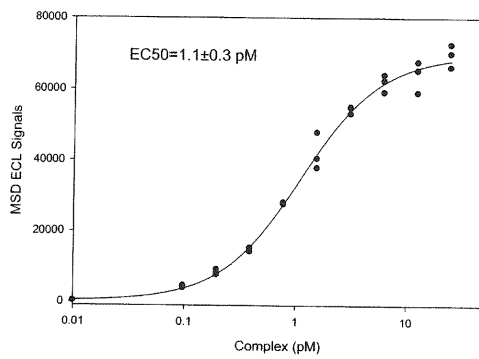
VSCC/D: <WO_2009114748A1_1>

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

FIG. 8.

9/11

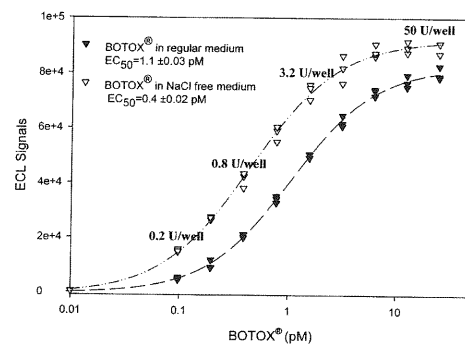


WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

FIG. 9.

10/11



VSCC/D: <WO_2009114748A1_1>

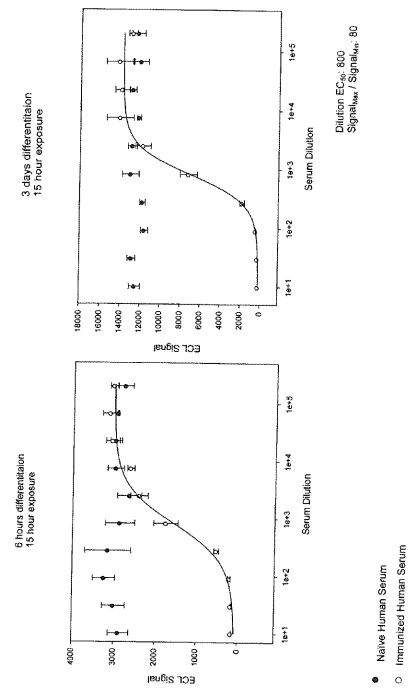
VSCC/D: <WO_2009114748A1_1>

WO 2009/114748

PCT/US2009/037046

11/11

FIG. 10.



VS000000-1WO_2009114748A1_1_1

【配列表】
2013100304000002.app

专利名称(译)	基于免疫的肉毒杆菌毒素血清A型活性测定		
公开(公告)号	JP2013100304A	公开(公告)日	2013-05-23
申请号	JP2012279973	申请日	2012-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	阿勒根公司		
申请(专利权)人(译)	Aragan公司		
[标]发明人	エステルフェルナンデスサラス ジョアンワン パットンイーガレイ リナエスウオング ディアンディホッジス ケイロジャーアオキ		
发明人	エステル・フェルナンデス・サラス ジョアン・ワン パットン・イー・ガレイ リナ・エス・ウオング ディアン・ディ・ホッジス ケイ・ロジャー・アオキ		
IPC分类号	A61K38/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P27/02 A61P25/02 G01N33/53 G01N33/543 C07K14/33 C07K16/12		
CPC分类号	A61P25/00 A61P25/02 A61P25/04 A61P25/08 A61P27/02 C07K16/1282 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/92 C12Q1/37 G01N33/5014 C07K14/10 C07K14/33 C07K16/12 G01N33/569 G01N33/566 G01N33/6854		
FI分类号	A61K37/02.ZNA A61P25/04 A61P25/08 A61P27/02 A61P25/02.103 G01N33/53.D G01N33/543.545.A C07K14/33 C07K16/12 A61K38/00 A61K38/16		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA04 4C084/CA53 4C084/DA33 4C084/NA20 4C084/ZA06 4C084/ZA08 4C084/ZA29 4C084/ZA30 4C084/ZA33 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	61/036723 2008-03-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供包含A型肉毒杆菌神经毒素血清（BoNT / A）的药物组合物。 SNAP-25组合物结合包含来自SNAP-25裂解产物的BoNT / A切割位点易断键的P 1 残基的羧基末端的表位。制备α-SNAP-25抗体的方法，其与来自SNAP-25裂解产物的BoNT / A裂解位点易裂解键的P 1 残基处的羧基末端的表位结合。通过与α-SNAP-25抗体在药物中与大量BoNT / A相关的过程，检测BoNT / A活性的方法和检测α-BoNT / A中和抗体的方法确定，一种药物组合物。 【选择图】无

【表 1 - 1】

表 1 細胞株スクリーニングで使用された培地	
細胞株	血清成長培地組成
Kelly SiMa	RPMI1640、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリノーストレプトマイシン、2mM L-グルタミン
NB69	RPMI1640、15%ウシ胎仔血清、1%ペニシリノーストレプトマイシン
CHP-126	RPMI1640、20%ウシ胎仔血清、1%ペニシリノーストレプトマイシン
N4TG3	RPMI1640、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリノーストレプトマイシン、100 μ M 6-チオグアニン
MHH-NB -11	RPMI1640、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリノーストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、0.1mM非必須アミノ酸
PC12	RPMI1640、5%熱不活化ウシ胎仔血清、10%ウマ血清、2mM GlutaMAX (商標)、10mM HEPES、1mMピルビン酸ナトリウム、1%ペニシリノーストレプトマイシン
N18TG2	DMEM (11885-084、Gibco) 、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリノーストレプトマイシン、100 μ M 6-チオグアニン
N1E-115 N18 ND8 / 34 NG108-15 NG115-40 1L NS20Y SK-N-SH	90%DMEM、10%熱不活化ウシ胎仔血清、2mMグルタミン、2mMグルコース