

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5826635号  
(P5826635)

(45) 発行日 平成27年12月2日(2015.12.2)

(24) 登録日 平成27年10月23日(2015.10.23)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 33/53 (2006.01)** GO 1 N 33/53 D  
**C 1 2 Q 1/02 (2006.01)** C 1 2 Q 1/02  
**C 1 2 Q 1/37 (2006.01)** C 1 2 Q 1/37

請求項の数 13 (全 135 頁)

(21) 出願番号	特願2011-554260 (P2011-554260)	(73) 特許権者	591018268
(86) (22) 出願日	平成22年3月12日(2010.3.12)		アラージェン、インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2012-520470 (P2012-520470A)		ALLERGAN, INCORPORATED
(43) 公表日	平成24年9月6日(2012.9.6)		ED
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/027244		アメリカ合衆国92612カリフォルニア
(87) 国際公開番号	W02010/105236		州アーヴィン、デュボン・ドライブ252
(87) 国際公開日	平成22年9月16日(2010.9.16)		5番
審査請求日	平成25年3月11日(2013.3.11)	(74) 代理人	100092093
(31) 優先権主張番号	61/160, 217		弁理士 辻居 幸一
(32) 優先日	平成21年3月13日(2009.3.13)	(74) 代理人	100082005
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫系調節エンドペプチターゼ活性アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a. 確立された細胞株由来の細胞を再標的化エンドペプチダーゼを含む試料を用いて処理すること、ここで該確立された細胞株由来の細胞は、再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である；

b. 前記処理した細胞から、B o N T / A切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基にカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 開裂産物を含む S N A P - 2 5 成分を単離すること；

c. 前記 S N A P - 2 5 成分を、固相担体に結合させた - S N A P - 2 5 抗体に接触させること、ここで前記 - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 開裂産物由来の B o N T / A切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基にカルボキシル末端を含むエピトープに結合する

10

前記 - S N A P - 2 5 抗体は、配列番号：71、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、もしくは配列番号：81の核酸配列、または配列番号：71、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、もしくは配列番号：81と少なくとも90%同一の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を有する、

前記 - S N A P - 2 5 抗体は、配列番号：83、配列番号：87、配列番号：89、もしくは配列番号：91の核酸配列、または配列番号：83、配列番号：87、配列番号：89、もしくは配列番号：91と少なくとも90%同一の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、および

前記 - S N A P - 2 5 抗体は、配列番号：72、配列番号：76、配列番号：78、

20

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む重鎖可変領域、並びに配列番号：84、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む軽鎖可変領域を有する；

d. 前記 - S N A P - 25 抗体および前記 S N A P - 25 開裂産物を含む抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること、ここで該抗体 - 抗原複合体による検出が、再標的化エンドペプチダーゼの活性を示す、

を含む、再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する方法。

【請求項2】

前記 - S N A P - 25 抗体が、配列番号：72のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：84のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の方法

10

【請求項3】

前記 - S N A P - 25 抗体が、配列番号：76のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：88のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の方法

【請求項4】

前記 - S N A P - 25 抗体が、配列番号：78のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：90のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の方法

【請求項5】

前記 - S N A P - 25 抗体が、配列番号：80または配列番号：82のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：92のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の方法。

20

【請求項6】

前記 S N A P - 25 開裂産物が S N A P - 25<sub>197</sub> である、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

前記抗体 - 抗原複合体の存在がサンドイッチ E L I S A を用いて検出される、請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

S N A P - 25 開裂産物由来の B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基にカルボキシル末端を含むエプトープに結合する - S N A P - 25 抗体、ここで、

前記 - S N A P - 25 抗体は、配列番号：71、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、もしくは配列番号：81の核酸配列、または配列番号：71、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、もしくは配列番号：81と少なくとも90%同一の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を有する、

前記 - S N A P - 25 抗体は、配列番号：83、配列番号：87、配列番号：89、もしくは配列番号：91の核酸配列、または配列番号：83、配列番号：87、配列番号：89、もしくは配列番号：91と少なくとも90%同一の核酸配列にコードされるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、および

30

40

前記 - S N A P - 25 抗体は、配列番号：72、配列番号：76、配列番号：78、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む重鎖可変領域、並びに配列番号：84、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む軽鎖可変領域を有する。

【請求項9】

配列番号：72のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：84のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、請求項8に記載の抗体。

【請求項10】

配列番号：76のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：88のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、請求項8に記載の抗体。

50

## 【請求項 1 1】

配列番号：78のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：90のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、請求項8に記載の抗体。

## 【請求項 1 2】

配列番号：80または配列番号：82のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：92のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、請求項8に記載の抗体。

## 【請求項 1 3】

前記SNAP-25開裂産物がSNAP-25<sub>197</sub>である、請求項8～12のいずれかに記載の抗体。

## 【発明の詳細な説明】

10

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2009年3月13日に提出され、米国特許法第119(e)項によって、米国特許仮出願第61/160,217号に対する優先権を主張し、全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

本明細書に開示されている配列は本明細書に添付された配列リストに含まれ、全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0003】

神経伝達を阻害するボツリヌス神経毒素(BONTs)、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/FおよびBoNT/G、ならびに破傷風神経毒素(TeNT)などのクロストリジウム毒素の能力は、幅広い様々な治療と美容の用途に活用されている。例えば、William J. Lipham、Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin (Slack, Inc., 2004)を参照のこと。医薬組成物として市販されているクロストリジウム毒素は、BOTOX(登録商標)(Allergan, Inc., Irvine, CA)、DYSPOORT(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)、BTX-A(Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China)などのBoNT/A調製物およびMYOBLOC(登録商標)/NEUROBLOC(登録商標)(Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA)などのBoNT/B調製物を含む。一例として、BOTOX(登録商標)は、現在、1つ以上の国において、以下の適応症：アカラシア、成人痙縮、肛門裂傷、背部痛、眼瞼痙攣、歯ぎしり、痙性斜頸、本態性振戦、眉間の表情皺または運動過多性顔面線、頭痛、片側顔面けいれん、膀胱の亢進、多汗症、若年性脳性麻痺、多発性硬化症、ミオクローヌス疾患、鼻唇褶の皺、痙攣性発声障害、斜視およびVII脳神経障害などにおいて承認されている。

20

30

40

## 【0004】

クロストリジウム毒素処理は、シナプス間隙に神経伝達物質およびニューロペプチドを分泌するのに使うエキソサイトーシスプロセスを破壊して神経伝達物質およびニューロペプチドの放出を阻害する。クロストリジウム毒素治療を種々の慢性疼痛、神経性の炎症、および尿路性器系疾患などの感覚神経の疾患、さらには肺炎などの他の疾患を治療している筋弛緩薬での現在の適用を超えて拡張したいという強い要望が製薬業界にある。クロストリジウム毒素の治療を拡張するのに用いる1つのアプローチは、修飾された毒素が目的の神経細胞または非神経細胞について変化した細胞ターゲティング能力を有するようす

50

るクロストリジウム毒素の修飾である。再標的化エンドペプチダーゼまたは標的化血管エキソサイトーシスモジュレーター蛋白質 (TVEMPs) と呼ばれ、この分子は目的の神経または非神経標的細胞にある標的受容体を用いてエキソサイトーシス阻害作用を達成する。この再標的化能力は、目的の神経または非神経標的細胞にある非クロストリジウム毒素受容体について選択的結合活性を示す標的ドメインでクロストリジウム毒素の天然の結合ドメインを置換して達成する。このような修飾の結合ドメインは、標的細胞にある非クロストリジウム毒素受容体に選択的に結合できる分子をもたらす。再標的化エンドペプチダーゼは標的受容体と結合し、細胞質に転位し、かつ、目的の神経または非神経標的細胞のSNARE複合体に対する蛋白質分解作用を発揮することができる。

#### 【0005】

再標的化エンドペプチダーゼの1つの群は、オピオイド標的ドメインを有する分子を含む。このオピオイド再標的化エンドペプチダーゼはオピオイド標的ドメイン、クロストリジウム毒素転座ドメインおよびクロストリジウム毒素酵素ドメインを含む。オピオイド再標的化エンドペプチダーゼまたはオピオイド-TVEMPの非限定的な例は、Keith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions (米国特許第5,989,545号); J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins (米国特許第7,132,259号); Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain (米国特許第7,244,437号); Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain (米国特許第7,413,742号); Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain (米国特許第7,415,338号); Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use (米国特許第7,514,088号); Keith A. Foster, Fusion Proteins (米国特許出願公開第2008/0064092号); Keith A. Foster, Fusion Proteins (米国特許出願公開第2009/0035822号); Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use (米国特許出願公開第2009/0048431号); Keith A. Foster, Non-Cytotoxic Protein Conjugates (米国特許出願公開第2009/0162341号); Keith A. Foster et al., Retargeted Toxin Conjugates (国際公開第2005/023309号); および Lance E. Steward, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells (国際公開第2008/008805号) に記載されている。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

再標的化エンドペプチダーゼとクロストリジウム毒素との間の全般的な違いの1つは、再標的化エンドペプチダーゼが運動ニューロンを典型的には標的にせず、哺乳動物に再標的化エンドペプチダーゼの過剰投与に関連する致死性は完全に避けられていないが、大幅

10

20

30

40

50

に小さいことである。例えば、オピオイド再標的化エンドペプチダーゼは致死性の証拠が認められる前に治療有効量の10,000倍で投与することができ、かつ、この致死性は分子受動拡散によるものであり中毒プロセス経路によるものではない。従って実際には再標的化エンドペプチダーゼは非致死の分子である。この非致死の特性は治療的利益はあるが、クロストリジウム毒素に基づく生物製剤の製薬に使う標準的活性アッセイが致死性テストのマウスLD50バイオアッセイなので製造上の問題がある。例えば、S. S. Arnon et al., JAMA 285: 1059-1070 (2001)を参照のこと。現在、マウスLD50バイオアッセイはクロストリジウム毒素製剤の力価を表すために全ての製薬会社で使用されている。実際、クロストリジウム毒素の活性単位はマウスLD50単位である。しかしながら、再標的化エンドペプチダーゼが本質的に非致死なのでマウスLD50バイオアッセイはこれらの分子の力価の評価に使用できない。従って再標的化エンドペプチダーゼに必要な全ての工程の完全性を評価できる簡単で、信頼性があり、実証され、かつ、政府が許容するアッセイは有意に価値がある。

10

【発明の効果】

【0007】

本明細書は、例えば、製薬および食品産業などの多様な産業に有用な再標的化エンドペプチダーゼ活性の新規の組成物、細胞およびアッセイ方法を提示し、かつ、関連する利点も合わせて提供する。そのような組成物、細胞および方法は生きた動物または生きた動物の細胞を使用しないで再標的化エンドペプチダーゼの作用に必要な全ての工程を評価できる。

20

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は中枢と末梢神経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の中毒における現在のパラダイムの概略図を示す。図1Aは中枢と末梢神経の神経伝達物質放出の放出機構の概略図を示す。放出プロセスは以下の2つの工程を含むものとして説明することができる。1) 伝達物質分子を含む小胞の小胞結合SNARE蛋白質が、原形質膜に位置する膜結合SNARE蛋白質に関連する小胞ドッキング、および2) 原形質膜と融合する小胞および神経伝達物質分子がエキソサイトーシスされた神経伝達物質放出。図1Bは中枢と末梢神経における破傷風菌とボツリヌス毒素活性における中毒機構の概略図を示す。この中毒プロセスは4つの工程を含むものとして説明することができる。1) クロストリジウム毒素がクロストリジウム受容体複合体と結合し、中毒プロセスを開始する受容体結合工程、2) 毒素結合後に毒素/受容体システム複合体を含む小胞が細胞内にエンドサイトーシスした複合体の内在化工程、3) 小胞の内部pHの変化、クロストリジウム毒素重鎖のH<sub>N</sub>ドメインを含むチャンネル孔の形成、重鎖からのクロストリジウム毒素軽鎖の分離、軽鎖の放出等を含んだ多重事象が起こると考えられている軽鎖の転座工程および4) クロストリジウム毒素の軽鎖がSNAP-25、VAMP、またはシタキシンなどの標的SNARE基質の蛋白質分解を起こし、これにより小胞ドッキングおよび神経伝達物質放出を防止する酵素標的の改変工程。

30

【図2】図2はORL-1を過剰発現するORL-1クローン#6のクローン細胞株での再標的化エンドペプチダーゼNoc/Aに対する標準用量応答を示す。Noc/Aの特異的取り込みはORL-1を過剰発現するORL-1クローン#6のクローン細胞株で認めることができる。切断されたSNAP-25<sub>197</sub>のECL ELISAでのORL-1安定細胞株クローン#6に対しておこなわれたNoc/A(LH<sub>N</sub>/Aに結合リガンドノシセプチン変異体を加えた)およびLHN/A(結合ドメインを有さないLC/AおよびHN)の処理は、Noc/Aの取り込みがこのクローン細胞株で特異的であることを示した。また、クローン細胞株は1.2nMのEC<sub>50</sub>でNoc/Aの高感度を示す。

40

【図3】図3はSK-N-DZ単一細胞由来のクローン#3および#22におけるNoc/Aに対する標準用量応答を示す。LHN/A(n=4独立試験運転)と比べたSK-N-DZ単一細胞由来のクローン#3および#22におけるNoc/Aの特異的取り込み。細胞はRPMI SFM + N2 + B27 + NGF中のポリ-D-リシン96ウェルプレ

50

ート上にプレATINGした。化合物の処理は22時間である。切断されたSNAP-25<sub>197</sub>のECL ELISAはNoc/Aの取り込みがこのクローン細胞株において特異であることを示した。さらにクローン細胞株はクローン#3が0.3nMのEC<sub>50</sub>で、クローン#22が0.9nMのEC<sub>50</sub>でNoc/Aについて高感度を示す。

【図4】図4は再標的化エンドペプチダーゼNoc/Aで処理されたORL1 ND7クローン1C11、4B7および4C9からのECLサンドイッチELISAアッセイの結果を示す。親ND7およびORL1 ND7クローンはNoc/Aで24時間処理し、その後2日間インキュベーションした。これが約50%のSNAP-25<sub>197</sub>切断に達するだけなのでクローンND7 EC<sub>50</sub>は計算できない。クローン4B7および1C11は約80%を超えるSNAP-25<sub>197</sub>切断に達する。EC<sub>50</sub>値は、それぞれ5.7 ± 0.5、6.7 ± 1および8.6 ± 2 nMと計算される。

10

【図5】図5は抗ノシセプチンポリクローナル抗体がSK-N-DZクローン#3、クローン#22およびAGN P33 ORL-1クローン#6細胞株における再標的化エンドペプチダーゼNoc/A取込をブロックできることを示す。細胞をRPMI SFM + N2 + B27 + NGF中のポリ-D-リシン96ウェルプレート上にプレATINGし、1nMのNoc/A中で異なる希釈率(0~3 μg/mL)で抗ノシセプチンポリクローナル抗体を含む無血清培地中で22時間処理した。

【図6】図6はSiMaクローンAF4由来の細胞を示し、かつ、ウエスタンプロット像に示されるように0.017nM~1 μMの濃度で樹立された細胞株PC-12が再標的化エンドペプチダーゼDyn/Aで処理された。投与量依存的な取り込みが両細胞株について認められた。

20

【図7】図7は抗体2E2A6、1D3B8、3C1A5および2C9B10並びに市販のMC-6050およびMC-6053の7.8nMでの正規化BIACore SPR曲線を示す。図7Aは各抗体のオン・レートについて正規化データを示す。図7Bは、各抗体のオフ・レートについて正規化データを示す。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本明細書は試料中の活性再標的化エンドペプチダーゼの有無を測定および標的エンドペプチダーゼの活性/力価を測定する新規のアッセイを提示する。本明細書における新規の細胞ベースのアッセイは、アッセイが試料中のナノモル量の再標的化エンドペプチダーゼを検出することを可能にする細胞、試薬および検出法に依存している。本明細書に開示された細胞ベースのアッセイは再標的化エンドペプチダーゼの複数の機能、例えば、細胞表面の受容体に対する再標的化エンドペプチダーゼ結合、エンドペプチダーゼ受容体複合体の内化、細胞質内への酵素ドメインの転座、基質の酵素ドメイン切断等を解析するのに役立つ。以下に説明するように、新規の方法および組成物は粗および塊サンプルならびに高度に精製された2本鎖再標的化エンドペプチダーゼおよび処方再標的化エンドペプチダーゼ製品の解析に使用でき、また、自動高速スループットアッセイ形式に適している。

30

【0010】

従って、本明細書の1つの態様は、BONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25切断産物を含むエピトープに選択的に結合するSNAP-25抗体を産生する免疫反応誘導組成物を提示する。免疫反応誘導組成物はSNAP-25抗原とキャリアとの間に柔軟性リンカーが介在し、アジュバンドおよびSNAP-25抗原に結合しているキャリアまたはSNAP-25抗原に結合している柔軟性スパーサと結合しているキャリアのSNAP-25抗原を含む組成物を誘導する免疫反応を含むことができる。BONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合できるSNAP-25抗体を産生する免疫反応を誘発する全てのSNAP-25抗原は、SNAP-25抗原として有用であり得るように構成されたものであり、限定するものではなく、天然のSNAP-25由来のSNAP-25抗原、天然では存在しないSNAP-25由来のSNAP-25およびSNAP-25の免疫反応性断片を含むSNAP-25抗原、天然のSNAP-25

40

50

または天然には存在しないS N A P - 2 5由来のS N A P - 2 5を含む。B o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するS N A P - 2 5エピトープに選択的に結合できる - S N A P - 2 5抗体の産生に有用なS N A P - 2 5抗原は、限定するものではなく、配列番号38を包含するキャリアペプチドに結合したカルボキシル化C末端グルタミンを有するS N A P - 2 5エピトープを含むS N A P - 2 5抗原を含む。B o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するS N A P - 2 5エピトープに選択的に結合できる - S N A P - 2 5抗体を構成するのに有用な他の免疫反応誘導組成物は、S N A P - 2 5抗原とキャリアとの間に柔軟性リンカーが介在し、限定するものではなく、S N A P - 2 5抗原に(カルボキシル化C末端グルタミンの)結合した柔軟性リンカーに結合したキャリアを含む免疫反応誘導組成物を含む。全てのアジュバントは、限定するものではなく、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(P V A)、完全なアジュバントおよび不完全なアジュバントを含んだ免疫反応誘導組成物において有用であり得るように構成されたものである。

10

## 【0011】

本明細書に開示された別の態様はB o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するS N A P - 2 5切断産物を含むエピトープに選択的に結合できる - S N A P - 2 5抗体を産生する方法を提示する。この方法の態様は、(a)本明細書に記載したS N A P - 2 5免疫反応誘導組成物を動物に投与する工程、(b) - S N A P - 2 5抗体または - S N A P - 2 5抗体産生細胞を含む試料を動物から回収する工程、および(c)試料から - S N A P - 2 5抗体を単離する工程、を含む。本明細書に開示する方法は、B o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するS N A P - 2 5切断産物を含むエピトープに選択的に結合できる - S N A P - 2 5モノクローナル抗体またはB o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するS N A P - 2 5切断産物を含むエピトープに選択的に結合できる - S N A P - 2 5ポリクローナル抗体のいずれかを産生する有用な方法である。

20

## 【0012】

本明細書に開示されたさらに別の態様は、B o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するS N A P - 2 5を含むエピトープに選択的に結合した - S N A P - 2 5抗体を提示する。そのような - S N A P - 2 5抗体は天然および天然では存在しない抗体に加え、さらにはモノクローナル - S N A P - 2 5抗体またはポリクローナル - S N A P - 2 5抗体も含む。B o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するS N A P - 2 5抗原に選択的に結合する - S N A P - 2 5抗体として有用なモノクローナル - S N A P - 2 5抗体は、限定するものではなく、ハイブリドーマ細胞株1 D 3 B 8、2 C 9 B 1 0、2 E 2 A 6、3 C 1 A 5および3 C 3 E 2から産生したモノクローナル - S N A P - 2 5抗体を含む。

30

## 【0013】

本明細書に開示された更に別の態様は、再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する免疫を利用した方法を提示する。この方法の態様は、(a)樹立した細胞株由来の細胞を再標的化エンドペプチダーゼを含む試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である、(b)B o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するS N A P - 2 5切断産物を含むS N A P - 2 5成分を処理された細胞から単離する工程、(c)S N A P - 2 5成分を本明細書に開示した - S N A P - 2 5抗体に接触させる工程および(d) - S N A P - 2 5抗体およびB o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するS N A P - 2 5切断産物を含む抗体-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が再標的化エンドペプチダーゼ活性を示す、を含む。工程(c)の - S N A P - 2 5抗体は任意で固相支持体に結合されてもよい。

40

## 【0014】

50

本明細書に開示された更に別の態様はオピオイド - T V E M P 活性を検出する免疫を利用した方法を提示する。この方法の態様は、( a ) 再標的化エンドペプチダーゼを取り込むことができる樹立した細胞株由来の細胞であり、樹立した細胞株由来の細胞を再標的化エンドペプチダーゼを含む試料で処理する工程、( b ) B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 を含む S N A P - 2 5 成分から処理した細胞を単離する工程、( c ) S N A P - 2 5 成分を本明細書に開示した - S N A P - 2 5 抗体に接触させる工程、および( d ) 抗体 - 抗原複合体による検出が再標的化エンドペプチダーゼ活性を示し、 - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 を含む抗体 - 抗原複合体の存在を検出する工程、を含む。工程( c ) の - S N A P - 2 5 抗体は任意で固相支持体に結合してもよい。

10

## 【 0 0 1 5 】

本明細書に開示の別の態様は哺乳動物の再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗を測定する方法を提示する。この方法の態様は、( a ) 抗体を中和する - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の有無を試験する哺乳動物から得た再標的化エンドペプチダーゼを試験試料に添加する工程、( b ) 再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞であり、樹立した細胞株由来の細胞を試験試料で処理する工程、( c ) B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 切断産物を含む S N A P - 2 5 成分を処理された細胞から単離する工程、( d ) S N A P - 2 5 成分を本明細書に開示した - S N A P - 2 5 抗体に接触させる工程、( e ) - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 切断産物を含む抗体 - 抗原複合体の存在を検出する工程、( f ) 試験試料ではなく陰性対照試料を用いて工程 a - e 工程を繰り返す工程および( g ) 工程( f ) で検出の抗体 - 抗原複合体の量と比べた工程( e ) で検出の抗体 - 抗原複合体の少量の検出は、 - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の存在を示唆し、工程( f ) で検出の抗体 - 抗原複合体の量を工程( e ) で検出の抗体 - 抗原複合体の量と比較する工程、を含む。工程( d ) の - S N A P - 2 5 抗体は任意で固相支持体に結合してもよい。さらに工程( f ) の標準試料は、陰性対照試料に加えて陽性対照試料を含むことができる。

20

## 【 0 0 1 6 】

ボツリヌス菌、破傷風菌、クロストリジウム・バラティおよび酪酸菌が産生するクロストリジウム毒素は、ヒトおよび他の哺乳類への治療と美容治療に幅広く使われている。ボツリヌス菌株はヒト( 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 / C 1 および B o N T / D ) においてまたは土壌から単離( B o N T / G ) されたボツリヌス症の発生を調べて同定されるボツリヌス毒素( B o N T s ) の抗原的に異なる7つの血清型を産生する。7つのボツリヌス毒素の血清型の全ては類似する構造と生物特性を有する一方で、例えば、薬理学的性質などの異種的な特性も示す。対照的に、破傷風毒素( T e N T ) は、破傷風菌の統一した群により産生される。さらにクロストリジウムの他の2つの種であるクロストリジウム・バラティおよび酪酸菌は B o N T / F および B o N T / E に類似する毒素をそれぞれ産生する。

30

40

## 【 0 0 1 7 】

それぞれのクロストリジウム毒素は、内因性クロストリジウム属の毒素プロテアーゼなどの天然のプロテアーゼまたは環境中で産生される天然のプロテアーゼなどが原因で、後にジスルフィドループ内でタンパク質分解切断によって開裂する約 1 5 0 k D a の単鎖ポリペプチドとして翻訳される。この翻訳後プロセスは、単一ジスルフィド結合および非共有結合的相互作用によりまとめられている約 5 0 k D a の軽鎖( L C ) と約 1 0 0 k D a の重鎖( H C ) を含む2本鎖分子を生じる。それぞれの成熟した2本鎖分子は機能的に異なる3つのドメインを含む。1) 神経伝達物質放出装置のコアとなる成分を特異的に標的とする亜鉛依存性エンドペプチダーゼ活性を包含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内への L C の放出を促

50

進するHC(HN)のアミノ末端半分以内に含有される転座ドメインおよび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HC(HC)のカルボキシ末端半分以内に認められる結合ドメイン。

【0018】

これら3つの機能的ドメインの結合、転座および酵素活性は毒性に必要なものである。このプロセスに関する詳細はまだ正確には明らかになっていないが、クロストリジウム毒素がニューロンに入り神経伝達物質放出を阻害するという総合的な細胞中毒機構は血清型またはサブタイプに係らずに類似している。出願者は以下の記載により限定されることを望まないが、中毒機構は少なくとも4つの工程を含むものとして説明することができる。

1)受容体結合、2)複合体の内在化、3)軽鎖の転座および4)酵素標的の改変(図1)。クロストリジウム毒素のHc結合ドメインが標的細胞の原形質膜表面に位置する毒素特異的な受容体システムに結合する場合にプロセスが開始される。受容体複合体の結合特異性はガングリオシドおよび個々のクロストリジウム毒素受容体複合体を明確に含むと考えられる蛋白質受容体の特定の組み合わせにより一部は達成されると考えられる。結合後、毒素/受容体複合体はエンドサイトーシスにより取り込まれ、かつ、取り込まれた小胞は特定の細胞内経路へ区分けされる。転座工程は小胞コンポーネントの酸性化により起こされると考えられる。このプロセスは疎水性を増大させ、小孔形成を促進させ、毒素の重鎖と軽鎖の分離を促進させる重要なpH依存性の構造再構成を開始すると思われる。分離後は細胞内小胞から神経伝達物質放出装置のコアとなる成分を特異的に標的とすると考えられるサイトゾルに毒素の軽鎖エンドペプチダーゼが放出される。このコアとなる蛋白質、小胞結合膜蛋白質(VAMP)/シナプトプレビン、25kDaシナプトソーム結合蛋白質(SNAP-25)およびシンタキシンは、神経終末でのシナプス小胞ドッキングおよび融合に必要であり、かつ、可溶性Nエチルマレイミド感受性因子接着蛋白質受容体(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におけるSNAP-25を切断し、9または26のアミノ酸断片をそれぞれ放出し、さらにBoNT/C1はカルボキシル末端の近傍のSNAP-25を切断して8つのアミノ酸断片を放出する。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の保存されている中央部分に働き、かつ、VAMPのアミノ酸末端部分をサイトゾルに放出する。BoNT/C1はサイトゾルの膜表面の近傍の単一の部位でシンタキシンを切断する。シナプスSNAREの選択的な蛋白質分解は、インビボでクロストリジウム毒素により起こる神経伝達物質放出のブロックに関係がある。クロストリジウム毒素のSNARE蛋白質標的は、さまざまな非神経細胞型におけるエキソサイトーシスに共通であり、神経細胞と同様にこのような細胞において、軽鎖ペプチダーゼ活性はエキソサイトーシスを阻害する。例えば、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 LaIiie et al., The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons, 11(9) Trends Microbiol. 431-437, (2003)を参照のこと。

【0019】

一般的に再標的化エンドペプチダーゼは外因性プロテアーゼ切断サイトで天然の2本鎖ループプロテアーゼ切断サイトを置換する。例えば、Dolly, J. O. et al., Activatable Clostridial Toxins(米国特許第7,419,676号)を参照のこと。この特許文献を本明細書中に参考として援用する。標的部分のサイズのために再標的化エンドペプチダーゼはその全般的な分子量が異なる

10

20

30

40

50

が、活性化プロセスおよび2本鎖分子を産生する外因性切断サイトでの切断への依存性はクロストリジウム毒素の場合と本質的に同じである。例えば、Steward, L. E. et al., *Activatable Clostridial Toxins* (米国特許出願公開第2009/0005313号); Steward, L. E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells* (米国特許出願公開第11/776,075号); Steward, L. E. et al., *Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity for Clostridial Toxin Target Cells* (米国特許出願公開第2008/0241881号)を参照のこと。これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0020】

本開示の態様は、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25に選択的に結合できる - SNAP-25抗体を産生する免疫反応誘導組成物を一部含む。本明細書で使用されるとき、用語「免疫反応誘導組成物」は動物に投与された場合、SNAP-25抗原に対する免疫反応を刺激するSNAP-25抗原を含む組成物を言い、それによりBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25に選択的に結合できる - SNAP-25抗体を産生する。用語「免疫反応」は免疫反応誘導組成物に対する動物の免疫システムの反応を言う。例示的な免疫反応は、CD8+CTLsの抗原-特異的な誘導を包含するCTL反応、T細胞増殖反応およびサイトカインの放出を包含するヘルパーT細胞、抗体産生反応などを包含するB細胞反応などの細胞、局所および全身での体液性免疫が挙げられるが、これらに限定されない。用語「免疫反応を誘導する」は免疫反応が影響を受け、つまり、刺激され、開始され、誘導された場合に免疫反応誘導組成物または免疫反応誘導組成物をコード化するポリヌクレオチドの投与を言う。

20

#### 【0021】

SNAP-25免疫反応誘導組成物は、SNAP-25抗原を含む。本明細書で使用されるとき、用語「抗原」は免疫反応を誘発する分子を言い、限定するものではなく、ペプチド、多糖、リポ蛋白質および糖脂質などの脂質の共役体を含む。本明細書で使用されるとき、用語「SNAP-25抗原」は免疫反応を誘発するBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有する抗原を言う。免疫反応誘導組成物に用いる「SNAP-25抗原」は実質的に固有な配列でありえるほどに大きくなければならず、従ってSNAP-25よりも抗原に対し交差反応性である抗体を産生する可能性は減少する。更に免疫反応誘導組成物に用いるSNAP-25抗原は、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25に対して免疫反応を実質的に誘発するのみで十分に小さくならず、従ってBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25をBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有しないSNAP-25から区別できる - SNAP-25抗体を産生する可能性は増加する。また、再現性に優れた選択的で高収率な単一のアミノ酸配列であり、かつ、高感度のアッセイのデザインを可能にする許容される結合活性で結合する - SNAP-25抗体を生成することが大いに望まれる。

30

40

#### 【0022】

SNAP-25に存在するBoNT/A切断サイトの周囲の配列はP<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>'として表示され、ここでP<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'は切断性部位を表す。再標的化エンドペプチダーゼにより切断され、得られた切断製品はP<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>配列を含む断片およびP<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>'を含む断片を含む。従って本明細書で使用されるとき、用語「BoNT/A切

50

断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 は自身のカルボキシ末端アミノ酸として P<sub>1</sub> 残基を有する S N A P - 2 5 を言う。例えば、ヒト S N A P - 2 5 (配列番号 5) の Q<sub>197</sub> - R<sub>198</sub> は B o N T / A 切断サイトの P<sub>1</sub> - P<sub>1</sub>' 切断性部位を表す。従って B o N T / A 切断部位の切断可能結合のカルボキシ末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 とは、グルタミンが切断性部位の Q<sub>197</sub> を表し、自身のカルボキシ末端アミノ酸にグルタミンを有する S N A P - 2 5 切断製品になる。別の例では、トルペド・マルモラタ S N A P - 2 5 (配列番号 16) の K<sub>204</sub> - H<sub>205</sub> は、B o N T / A 切断サイトの P<sub>1</sub> - P<sub>1</sub>' 切断性部位を表す。従って「B o N T / A 切断部位の切断可能結合のカルボキシ末端リシンを有する S N A P - 2 5」とは、リシンが切断性部位の K<sub>204</sub> を表し、自身のカルボキシ末端アミノ酸にリシンを有する S N A P - 2 5 切断製品である。

10

## 【 0 0 2 3 】

B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 抗原は、修飾が無い場合には免疫原性、非免疫原性または低免疫原性である S N A P - 2 5 抗原、ハプテンまたはその他の抗原性化合物の免疫原性を高めるように修飾することができる。本実施形態の一態様では、S N A P - 2 5 抗原の切断性部位はカルボキシ末端 P<sub>1</sub> 残基はカルボキシル化することができる。カルボキシル化は S N A P - 2 5 抗原の所望の免疫原性の特性を 2 点において高める。第 1 に、電荷を帯びたアミノ酸は免疫原性を高めるので、C O O - 基のカルボキシ末端残基への添加は S N A P - 2 5 抗原の全般的な免疫原性を高める。第 2 に、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基は切断により電荷状態にあるので、C O O - 基のカルボキシ末端残基への添加は本明細書に開示した S N A P - 2 5 抗体を選択的に結合するようにデザインする実際の抗原を優れて模倣する。

20

## 【 0 0 2 4 】

本実施形態の一態様では、S N A P - 2 5 抗原からのアミノ - 末端残基はキーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、オボアルブミン (O V A)、チログロブリン (T H Y)、ウシ血清アルブミン (B S A)、大豆トリプシン阻害因子 (S T I) または多重結合ペプチド (M A P) などのキャリア蛋白質に S N A P - 2 5 抗原を取付けるように備えられたアミノ酸の添加で修飾することができる。例えば、キャリア蛋白質 KLH に結合するため、システイン残基はアミノ末端に設置することができる。

30

## 【 0 0 2 5 】

従って、一実施形態では B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 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 のアミノ酸の長さである可能性がある。別の実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 抗原は、例えば、最大で 5、最大で 6、最大で 7、最大で 8、最大で 9、最大で 10、最大で 11、最大で 12、最大で 13、最大で 14、最大で 15、最大で 16、最大で 17、最大で 18、最大で 19、最大で 20、最大で 25 または最大で 30 のアミノ酸の長さである可能性がある。更に別の実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 抗原は 7 ~ 12 アミノ酸、10 ~ 15 アミノ酸または 13 ~ 18 アミノ酸である可能性がある。

40

## 【 0 0 2 6 】

別の実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号 33 を含む。本実施形態の態様では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号 32、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、または配列番号 39 を含む。また別の実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能

50

結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号 4 0 を含む。

【 0 0 2 7 】

更に別の実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号 4 1 を含む。本実施形態の態様では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、または配列番号 4 6 を含む。また別の実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号 4 7 を含む。

【 0 0 2 8 】

B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合できる - S N A P - 2 5 抗体を産生する免疫反応を誘発する全ての S N A P - 2 5 抗原は、S N A P - 2 5 抗原として有用であり得るように構成されたものである。従って配列番号 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 3 8、配列番号 3 9、列番号 4 1、列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、または配列番号 4 6 を含むアミノ酸配列変異体は、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合できる - S N A P - 2 5 抗体を産生する免疫反応を誘発するのに S N A P - 2 5 抗原として有用であり得る。従って、一実施形態では、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 3 8、配列番号 3 9、列番号 4 1、列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、または配列番号 4 6 を含む S N A P - 2 5 抗原に少なくとも 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 つのアミノ酸を置換、欠失または付加で S N A P - 2 5 抗原は置換えることができる。更に別の実施形態では、S N A P - 2 5 抗原は、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 3 8、配列番号 3 9、列番号 4 1、列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、または配列番号 4 6 を含む S N A P - 2 5 抗原と少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % のアミノ酸同一性を有することができる。

【 0 0 2 9 】

1 つ以上のキャリアは、キャリアに関連していない場合には免疫原性、非免疫原性または低免疫原性である S N A P - 2 5 抗原の免疫原性を高めるために S N A P - 2 5 抗原に結合し得ると考えられる。非限定的な例として、例えばキーホールリンペットヘモシアニン ( K L H )、オボアルブミン ( O V A )、チログロブリン ( T H Y )、ウシ血清アルブミン ( B S A )、大豆トリプシン阻害因子 ( S T I ) または多重結合ペプチド ( M A P ) が挙げられる。当該技術分野において公知であるように、非抗原性または低抗原性である抗原をキャリアにカップリングさせて抗原性にすることができる。抗原をキャリアにカップリングさせる種々のその他のキャリアと方法は当該技術分野において公知である。例えば、Harlow and Lane, supra, 1998a; Harlow and Lane, supra, 1998b; and David W. Waggone r, Jr. et al., Immunogenicity - enhancing carriers and compositions thereof and methods of using the same (米国特許出願公開第 20040057958 号) (Mar. 25, 2004) を参照のこと。さらに融合蛋白質としてエピートープを発現することでエピートープは生成できる。ポリペプチド融合を発現させる方法は、例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999) に記載されているように当業者には周知である。S N A P - 2 5 抗原のカルボキシ末端は B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でなければならないので、キャリアは S N A P - 2 5 抗原のアミノ末端に結合していなければならない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 0 】

1つ以上の屈曲性スペーサは屈曲性リンカーに関連していない場合には免疫原性、非免疫原性または低免疫原性であるS N A P - 2 5抗原の免疫原性を高めるためにS N A P - 2 5抗原に結合するように構成されたものである。屈曲性スペーサはS N A P - 2 5抗原の全般的なペプチド長を伸ばして柔軟性を増し、それにより免疫細胞に対するS N A P - 2 5抗原の適切な提示が促進される。非限定的な例として、S N A P - 2 5免疫反応誘導組成物は免疫細胞に対してS N A P - 2 5抗原をより良く提示するために1つ以上のタンデムの屈曲性スペーサに結合したS N A P - 2 5抗原を含むことができ、それにより免疫反応が促進される。

## 【 0 0 3 1 】

ペプチドを含む屈曲性スペーサは少なくとも1つのアミノ酸の長さであり、例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンまたはセリンなどの小さな側鎖R基を有する電荷を帯びていないアミノ酸を含む。従って一実施形態では、屈曲性スペーサは、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のアミノ酸の長さである可能性がある。別の実施形態では、屈曲性スペーサは、例えば、最大で1、最大で2、最大で3、最大で4、最大で5、最大で6、最大で7、最大で8、または最大で9、最大で10のアミノ酸の長さであってもよい。更に別の実施形態では、屈曲性スペーサは、例えば、1～3アミノ酸、2～4アミノ酸、3～5アミノ酸、4～6アミノ酸または5～7アミノ酸であってもよい。屈曲性スペーサの非限定的な例は、G G G、G G G G (配列番号57)およびG G G G S (配列番号58)などのG - スペーサ、またはA A A、A A A A (配列番号59)およびA A A A V (配列番号60)などのA - スペーサを含む。屈曲性スペーサは融合蛋白質としてS N A P - 2 5抗原にフレーム単位で連結する。

## 【 0 0 3 2 】

上述のように、屈曲性スペーサはS N A P - 2 5抗原のペプチドの全長を伸ばすように一部使用されている。例えば、5 - 10アミノ酸S N A P - 2 5抗原は3 - 5アミノ酸屈曲性スペーサをS N A P - 2 5抗原のアミノ末端に結合して伸ばした全長を有することができる。別の例として、5 - 10アミノ酸S N A P - 2 5抗原は4～6アミノ酸屈曲性スペーサをS N A P - 2 5抗原のアミノ末端に結合して伸ばした全長を有することができる。別の例として5 - 10アミノ酸S N A P - 2 5抗原は7～10アミノ酸屈曲性スペーサをS N A P - 2 5抗原のアミノ末端に結合して伸ばした全長を有することができる。別の例として7 - 12アミノ酸S N A P - 2 5抗原は1～3アミノ酸屈曲性スペーサをS N A P - 2 5抗原のアミノ末端に結合して伸ばした全長を有することができる。別の例として7 - 12アミノ酸S N A P - 2 5抗原は4～6アミノ酸屈曲性スペーサをS N A P - 2 5抗原のアミノ末端に結合して伸ばした全長を有することができる。屈曲性スペーサによって伸ばした長さで小さなサイズのS N A P - 2 5抗原を選択することができ、B o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するS N A P - 2 5に対して実質的にS N A P - 2 5抗原が免疫反応を誘発する可能性が高まり、従ってB o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するS N A P - 2 5を、B o N T / A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有しないS N A P - 2 5と

## 【 0 0 3 3 】

本明細書に開示したS N A P - 2 5免疫反応誘導組成物は、任意で本明細書に開示したS N A P - 2 5抗原および1つ以上のアジュバントを含んでもよいように構成されたものである。本明細書で使用されるときに、S N A P - 2 5免疫反応誘導組成物に関して使用されている場合には、用語「アジュバント」は、S N A P - 2 5抗原に対する免疫反応を高めるかまたは多様化させる物質または物質の混合物を言う。例えば、免疫反応を誘導するアジュバントは、免疫の数または防御免疫に必要な抗原の量を減らすのに役立つ。免疫反応誘導組成物内の免疫反応を誘導するアジュバントの使用は周知である。このアジュバントの主要な目的は免疫反応を高めることである。非限定的なアジュバントとしては、例

10

20

30

40

50

えば、リポソーム、油相、限定するものではなく、フロイント完全アジュバント（FCA）などのアジュバントのフロイントタイプ、フロイント不完全アジュバント、サポニンなどのサポゲニングリコシド、カーボポール、N アセチルムラミル L アラニル D イソグルタミン（一般的にはムラミルジペプチドまたは「MDP」と知られている）およびリポ多糖（LPS）などのを含む。一般的にはそのようなアジュバントは水相を有するエマルジョンの形態で使用されているか、より一般的には水に不溶の無機塩を含んでよい。例えば、この無機塩は水酸化アルミニウム、硫酸亜鉛、コロイド状水酸化鉄、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムを含んでもよい。水酸化アルミニウム（ $Al(OH)_3$ ）は一般に使用されるアジュバントである。現在、唯一のFDA承認アジュバントは抗原の沈殿により「デポー」抗原に使用されるアルミニウム塩（Alum）である。上述したアジュバントは例示する目的のみである。事実、免疫反応を誘導する必須の特性を満足させるアジュバントである限り、免疫反応を誘導するアジュバントは本明細書に開示した免疫反応誘導組成物中で使用されてもよい。

10

#### 【0034】

さらに本明細書で開示したキャリアはアジュバントとして作用することができる。特定のアジュバントの作製および使用方法はGupta et al. Vaccine, 11 : 993 - 306, 1993; Arnon, 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 (米国特許出願公開第20040057958号) (Mar. 25, 2004)に記載されている。追加のアジュバントは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)に記載されている化合物を含む。この概要の例はムラミルジペプチド（MDP）およびモンタニド720を含む。ポリイノシン、シトシン（Poly I:C）またはCpGモチーフを含むプラスミドDNAなどの分子は、さらに微粒子中に封入した抗原との組み合わせでアジュバントとして投与することができる。別の例では、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これらの組み合わせなどの細胞の細胞質内へ抗原性化合物のエントリーを促進する薬剤である。

20

30

#### 【0035】

従って、一実施形態では、SNAP - 25免疫反応誘導組成物はキャリアペプチドに結合したカルボキシル化カルボキシ末端グルタミンを有するSNAP - 25抗原を含む。本実施形態の態様では、カルボキシル化カルボキシ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38、または配列番号39を含む。本実施形態の別の態様では、SNAP - 25は配列番号40を含む。本実施形態の態様では、キャリアペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、オボアルブミン（OVA）、チログロブリン（THY）、ウシ血清アルブミン（BSA）、大豆トリプシン阻害因子（STI）または多重結合ペプチド（MAP）である。

40

#### 【0036】

別の実施形態では、SNAP - 25免疫反応誘導組成物はキャリアペプチドに結合したカルボキシル化カルボキシ末端リシンを有するSNAP - 25抗原を含む。本実施形態の態様では、カルボキシル化カルボキシ末端リシンを有するSNAP - 25抗原は配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、または配列番号46を含む。本実施形態の別の態様では、SNAP - 25抗原は配列番号47を含む。本実施

50

形態の態様では、キャリアペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、オボアルブミン（OVA）、チログロブリン（THY）、ウシ血清アルブミン（BSA）、大豆トリプシン阻害因子（STI）または多重結合ペプチド（MAP）である。

【0037】

更に別の実施形態では、SNAP-25免疫反応誘導組成物はSNAP-25抗原とキャリアペプチドとの間に屈曲性リンカーが介在し、1つ以上の屈曲性リンカーに結合したカルボキシル化C末端グルタミンを有するSNAP-25抗原およびキャリアペプチドを含む。本実施形態の態様では、カルボキシル化カルボキシ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38、または配列番号39を含む。別の実施形態では、SNAP-25抗原は配列番号46を含む。本実施形態の態様では、キャリアペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、オボアルブミン（OVA）、チログロブリン（THY）、ウシ血清アルブミン（BSA）、大豆トリプシン阻害因子（STI）または多重結合ペプチド（MAP）である。本実施形態の態様では、屈曲性リンカーはG-スパーサまたはA-スパーサである。

10

【0038】

更に別の実施形態では、SNAP-25免疫反応誘導組成物はSNAP-25抗原とキャリアペプチドとの間に屈曲性リンカーが介在し、屈曲性リンカーおよびキャリアペプチドに結合したカルボキシル化カルボキシ末端リシンを有するSNAP-25抗原を含む。本実施形態の態様では、カルボキシル化カルボキシ末端リシンを有するSNAP-25抗原は配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45または配列番号46を含む。本実施形態の別の態様では、SNAP-25抗原は配列番号47を含む。本実施形態の態様では、キャリアペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、オボアルブミン（OVA）、チログロブリン（THY）、ウシ血清アルブミン（BSA）、大豆トリプシン阻害因子（STI）または多重結合ペプチド（MAP）である。本実施形態の態様では、屈曲性リンカーはG-スパーサまたはA-スパーサである。

20

【0039】

本開示の態様は、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25に選択的に結合できる - SNAP-25抗体を産生する方法を一部含む。BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する - SNAP-25抗体は当該技術分野において周知である多種多様な方法で産生することができる。抗体の製造、使用、検出の特定のプロトコール、さらに抗体結合特異性、結合親和性および結合活性の測定は当該技術分野において周知である。例えば、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998a); and USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL NO. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001; and Current Protocols in Molecular Biology, 2004; David Anderson et al., Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use (米国特許第7,034,132号) (Apr. 25, 2005); および Beatriz M. Carreno et al., Antibodies Against CTLA4 (米国特許第7,034,121号) (Apr. 25, 2006)を参照のこと。

30

40

【0040】

非限定的な例として、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末

50

端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体は、例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の哺乳動物などに本明細書に開示した免疫反応誘導組成物の 1 回以上の注入をすることで産生できる。別の非限定的例として、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合できる - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体は、例えば、鶏卵などの卵に本明細書に開示した免疫反応誘導組成物の 1 回以上の注入により産生することができる。免疫化した動物の抗体価を固定された抗原または細胞をベースとした活性アッセイを用いた酵素免疫吸着測定法 ( E L I S A ) などの標準的な技法で経時的に監視することができる。所望により、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体におけるモノクローナル抗体は哺乳動物 ( 例えば、血液 ) から単離でき、I g G 画分を得るのにプロテイン A アフィニティークロマトグラフィまたは抗体の生成に使用するペプチドに対するアフィニティ精製などの周知の技術でさらに精製できる。

10

#### 【 0 0 4 1 】

別の非限定的な例は、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体はハイブリドーマ法を用いて産生することができる。例えば、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 ) を参照のこと。この方法においては、マウス、ハムスターまたは他の適切な宿主動物などの宿主動物は、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に特異的に結合する - S N A P - 2 5 抗体を産生するまたは産生することができるリンパ球を誘発させるために典型的には本明細書に開示した S N A P - 2 5 抗原を 1 回以上、注入投与される。免疫化した動物の抗体価を、固定された抗原または細胞をベースとした活性アッセイを用いた酵素免疫吸着測定法 ( E L I S A ) などの標準的な技法で経時的に監視することができる。または、リンパ球は、好適な培養細胞系を用いてインビトロで免疫化することができる。免疫後の適切な時点で、例えば、抗体価が最高値の時に抗体産生細胞を動物から単離する。一般的には、何れの末梢血リンパ球も、ヒト起源の細胞が所望される場合に使用され、また、脾臓細胞もしくはリンパ節細胞がヒト以外の哺乳動物である供給源が所望される場合に使用される。単離された抗体産生細胞は、その後、例えば、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を使用して不死化細胞株と融合されて、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であり、具体的には齧歯類、ウシおよびヒト起源の骨髄腫細胞である。典型的には、マウスの骨髄腫細胞株はハイブリドーマを産生するために適切に免疫化したマウスから採取した脾細胞と細胞融合を行う。好ましい不死化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 ( H A T ) を含む培地に感受性のあるマウス骨髄腫細胞株である。多くの骨髄腫細胞株は P 3 - N S 1 / 1 - A g 4 - 1、P 3 - x 6 3 - A g 8 . 6 5 3 または S p 2 / O - A g 1 4 骨髄腫細胞株などの標準的技術に従い融合パートナーとして使用することができる。次に、融合の結果によるハイブリドーマ細胞は非融合および非生産的融合骨髄腫細胞 ( 形質転換されないので非融合脾細胞は数日後に培養液中で死亡する ) を殺す H A T 培地を用いて選択される。次に、ハイブリドーマ細胞が成長する培地は B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の存在についてアッセイすることができる。例えば、免役沈降法、放射性イムノアッセイ ( R I A ) あるいは酵素免疫吸着測定法 ( E L I S A ) などのインビトロ結合アッセイまたは細胞をベースとした活性アッセイ等において - S N A P - 2 5 陽性培地を用いてハイブリドーマ上清をスクリーニングすることができる。このような技術および

20

30

40

50

アッセイは当該分野公知である。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を参照のこと。また抗体がBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有しないSNAP-25に対して無反応性であるかどうかを測定するさらなる研究が可能である。加えて、-SNAP-25モノクローナル抗体の結合親和性、例えば、Scatchard解析で測定することができる。例えば、Peter J. Munson and David Rodbard、Ligand: A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand-Binding Systems、107(1) Anal. Biochem. 220-239 (1980)を参照のこと。所望のハイブリドーマ細胞が同定された後は、所望のモノクローナル抗体を発現するクローン細胞株を得るまで1個の細胞から起因するクローンを単離するのに限界稀釈手順を使用する。BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25について十分に選択的で、かつ、十分に高い結合活性で結合する抗体を、さらなる特徴付けおよび試験に基づいて選択する。

10

## 【0042】

BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25に選択的に結合する-SNAP-25モノクローナル抗体を調製する別の代替法は、例えば、SNAP-25ペプチドを用いて抗体ファージディスプレイライブラリーなどの組み換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングして、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25を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の作製およびスクリーニングのためのキットは、例えば、Recombinant Phage Antibody System (Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ)およびSurfZAP(商標) Phage Display Kit (Stratagene, La Jolla, CA)から市販されている。さらに抗体ディスプレイライブラリーの作製およびスクリーニングの使用に有用な方法および試薬の例は、Ladner et al. (米国特許第5,223,409号)； Borrebaeck et al. (米国特許第5,712,089号)； Griffiths et al. (米国特許第5,885,793号)； Griffiths et al. (米国特許第5,962,255号)； McCafferty et al. (米国特許第5,969,108号)； Griffiths et al. (米国特許第6,010,884号)； Jespers et al. (米国特許第6,017,732号)； Borrebaeck et al. (米国特許第6,027,930号)； Johnson et al. (米国特許第6,140,471号)； McCafferty et al. (米国特許第6,172,197号)に見出すことができる。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

40

## 【0043】

本開示の態様は、-SNAP-25抗体または-SNAP-25抗体産生細胞を含む試料の回収を一部含む。本明細書で使用されるとき、用語「-SNAP-25抗体または-SNAP-25抗体産生細胞を含む試料」は、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する少なくとも1つの-SNAP-25抗体を含有しているまたは含有している可能性がある生体物質を言う。BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25抗体を含むことができる全ての試料をこの方法で使用することができ、試料には血液、血漿、血清およびリンパ液が含まれるが、これらには限定されないように構成されたものである。さらにB

50

o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体を産生することができる細胞をこの方法で使用することができ、細胞は C D 8 細胞、 C T L 細胞、ヘルパー T - 細胞および B - 細胞が含まれるが、これらには限定されないように構成されたものである。種々の周知の方法が - S N A P - 2 5 抗体または - S N A P - 2 5 抗体産生細胞を含有している個々の試料から回収するために使用することができる。例えば、Harlow & Lane、supra、1998a； and Harlow & Lane、supra、1998b を参照のこと。同様に B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体を単離するために試料の処理に種々の周知の方法を使用することができる。試料を回収する手順は単離する抗体のタイプに基づいて選択することができる。非限定的な例として、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合できる - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を単離する場合、適切な試料は - S N A P 抗体を含んだ血液試料であってもよく、一方、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を単離するとき、適切な試料は脾臓細胞またはハイブリドーマなどの - S N A P - 2 5 抗体産生細胞であってもよい。

10

## 【 0 0 4 4 】

本開示の態様は、試料から B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体を単離することを一部含む。B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体または B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体などの - S N A P - 2 5 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； and Harlow and Lane、supra、1998b を参照のこと。例えば、そのような - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体は主として免疫血清の I g G 画分を提供するプロテイン A またはプロテイン G を用いたアフィニティクロマトグラフィなどの周知の技術により試料から単離することができる。続いてまたは別法として、特定の S N A P - 2 5 抗原はカラムまたは磁気ビーズに固定化し、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を免疫アフィニティクロマトグラフィで精製することができる。B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体はプロテイン 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、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティクロマトグラフィなどの従来免疫グロブリン精製手順で培養培地あるいは腹水から単離することができる。

20

30

## 【 0 0 4 5 】

従って、一実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合できる - S N A P - 2 5 抗体を産生する方法は ( a ) キャリアペプチドに結合したカルボキシル化 C 末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 抗原を含む S N A P - 2 5 免疫反応誘導組成物を動物に投与する工程、( b ) 動物から - S N A P - 2 5 抗体または - S N A P - 2 5 抗体産生細胞を含む試料を回収する工程、および ( c ) 試料から - S N A P - 2 5 抗体成分を単離する工程、を含む。本実施形態の一態様では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合できる - S N A P - 2 5 抗体はポリクローナル抗体である。本実施形態の別の態様では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合できる - S N A P - 2 5 抗体はモノクローナル抗体である。本実施形態の更に態様では、産生された B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択

40

50

的に結合できる - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体は I g G サブタイプである。本実施形態の別の態様では、S N A P - 2 5 免疫反応誘導組成物は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 ) などのアジュバントをさらに含む。

【 0 0 4 6 】

別の実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合できる - S N A P - 2 5 抗体を産生する方法は ( a ) S N A P - 2 5 ペプチドとキャリアペプチドとの間に屈曲性リンカーが介在し、屈曲性リンカーおよびキャリアペプチドに結合したカルボキシル化 C 末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 ペプチドを含む S N A P - 2 5 免疫反応誘導組成物を動物に投与する工程、( b ) 動物から - S N A P - 2 5 抗体または - S N A P - 2 5 抗体産生細胞を含む試料を回収する工程、および ( c ) 試料から - S N A P - 2 5 抗体成分を単離する、工程を含む。本実施形態の一態様では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合できる - S N A P - 2 5 抗体はポリクローナル抗体である。本実施形態の別の態様では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合できる - S N A P - 2 5 抗体はモノクローナル抗体である。本実施形態の更に態様では、産生された B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合できる - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体は I g G サブタイプである。本実施形態の別の態様では、S N A P - 2 5 免疫反応誘導組成物は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 ) などのアジュバントをさらに含む。

【 0 0 4 7 】

本開示の態様は試料から B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する単離された - S N A P - 2 5 抗体を一部含む。本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は抗原に特異的に結合した特定の抗原に反応することで作り出された免疫システムにより生成される分子を言い、かつ、天然の抗体と天然には存在しない抗体の両方を含む。本明細書で使用されるとき、用語「単離された」はヒトの介入により自然の環境から分子を分離することを言う。例えば、断片が所望の生物活性およびその単一鎖誘導体を示す限り、抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二量体、多量体、多特異性抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、2 機能性抗体、I g 受容体などの細胞関連抗体、線形抗体、二重特異性抗体またはミニボディ等であることができる。抗体は V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメイン、さらに軽鎖定常ドメイン ( C<sub>L</sub> ) および重鎖定常ドメイン C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub> または F a b 断片、F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片、F c 断片、F d 断片、F v 断片などの完全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片を含む完全長免疫グロブリン分子であることができる。抗体は脊椎動物 ( ヒト、ヤギ、ウマ、ロバ、マウス、ラット、ウサギまたはニワトリ ) から誘導することができ、かつ、いかなるタイプ ( 例えば、I g G、I g E、I g M、I g D および I g A )、クラス ( 例えば、I g A、I g D、I g E、I g G および I g M ) またはサブクラス ( 例えば、I g G I、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 および I g A 2 ) であってもよい。天然の抗体、天然には存在しない抗体およびそれらの原性化合物結合断片の構造に関する一般的な開示については、例えば、P l u c k t h u n i n T h e P h a r m a c o l o g y o f M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s、v o l . 1 1 3、R o s e n b u r g a n d M o o r e e d s .、S p r i n g e r - V e r l a g、N e w Y o r k、p p . 2 6 9 - 3 1 5 ( 1 9 9 4 )；B o r r a b e c k、A n t i b o d y E n g i n e e r i n g、2 d e d . ( O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s 1 9 9 5 ) を参照のこと。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 4 8 】

通常、天然の抗体は 2 つの同一の軽 ( L ) 鎖と 2 つの同一の重 ( H ) 鎖から成る約 1 5

10

20

30

40

50

0,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖にリンクされ、一方ジスルフィドリンケージの数は異なる免疫グロブリンイソタイプの重鎖の間で変動する。さらにそれぞれの重鎖および軽鎖は一定の間隔の鎖内ジスルフィド結合を有している。個々の重鎖は一方の末端に可変ドメイン( $V_H$ )、これに続いて多数の定常ドメインを有している。個々の軽鎖は一方の末端に可変ドメイン( $V_L$ )を、その他方の末端に定常ドメインを有している。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1定常ドメインと整列しており、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの接触面を形成していると考えられている。

#### 【0049】

完全な抗原-認識および抗原-結合部位はFv断片である抗体の可変ドメイン内に含まれる。この断片は1つの重鎖可変ドメイン( $V_H$ )と1つの軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )とが硬く非共有的に会合している二量体を含む。各ドメインは $\beta$ -シート構造に結合するループを形成し、ある場合には構造の部分形成する三つの超可変領域によって結合された、主として $\beta$ -シート立体配置を採用する四つのフレームワーク領域(FR)を含む。各超可変領域は相補性決定領域(CDR)に対応するアミノ酸配列を含む。総称して、これは抗原結合特異性を付与する $V_H$ - $V_L$ 二重体の表面上の抗原-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、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)を参照のこと。上記のそれぞれは全内容が参照により本明細書に組み込まれる。抗体の定常領域は抗体の抗原への結合には直接関与しないが種々のエフェクター機能、例えば、抗体の抗体依存性細胞傷害作用への関与を示す。

#### 【0050】

標的抗原は一般的には、CDR形成抗原-結合部位によって認識される多数の結合部位(エピトープとも呼ばれる)を有する。本明細書で使用されるとき、「エピトープ」は「抗原性決定基」と同意語とみなし、かつ、免疫グロブリンまたはT-細胞受容体に特異結合することまたはさもなくば分子と相互作用することが可能なペプチド、多糖または脂質含有分子などの標的抗原上の部位を言う。異なるエピトープに特異的に結合するそれぞれの抗体は異なる構造を有する。従って1つの抗原は1つ以上の対応する抗体を有してもよい。

#### 【0051】

ポリクローナル抗体は、特定の抗原に結合が可能な少なくとも2種の抗体を含む抗体分子の不均一集団を言う。定義に従い、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とき、用語「モノクローナル抗体(単数)」または「モノクローナル抗体」は、微量に存在する自然に生じる突然変異を除いて集団を含む個々の抗体が同一であり、特定の抗原を結合できる1種類の抗体のみを含む抗体分子の実質的に均質な集団を言う。定義に従い、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、1つの抗原性部位に対して指向される。さらにポリクローナル抗体と対照的に各モノクローナル抗体は抗原上にある1つの決定基に対して指向される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体はそれらに他の抗体が混入しておらず、合成されてもよい点で有利である。修飾語「モノクローナル」は実質的に均質な抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生が必要であるとは解釈されない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体はKohler et al (1975) Nature 256:495によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作

10

20

30

40

50

成することができ、また、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号、米国特許第5,807,715号を参照）によって作成することもできる。さらにモノクローナル抗体は、例えば、Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597に記載されている技術を用いたファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。

【0052】

従って、一実施形態では、-SNAP-25抗体はBONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25に選択的に結合する重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)と軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)を含む。本実施形態の一態様では、重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)は配列番号72、配列番号74、配列番号76、配列番号80、配列番号82または配列番号133である。本実施形態の別の態様では、軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)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。

10

【0053】

別の実施形態では、核酸配列はBONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25に選択的に結合する重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)と軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)を含む-SNAP-25抗体をコードする。本実施形態の一態様では、重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)は核酸配列（配列番号71、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号79、配列番号81または配列番号132）によりコードされる。本実施形態の別の態様では、重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)は配列番号71、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号79、配列番号81または配列番号132と少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一または少なくとも99%同一である核酸配列によりコードされる。本実施形態の更に他の態様では、軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)は配列番号83、配列番号85、配列番号87、配列番号89、配列番号91によりコードされる。本実施形態の更に別の態様では、軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)は配列番号83、配列番号85、配列番号87、配列番号89、配列番号91または配列番号91と少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一または少なくとも99%同一である核酸配列によりコードされる。

20

30

【0054】

別の実施形態では、-SNAP-25抗体はBONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25に選択的に結合する重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)CDR1領域、CDR2領域、CDR3領域またはこれらの組み合わせを含む。本実施形態の一態様では、重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)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。本実施形態の別の態様では、重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)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。本実施形態の更に別の態様では、重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)CDR3領域は配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号124、配列番号134または配列番号135である。

40

【0055】

別の実施形態では、-SNAP-25抗体はBONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25に選択的に結合する重鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)CDR1領域、CDR2領域、CDR3領域またはこれらの組み合わせを含む。本実施形態の一態様では、軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)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

50

番号126、配列番号127、配列番号128または配列番号129である。本実施形態の別の態様では、軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)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。本実施形態の更にも他の態様では、軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)CDR3領域は配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号116または配列番号117である。

【0056】

更に別の実施形態では、-SNAP-25抗体はBONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25を含むエピトープに特異的に結合する。本実施形態の一態様では、エピトープは配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36または配列番号37を含む。本実施形態の一態様では、  
10  
エピトープは配列番号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を含む。

【0057】

上述のように、SNAP-25に存在するBONT/A切断サイトの周囲の配列はP<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>'として表示され、ここでP<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'は切断性部位を表す。BONT/Aにより切断され、得られた切断製品はP<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>配列を含む断片およびP<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>'を含む断片を含む。本明細書で使用されるとき、用語「BONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25に選択的に結合する  
20  
-SNAP-25抗体」は、P<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>配列を含むSNAP-25切断製品断片に選択的に結合する-SNAP-25抗体を言うが、しかし、P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>'-P<sub>4</sub>'-P<sub>5</sub>'配列を含むSNAP-25切断製品断片またはBONT/A切断部位の未改変P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'切断可能結合を有するSNAP-25を言わない。本明細書で使用されるとき、用語「-SNAP-25<sub>197</sub>抗体」は配列番号5のグルタミン197に対応するP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端P<sub>1</sub>残基を有するSNAP-25に選択的に結合する抗体を言う。本明細書で使用されるとき、用語「-SNAP-25<sub>204</sub>抗体」は配列番号16のリシン204に対応するP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端P<sub>1</sub>残基を有するSNAP-25に選択的に結合する抗体を言う。

【0058】

本明細書で使用されるとき、用語「選択的に」は特異な効果あるいは影響が有るまたは  
30  
唯一の方法あるいは唯一の物で反応を示すことを言う。本明細書で使用されるとき、用語「選択的に結合」または「選択的結合」が抗体を参照している場合には抗体が実質的に非標的エピトープと交差反応しないように抗体と所定の標的エピトープとの特殊な結合を言う。本明細書で使用されるとき、ペプチドエピトープの最小サイズは約5アミノ酸であり、典型的にはペプチドエピトープは少なくとも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10、少なくとも15または少なくとも20アミノ酸を含む。ペプチドエピトープは非連続性であってもよい、つまりペプチドの一次構造において隣接していないアミノ酸残基を含むが、しかしペプチドの二次、三次または四次構造でエピトープと一緒にまとめられている。さらに注目すべきはエピトープは糖残基、リポ  
40  
蛋白質または糖脂質などの脂質部分またはリン酸化されたアミノ酸などの化学修飾されたアミノ酸部分などであるアミノ酸配列以外の分子の一部を含んでもよいことである。本実施形態の態様では、BONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25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10、少なくとも15、または少なくとも20のアミノ酸を含むBONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープを選択的に結合する-SNAP-25抗体は最大で5、最大で6、最大で7、最大で8、最大で9、最大で10、最大で15、または最大で20のアミノ酸を含むBONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカル  
50

ボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープを選択的に結合することができる。

【 0 0 5 9 】

選択的結合は結合親和性、結合特異性および結合活性などの結合特性を含む。例えば、David J. King、Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies、pp. 240 (1998)を参照のこと。結合親和性は抗体がそのエピトープ結合部位に存在する時間の長さを言い、抗体がそのエピトープを結合する力であるとみなされる。結合親和性は平衡で  $K_d / K_a$  比と定義する非平衡解離定数 ( $K_D$ ) と記載される。ここで、 $K_a$  は抗体の会合速度定数であり、 $K_d$  は抗体の解離速度定数である。結合親和性は会合と解離の両方で決定するのであり、決して高い会合あるいは低い解離だけで高い親和性を確定するものではない。会合速度定数 ( $K_a$ )、あるいは正方向の速度定数 ( $K_{on}$ ) は単位ごとの結合事象の数または抗体 - 抗原複合体へ可逆的に会合しようとする抗体および抗原の性向を計測する。会合速度定数は  $M^{-1} s^{-1}$  の単位で、 $[Ab] \times [Ag] \times K_{on}$  と表される。会合速度定数が大きければ大きいほど抗体はその抗原により早く結合しまたは抗体と抗原の親和性がより高くなる。解離速度定数 ( $K_d$ ) または逆方向の速度定数 ( $K_{off}$ ) は単位ごとの解離事象の数または成分分子、つまり抗体と抗原へ可逆的に分離 (解離) しようとする抗体 - 抗原複合体の性向を計測する。解離速度定数は  $s^{-1}$  の単位で、 $[Ab + Ag] \times K_{off}$  と表される。解離速度定数が小さければ小さいほど抗体はその抗原に対してより強く結合しまたは抗体と抗原の親和性がより高くなる。平衡解離定数 ( $K_D$ ) は形成された新規の抗体 - 抗原複合体での速度が平衡で抗体 - 抗原複合体が解離する速度と等しい速度を計測する。平衡解離定数は  $M$  の単位で、 $K_{off} / K_{on} = [Ab] \times [Ag] / [Ab + Ag]$  と表される。ここで、 $[Ab]$  は抗体のモル濃度、 $[Ag]$  は抗原のモル濃度および  $[Ab + Ag]$  は抗体 - 抗原複合体のモル濃度であり、すべての濃度は系が平衡状態である時の成分である。平衡解離定数が小さければ小さいほど抗体はその抗原に対してより強く結合しまたは抗体と抗原の親和性がより高くなる。

【 0 0 6 0 】

従って、一実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の  $P_1$  残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープを選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体の結合親和性は、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であることができる。別の実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の  $P_1$  残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープを選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は、 $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$  超、 $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$  超、 $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  超または  $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$  以上の会合速度定数であることができる。別の態様では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の  $P_1$  残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープを選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は、 $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1} \sim 1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1} \sim 1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1} \sim 1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  または  $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1} \sim 1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  の会合速度定数であることができる。

【 0 0 6 1 】

別の実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の  $P_1$  残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープを選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体の結合親和性は、 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$  未満、 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$  または  $1 \times 10^{-5} s^{-1}$  未満の解離速度定数であることができる。本実施形態の別の態様では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の  $P_1$  残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープを選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は、 $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$  未満、 $2.0 \times 10^{-4} s^{-1}$  未満、 $3.0 \times 10^{-4} s^{-1}$  未満、 $4.0 \times 10^{-4} s^{-1}$  未満、 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$  未満、 $6.0 \times 10^{-4} s^{-1}$  未満、 $7.0 \times 10^{-4} s^{-1}$  未満、 $8.0 \times 10^{-4} s^{-1}$  または  $9.0 \times 10^{-4} s^{-1}$  未満の解離速度定数であることができる。別の実施形態では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の  $P_1$  残基でカルボキシ末端を有

するSNAP-25エピトープに選択的に結合する - SNAP-25抗体は、 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 超、 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 超または $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 超の解離速度定数であることができる。本実施形態の別の態様では、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する - SNAP-25抗体は、 $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}$ 超、 $2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 超、 $3.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 超、 $4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 超、 $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 超、 $6.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 超、 $7.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 超、 $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 超または $9.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 超の解離速度定数であることができる。

#### 【0062】

別の実施形態では、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する - SNAP-25抗体は、0.500 nM未満の平衡解離定数であることができる。本実施形態の態様では、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する - SNAP-25抗体は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、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であることができる。別の実施形態では、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する - SNAP-25抗体は、0.500 nM超の平衡解離定数であることができる。本実施形態の態様では、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する - SNAP-25抗体は、0.500 nM超、0.450 nM超、0.400 nM超、0.350 nM超、0.300 nM超、0.250 nM超、0.200 nM超、0.150 nM超、0.100 nM超または0.050 nM超の平衡解離定数であることができる。

#### 【0063】

更に別の実施形態では、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する - SNAP-25抗体の結合親和性は、未改変SNAP-25について $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満以下、 $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、または $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満の会合速度定数であることができる。別の実施形態では、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する - SNAP-25抗体の結合親和性は、未改変SNAP-25について最大で $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、最大で $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、最大で $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、最大で $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ または最大で $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の会合速度定数であることができる。

#### 【0064】

結合特異性はエピトープを含む分子とエピトープを含有しない分子を識別する抗体の能力である。結合特異性を測る1つの方法はエピトープを含有しない分子における抗体のKon会合速度とエピトープを含む分子における抗体のKon会合速度との比較である。例えば、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有しないSNAP-25エピトープまたはBoNT/A切断部位の未改変P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'切断可能結合を有するSNAP-25エピトープなどのエピトープを含有しないSNAP-25に比べて、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープにおける - SNAP-25抗体の会合速度定数(K<sub>a</sub>)を比較する。本実施形態の態様では、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する - SNAP-25抗体は $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満のエピトープを含有しないSNAP-25の会合速度定数(K<sub>a</sub>)を有する。本実施形態の別の態様では、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピト

10

20

30

40

50

ープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は最大で  $1 \times 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、最大で  $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、最大で  $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、最大で  $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  または最大で  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  のエピトープを含まない S N A P - 2 5 の会合速度定数 ( K a ) を有する。

【 0 0 6 5 】

本実施形態のさらに態様では、エピトープを含まない S N A P - 2 5 に比べて、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は、少なくとも 2 倍超、少なくとも 3 倍超、少なくとも 4 倍超、少なくとも 5 倍超、少なくとも 6 倍超、少なくとも 7 倍超、少なくとも 8 倍超、または少なくとも 9 倍超のエピトープの会合速度定数 ( K a ) を有する。本実施形態の更に態様では、エピトープを含まない S N A P - 2 5 に比べて B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は、少なくとも 10 倍超、少なくとも 100 倍超、少なくとも 1,000 倍超、または少なくとも 10,000 倍超のエピトープの会合速度定数 ( K a ) を有する。本実施形態の更に別の態様では、エピトープを含まない S N A P - 2 5 に比べて B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は、最大で 1 倍超、最大で 2 倍超、最大で 3 倍超、最大で 4 倍超、最大で 5 倍超、最大で 6 倍超、最大で 7 倍超、最大で 8 倍超または最大で 9 倍超のエピトープの会合速度定数 ( K a ) を有する。本実施形態の更に別の態様では、エピトープを含まない S N A P - 2 5 に比べて B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は、最大で 10 倍超、最大で 100 倍超、最大で 1,000 倍超または最大で 10,000 倍超のエピトープの会合速度定数 ( K a ) を有する。

【 0 0 6 6 】

また、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体の結合特異性は、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有しない S N A P - 2 5 エピトープまたは B o N T / A 切断部位の未改変 P<sub>1</sub> - P<sub>1</sub>' 切断可能結合を有する S N A P - 2 5 エピトープなどのエピトープを含まない S N A P - 2 5 に比べて S N A P - 2 5 エピトープを識別できるような - S N A P - 2 5 抗体の比率であることにその特徴がある。本実施形態の態様では、エピトープを含まない S N A P - 2 5 に比べて B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は少なくとも 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 である S N A P - 2 5 エピトープの結合特異性比率を有する。本実施形態の更に別の態様では、B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有しない S N A P - 2 5 と比べて B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は少なくとも 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 である S N A P - 2 5 エピトープの結合特異性比率を有する。本実施形態の更に別の態様では、B o N T / A 切断部位の未改変 P<sub>1</sub> - P<sub>1</sub>' 切断可能結合を有する S N A P - 2 5 と比べて B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は少なくとも 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

10

20

30

40

50

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 である S N A P - 2 5 エピトープの結合特異性比率を有する。

【 0 0 6 7 】

機能性アフィニティとしても知られている結合活性は多価抗体およびその抗原の間の機能性結合力の合計を言う。抗体分子は 1 つ以上の結合部位（例えば、I g G では 2、I g M では 10）を有することができ、かつ、多くの抗原は 1 つ以上の抗原性部位を含む。抗体の結合活性は個々の抗体結合部位の結合親和性に依存する一方で、抗体が完全に解離するには抗体 - 抗原相互作用のすべてが崩壊しなければならないので結合活性は結合親和性よりも大きい。B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は、抗体のすべてのエピトープに選択的に結合することができるように構成されたものである。

10

【 0 0 6 8 】

従って、一実施形態では、- S N A P - 2 5 抗体は B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体である。本実施形態の態様では、- S N A P - 2 5 抗体はカルボキシ末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 と選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体またはカルボキシ末端アミノ酸にリシンを有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体である。本実施形態の別の態様では、- S N A P - 2 5 抗体は、配列番号 5 のグルタミン 197 に対応する P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端 P<sub>1</sub> 残基を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体または配列番号 16 のリシン 204 に対応する P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端 P<sub>1</sub> 残基を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体である。本実施形態の更に別の態様では、- 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 38、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、または配列番号 46 のカルボキシ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 - S N A P - 2 5 抗体である。

20

【 0 0 6 9 】

本開示の態様は再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する免疫を利用した方法を一部含む。本明細書に開示した免疫を利用した方法を精密度、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、耐久性およびシステム適合性を含めた数種類のパラメータで評価することができる。方法の精密度は分析法の厳密さの測定または測定値と取り決めによる真の値あるいは認定基準値として受け入れられる値との間の一致の近似性である。方法の精度は手順を均一の試料から多数回採取に反復適用した場合の、個々の試験結果の間の一貫の程度である。従って、精度は、1）アッセイ内変動、2）日内変動（併行精度）および 3）日間変動（室内再現精度）および 4）室間再現精度（再現性）を評価する。変動係数（C V %）は観測または理論的な平均値に対して表した精度の量的測定である。

30

【 0 0 7 0 】

本明細書に開示した免疫を利用した方法はバックグラウンドを超えて B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 を含む - S N A P - 2 5 抗体 - 抗原複合体の存在を検出できなければならない。方法における検出限界（L O D）とは陰性対照またはブランクからは有意に違いがあるシグナルを出す分析対象物の濃度を言い、かつ、バックグラウンドから識別することができる分析対象物の最低濃度を表す。

40

【 0 0 7 1 】

従って、一実施形態では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は陰性対照またはブランクからは有意に違いがある量で再標的化エンドペプチダーゼの L O D を検出できる。本実施形態の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は 10 n g 以下、9 n g

50

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 以下の再標的化エンドペプチダーゼのLODを有する。本実施形態の更に別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は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 以下の再標的化エンドペプチダーゼのLODを有する。本実施形態の更に別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は、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 以下の再標的化エンドペプチダーゼのLODを有する。本実施形態の別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は、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 以下の再標的化エンドペプチダーゼのLODを有する。本実施形態の更に別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は、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 以下の再標的化エンドペプチダーゼのLODを有する。

#### 【0072】

本実施形態の別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は、100 nM 以下、90 nM 以下、80 nM 以下、70 nM 以下、60 nM 以下、50 nM 以下、40 nM 以下、30 nM 以下、20 nM 以下、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 以下の再標的化エンドペプチダーゼのLODを有する。本実施形態の別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は、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 以下の再標的化エンドペプチダーゼのLODを有する。本実施形態の別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は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 以下の再標的化エンドペプチダーゼのLODを有する。本実施形態の更に別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は10 pM 以下の再標的化エンドペプチダーゼ、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 以下の再標的化エンドペプチダーゼのLODを有する。

#### 【0073】

定量限界 (LOQ) とは許容可能な精密度および精度で測定することができる試料および標本中の分析対象物の最低濃度と最高濃度である。定量の下限とは検出法がバックグラウンドから一貫して計測できる最小限の用量を言う。定量の上限とはシグナル飽和が起こる前に検出法が一貫して計測できる最大限の用量である。この方法の線形範囲とは定量の下限と上限の間の面積である。線形範囲は定量の上限から定量の下限を差し引いて計算できる。本明細書で使用されるとき、用語「下漸近線におけるシグナル対ノイズ比」とは検出の下限をバックグラウンドシグナルで分割する方法で検出されたシグナルを言う。本明細書で使用されるとき、用語「上漸近線におけるシグナル対ノイズ比」とは検出の上限をバックグラウンドシグナルで分割する方法で検出されたシグナルを言う。

#### 【0074】

従って、一実施形態では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は陰性対照またはブランクからは有意に違いがある量で再標的化エンドペプチダーゼのLOQを検出できる。本実施形態の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は、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 以下の再標的化エンドペプチダーゼのLOQを有する。本実施形態の更に別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は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 以下の再標的化エンドペプチダーゼのLOQを有する。本実施形態の更に別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は90 pg 以下

10

20

30

40

50

、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以下の再標的化エンドペプチダーゼのLOQを有する。本実施形態の別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は、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以下の再標的化エンドペプチダーゼのLOQを有する。本実施形態の更に別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は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、0.1 pg以下の再標的化エンドペプチダーゼのLOQを有する。

【0075】

本実施形態の別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は、100 nM以下、90 nM以下、80 nM以下、70 nM以下、60 nM以下、50 nM以下、40 nM以下、30 nM以下、20 nM以下、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以下の再標的化エンドペプチダーゼのLOQを有する。本実施形態の別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は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以下の再標的化エンドペプチダーゼのLOQを有する。本実施形態の別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は、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以下の再標的化エンドペプチダーゼのLOQを有する。本実施形態の更に別の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は、10 pM以下の再標的化エンドペプチダーゼ、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以下の再標的化エンドペプチダーゼのLOQを有する。

【0076】

開示した方法の実践面に有効な免疫を利用した方法は50%以下の精度を有しなければならない。本実施形態の態様では、免疫を利用した方法は、50%以下、40%以下、30%以下または20%以下の精度を有する。本実施形態の別の態様では、免疫を利用した方法は、15%以下、10%以下、5%以下の精度を有する。本実施形態の別の態様では、免疫を利用した方法は、4%以下、3%以下、2%以下、または1%以下の精度を有する。

【0077】

開示した方法の実践面に有効な免疫を利用した方法は、少なくとも50%未満の精密度を有しなければならない。本実施形態の態様では、免疫を利用した方法は、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%の精密度を有する。本実施形態の別の態様では、免疫を利用した方法は、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の精密度を有する。本実施形態の別の態様では、免疫を利用した方法は少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の精密度を有する。

【0078】

本明細書に開示した免疫を利用した方法は統計的に有意な下漸近線におけるシグナル対ノイズ比および統計的に有意な上漸近線におけるシグナル対ノイズ比を有しなければならない。本実施形態の態様では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は少なくとも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の下漸近線におけるシグナル対ノイズ比を有する。本実施形態の別の態様では、免疫を利用した方法は少なくとも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、少なくとも100:1、少なくとも1

10

20

30

40

50

50 : 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の上漸近線におけるシグナル対ノイズ比を有する。

【0079】

方法の特異性とは、部分的に活性または不活性分析対象物などの関連のあるその他の成分を排除して目的的分析対象物を計測する方法の能力である。方法の選択性は、試料中の種々の物質を区別する分析的方法の能力を表す記載。方法の直線性は試料中の分析対象物の濃度に比例して直接的または良好に規定された数学的な変換によって結果を引き出す能力である。従って一実施形態では、本明細書に開示した免疫を利用した方法は完全に活性な再標的化エンドペプチダーゼの70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下または10%以下の活性を有する部分的に活性な再標的化エンドペプチダーゼから完全に活性な再標的化エンドペプチダーゼを識別できる。

10

【0080】

方法の耐久性は通常の(しかし可変的)試験状態下で同一の試料について得た試験結果の再現性である。方法の頑健性とは分析法の条件を小さい範囲で故意に変動させたときに測定値が影響を受けにくい能力のことであり、通常の作業状態における分析法の信頼性の指標となる。従って耐久性は避けえない変化を評価するが頑健性は意図的な変化を評価する。耐久性と頑健性で評価する典型的なパラメータは凍結/融解、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、試料保管、細胞継代数、再標的化エンドペプチダーゼのロット、精製間の差およびニッキング反応間の差を含む。細胞ベースのアッセイの頑健性パラメータは細胞バンク(凍結の開始、中間および終了)、細胞継代レベル、細胞播種濃度、細胞株濃度(培養中の日数)、フラスコ内の細胞年齢(播種までの待ち時間)、インキュベーション時間、異なるプレート、過量の血清および試薬源を含む。方法のシステム適合性は経時的に標準物質または標準分子での分析による試薬および装置の性能を含んだアッセイ性能の決定である。FDAのガイドラインは装置、エレクトロニクス、アッセイ性能および分析する試料が集積システムを構成するという事実言及してシステム適合性を強調している。システム適合性はログ投与量に対する反応をプロットすることで平行度テストにより評価することができ、標準の連続希釈および試料の連続希釈が平衡曲線を生じさせる。

20

30

【0081】

本開示の態様は樹立した細胞株由来の細胞を一部含む。本明細書で使用されるとき、用語「細胞」は、再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である任意の真核細胞または再標的化エンドペプチダーゼを取り込み得る任意の真核細胞を言う。細胞という用語はさまざまな生物由来、例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ウマ、霊長類、ヒトの細胞などの細胞を含む。それらはさまざまな細胞型、例えば、神経細胞型および非神経細胞型由来で、異種細胞集団、組織または臓器からまたはその一部から分離できるものである。本明細書で使用されるとき、用語「樹立された細胞株」は、「死化細胞株」または「形質転換細胞株」と同意語とみなし、かつ、組織、細胞または臓器由来の細胞集団からの不明確な増殖における選択された細胞の細胞培養を言う。定義に従い、樹立された細胞株は一次細胞の細胞培養を除く。本明細書で使用されるとき、用語「一次細胞」は、新鮮組織または臓器から直接収集した細胞であり不確定に増殖する可能性を持たない。樹立された細胞株は細胞の異種集団または細胞の均一集団を含むことができる。単細胞由来の樹立された細胞株はクローン細胞株と言う。樹立された細胞株は、再標的化エンドペプチダーゼがSNAP-25基質の蛋白質分解を起こし再標的化エンドペプチダーゼのその受容体への結合、エンドペプチダーゼ/受容体複合体のエンドペプチダーゼ、細胞内小胞から細胞質内へ再標的化エンドペプチダーゼ軽鎖の転座ならびにSNAP-25のタンパク質分解的切断を含む全般的な細胞機構を行う細胞に必要な全ての成分を内因的に発現する細胞であってもよい。あるいは、樹立された細胞株は再標的化エンドペプチダーゼがSNAP-25基質およびエキソサイトーシスの蛋白質分解を起こし再標

40

50

的化エンドペプチダーゼのその受容体への結合、エンドペプチダーゼ/受容体複合体の内在化、細胞内小胞から細胞質内へ軽鎖の転座ならびにS N A P - 2 5のタンパク質分解的切断を含む全般的な細胞機構を行う細胞に必要な少なくとも1つの成分の外因性源から導入された細胞であってもよい。また、遺伝子改変細胞株においてそのような樹立された細胞株由来の細胞は、例えば、外因性O R L 1、外因性D O R、外因性K O R、外因性M O R、外因性ガラニン受容体1、外因性ガラニン受容体2、外因性ガラニン受容体3またはこれらの組み合わせを発現してもよい。

#### 【0082】

本開示の態様は、再標的化エンドペプチダーゼに感受性である樹立した細胞株由来の細胞を一部含む。本明細書で使用されるとき、用語「再標的化エンドペプチダーゼに感受性である細胞」、「再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である細胞」または「再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞」は、再標的化エンドペプチダーゼがS N A P - 2 5基質の蛋白質分解を起こし全般的な細胞機構を行うことができる細胞を言い、それによりエキソサイトーシスを阻害し再標的化エンドペプチダーゼのその受容体への結合、エンドペプチダーゼ/受容体複合体のエンドペプチダーゼ、細胞内小胞から細胞質内へ再標的化エンドペプチダーゼ軽鎖の転座ならびにS N A P - 2 5のタンパク質分解的切断を含む。定義に従い、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である細胞は少なくとも1つの再標的化エンドペプチダーゼ受容体および少なくとも1つのS N A P - 2 5基質を発現するか発現するように改変されなければならない。本明細書で使用されるとき、用語「再標的化エンドペプチダーゼを取り込む細胞」または「再標的化エンドペプチダーゼを取り込むことができる樹立した細胞株を含む細胞」は、再標的化エンドペプチダーゼがS N A P - 2 5基質の蛋白質分解を起こし全般的な細胞機構を行うことができる細胞を言い、それによりエキソサイトーシスを阻害し再標的化エンドペプチダーゼのその受容体への結合、エンドペプチダーゼ/受容体複合体のエンドペプチダーゼ、細胞内小胞から細胞質内へ再標的化エンドペプチダーゼ軽鎖の転座ならびにS N A P - 2 5のタンパク質分解的切断を含む。定義に従い、再標的化エンドペプチダーゼを取り込むことができる細胞は少なくとも1つの再標的化エンドペプチダーゼ受容体および少なくとも1つのS N A P - 2 5基質を発現するか発現するように改変されなければならない。

#### 【0083】

従って、一実施形態では、樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である。本実施形態の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は、約100 nM以下、約90 nM以下、約80 nM以下、約70 nM以下、約60 nM以下、約50 nM以下、約40 nM以下、約30 nM以下、約20 nM以下、約10 nM以下の再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である。別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は約9 nM以下、約8 nM以下、約7 nM以下、約6 nM以下、約5 nM以下、約4 nM以下、約3 nM以下、約2 nM以下、約1 nM以下の再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である。さらに別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は約0.9 nM以下、約0.8 nM以下、約0.7 nM以下、約0.6 nM以下、約0.5 nM以下、約0.4 nM以下、約0.3 nM以下、約0.2 nM以下、約0.1 nM以下の再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である。本明細書で使用されるとき、用語「約」は、記載された事項、数、パーセンテージまたは用語の値が特定された場合には記載された事項、数、パーセンテージまたは用語の値のプラスまたはマイナス10パーセントの範囲を言う。

#### 【0084】

別の実施形態では、樹立したクローン細胞株を含む細胞は再標的化エンドペプチダーゼを取込みできる。本実施形態の態様では、樹立したクローン細胞株を含む細胞は約100 nM以下、90 nM以下、約80 nM以下、約70 nM以下、約60 nM以下、約50 nM以下、約40 nM以下、約30 nM以下、約20 nM以下、約10 nMまたは以下の再

10

20

30

40

50

標的化エンドペプチダーゼを取込みできる。別の態様では、樹立したクローン細胞株を含む細胞は約 9 nM 以下、約 8 nM 以下、約 7 nM 以下、約 6 nM 以下、約 5 nM 以下、約 4 nM 以下、約 3 nM 以下、約 2 nM 以下、約 1 nM または以下の再標的化エンドペプチダーゼを取り込む能力を有する。さらに別の態様では、樹立したクローン細胞株を含む細胞は約 0.9 nM 以下、約 0.8 nM 以下、約 0.7 nM 以下、約 0.6 nM 以下、約 0.5 nM 以下、約 0.4 nM 以下、約 0.3 nM 以下、約 0.2 nM 以下、約 0.1 nM 以下の再標的化エンドペプチダーゼを取り込む能力を有する。

#### 【 0 0 8 5 】

本開示の態様は本明細書で開示した再標的化エンドペプチダーゼについて選択的結合を示す樹立した細胞株由来の細胞を一部含む。本明細書で使用されるとき、用語「選択的に結合」または「選択的結合」が再標的化エンドペプチダーゼを参照している場合には再標的化エンドペプチダーゼが実質的に非標的エピトープと交差反応しないような、再標的化エンドペプチダーゼと所定の標的エピトープとの特殊な結合を言う。再標的化エンドペプチダーゼについて樹立した細胞株由来の細胞が選択的に結合する程度は、これらの細胞が再標的化エンドペプチダーゼの標的ドメインを有しない分子について非選択的な取込を示す範囲から測定することができる。再標的化エンドペプチダーゼの標的ドメインを有しない分子について非選択的な取込を評価する 1 つの方法は L H<sub>N</sub> 断片の非選択的な取込を計測する方法である。L H<sub>N</sub> 断片はクロストリジウム毒素転座ドメインおよびクロストリジウム毒素酵素ドメインを含むが標的ドメインを有しない。L H<sub>N</sub> 断片の非限定的例は L H<sub>N</sub> / A 断片、L H<sub>N</sub> / B 断片、L H<sub>N</sub> / C 断片、L H<sub>N</sub> / D 断片、L H<sub>N</sub> / E 断片、L H<sub>N</sub> / F 断片および L H<sub>N</sub> / G 断片を含む。L H<sub>N</sub> / A 断片の例はポリヌクレオチド分子配列番号 1 4 7 によりコードされる配列番号 1 4 6 である。

#### 【 0 0 8 6 】

従って、一実施形態では、樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼについて選択的結合を示す。本実施形態の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は少なくとも 75 % のアッセイをした総合活性、少なくとも 80 % のアッセイをした総合活性、少なくとも 85 % のアッセイをした総合活性、少なくとも 90 % のアッセイをした総合活性または少なくとも 95 % のアッセイをした総合活性を表す再標的化エンドペプチダーゼについて選択的結合を示す。本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は約 75 % から 100 % のアッセイをした総合活性、約 80 % から約 100 % のアッセイをした総合活性、約 85 % から約 100 % をした総合活性、約 90 % から約 100 % をした総合活性を表す再標的化エンドペプチダーゼについて選択的結合を示す。

#### 【 0 0 8 7 】

別の実施形態では、樹立した細胞株由来の細胞は最小 L H<sub>N</sub> 断片の非選択的な取込を示す。本実施形態の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は最大で 25 % の計測された総合取込、最大で 20 % の計測された総合取込、最大で 15 % の計測された総合取込、最大で 10 % の計測された総合取込または最大で 5 % の計測された総合取込である L H<sub>N</sub> 断片の非選択的な取込を示す。本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は約 0 % から約 25 % の計測された総合取込、約 0 % から約 20 % の計測された総合取込、約 0 % から約 15 % の計測された総合取込、約 0 % から約 10 % の計測された総合取込または約 0 % から約 5 % の計測された総合取込である L H<sub>N</sub> 断片の非選択的な取込を示す。

#### 【 0 0 8 8 】

更に別の実施形態では、樹立した細胞株由来の細胞は最小 L H<sub>N</sub> / A 断片の非選択的な取込を示す。本実施形態の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は最大で 25 % の計測された総合取込、最大で 20 % の計測された総合取込、最大で 15 % の計測された総合取込、最大で 10 % の計測された総合取込または最大で 5 % の計測された総合取込である L H<sub>N</sub> / A 断片の非選択的な取込を示す。本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は約 0 % ~ 約 25 % の計測された総合取込、約 0 % ~ 約 20 % の計測された総合取込、約 0 % ~ 約 15 % の計測された総合取込、約 0 % ~ 約 10 % の計測された総合取込または約 0 % から約 5 % の計測された総合取込である L H<sub>N</sub> / A 断片の非選択的な取込を示す

10

20

30

40

50

## 【0089】

本開示の態様は感度がよく、かつ、選択的な結合を付与する原形質膜上の十分な数の受容体結合部位を示す樹立した細胞株由来の細胞を一部含む。平衡飽和結合アッセイは種々の濃度でのリガンドの総および非特異的結合を測定する。リガンドの平衡解離定数 ( $K_d$ ) および最大数の受容体結合部位  $B_{max}$  は非線形回帰分析を用いて特異的結合から計算できる。特異的結合はリガンドの非特異的結合を観測された総結合から差し引いて計算できる。 $K_d$  は最大半量結合に到達するのに必要とされるリガンドの濃度であり、かつ、モル濃度で計測される。 $B_{max}$  は原形質膜上の結合部位の最大数であり、 $pmol/mg$ 、 $pmol/cell$ 、 $fmol/cell$ 、あるいは  $sites/cell$  の単位で計測される。

10

## 【0090】

従って、一実施形態では、樹立した細胞株由来の細胞は感度の良く、かつ、選択的な結合を付与する原形質膜上の十分な数の受容体結合部位を示す。本実施形態の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼの標的リガンドについて少なくとも  $0.1 fmol/cell$ 、少なくとも  $0.2 fmol/cell$ 、少なくとも  $0.3 fmol/cell$ 、少なくとも  $0.4 fmol/cell$ 、少なくとも  $0.5 fmol/cell$ 、少なくとも  $0.6 fmol/cell$ 、少なくとも  $0.7 fmol/cell$ 、少なくとも  $0.8 fmol/cell$ 、少なくとも  $0.9 fmol/cell$  または少なくとも  $1.0 fmol/cell$  の  $B_{max}$  値を示す。本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼの標的リガンドについて少なくとも  $1 fmol/cell$ 、少なくとも  $2 fmol/cell$ 、少なくとも  $3 fmol/cell$ 、少なくとも  $4 fmol/cell$ 、少なくとも  $5 fmol/cell$ 、少なくとも  $6 fmol/cell$ 、少なくとも  $7 fmol/cell$ 、少なくとも  $8 fmol/cell$ 、少なくとも  $9 fmol/cell$  または少なくとも  $10 fmol/cell$  の  $B_{max}$  値を示す。

20

## 【0091】

本開示の態様は、クローン細胞株を得た親細胞株由来の細胞よりもより安定している再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立したクローン細胞株由来の細胞を一部含む。ここで、用語「安定している」は、同じアッセイ条件および同じ再標的化エンドペプチダーゼが両方のアッセイで使用される場合、同一または類似の継代数のクローン細胞株を得た親細胞株由来の細胞により示される相対的な  $EC_{50}$ 、感度、有効性、明確に定義された上漸近線および/または明確に定義された用量応答曲線の値と類似する再標的化エンドペプチダーゼ活性の  $EC_{50}$ 、感度、有効性、明確に定義された上漸近線および/または明確に定義された用量応答曲線を示す特定の継代数における樹立したクローン細胞株由来の細胞を言う。

30

## 【0092】

従って、一実施形態では、樹立したクローン細胞株由来の細胞はクローン細胞株が由来した親細胞株と比較してより安定している。本実施形態の一態様では、樹立したクローン細胞株由来の細胞は親 SK-N-DZ 細胞株と比べてより安定している。本実施形態の別の態様では、樹立したクローン細胞株由来の細胞は親 SK-N-DZ 細胞株 ATCC CRL-2149 と比べてより安定している。本実施形態の別の態様では、樹立したクローン細胞株由来の細胞はクローン細胞株が由来した親細胞株と比較して例えば、少なくとも 5 超の継体、少なくとも 10 超の継体、少なくとも 15 超の継体、少なくとも 20 超の継体、少なくとも 25 超の継体、または少なくとも 30 超の継体についてより安定している。本実施形態の更に別の態様では、樹立したクローン細胞株由来の細胞はクローン細胞株が由来した親細胞株と比較して例えば、少なくとも 5 超の継体、少なくとも 10 超の継体、少なくとも 15 超の継体、少なくとも 20 超の継体、少なくとも 25 超の継体、または少なくとも 30 超の継体についてより安定している。

40

## 【0093】

50

本開示の態様は複数の細胞継代で安定している再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立したクローン細胞株由来の細胞を一部含む。ここで、用語「安定している」とは同じアッセイ条件および同じ再標的化エンドペプチダーゼが両方のアッセイで利用される場合、同じ樹立したクローン細胞株の先行する継代数の細胞に由来する細胞により示される相対的な $EC_{50}$ 、感度、有効性、明確に定義された上漸近線および/または明確に定義された用量応答曲線の値と類似する再標的化エンドペプチダーゼ活性の $EC_{50}$ 、感度、有効性、明確に定義された上漸近線および/または明確に定義された用量応答曲線を示す特定の継代数における樹立したクローン細胞株由来の細胞を言う。

【0094】

本明細書に開示した樹立した細胞株由来の細胞は複数の細胞継体での再標的化エンドペプチダーゼ活性における一貫した感度を示すことができる。本明細書で使用されるとき、用語「再標的化エンドペプチダーゼ活性に対する感度」は、無投与対照またはバックグラウンドシグナルにより検出されるシグナルを超えたアッセイが測定できる最低投与量を言う。

【0095】

従って、一実施形態では、樹立したクローン細胞株由来の細胞はどのような継体であれ標的化エンドペプチダーゼの100 nM以下、約80 nM以下、約70 nM以下、約60 nM以下、約50 nM以下、約40 nM以下、約30 nM以下、約20 nM以下、約10 nM以下、約1 nM以下、約0.9 nM以下、約0.8 nM以下、約0.7 nM以下、約0.6 nM以下、約0.5 nM以下、約0.4 nM以下、約0.3 nM以下、約0.2 nM以下または約0.1 nM以下での再標的化エンドペプチダーゼ活性における感度を示す。本実施形態の態様では、樹立したクローン細胞株由来の細胞はどのような継体であれ再標的化エンドペプチダーゼの約0.01 nM~約100 nM、約0.01 nM~約75 nM、約0.01 nM~約50 nM、約0.01 nM~約25 nM、約0.01 nM~約20 nM、約0.01 nM~約15 nM、約0.01 nM~約10 nM、約0.01 nM~約5 nM、約0.001 nM~約100 nM、約0.001 nM~約75 nM、約0.001 nM~約50 nM、約0.001 nM~約25 nM、約0.001 nM~約20 nM、約0.001 nM~約15 nM、約0.001 nM~約10 nM、または約0.001 nM~約5 nMの再標的化エンドペプチダーゼ活性における感度を示す。

【0096】

別の実施形態では、樹立したクローン細胞株由来の細胞は、5以上の細胞継体、10以上の細胞継体、15以上の細胞継体、20以上の細胞継体、25以上の細胞継体、30以上の細胞継体、35以上の細胞継体、40以上の細胞継体、45以上の細胞継体または50以上の細胞継体について約100 nM以下、約75 nM以下、約50 nM以下、約25 nM以下、約20 nM以下、約15 nM以下、約10 nM以下または約1 nM以下の再標的化エンドペプチダーゼ活性における感度を示す。本実施形態の別の態様では、樹立したクローン細胞株由来の細胞は、約15~約60の継体、約20~約60の継体、約25~約60の継体、約30~約60の継体、約35~約60の継体、約40~約60の継体、約45~約60の継体、約50~約60の継体、約15~約50の継体、約20~約50の継体、約25~約50の継体、約30~約50の継体、約35~約50の継体、約40~約50の継体、約15~約40の継体、約20~約40の継体、約25~約40の継体または約30~約40の継体について約100 nM以下、約75 nM以下、約50 nM以下、約25 nM以下、約20 nM以下、約15 nM以下、約10 nM以下または約1 nM以下の再標的化エンドペプチダーゼ活性における感度を示す。

【0097】

本明細書に開示した樹立した細胞株由来の細胞は、複数の細胞継体での再標的化エンドペプチダーゼ活性における一貫性がある相対的な有効性を示すことができる。本明細書で使用されるとき、用語「相対的な有効性」は、どの程度現在のアッセイ試験において検出された再標的化エンドペプチダーゼ活性について上漸近線がそのアッセイで使用されている標準物質、標準分子または標準継体数において検出された再標的化エンドペプチダーゼ

10

20

30

40

50

活性における上漸近線と比較できるのかを言う。本明細書で使用されるとき、用語「上漸近線におけるシグナル対ノイズ比」とは無治療対照またはバックグラウンドシグナルで検出できるシグナルで分割した検出の最大値でアッセイで検出されたシグナルを言う。検出の最大値はシグナルの飽和が起こる前における信号のアッセイが一貫して測定ができる最高用量である。

【0098】

従って、一実施形態では、本明細書において開示した樹立したクローン細胞株由来の細胞は複数の細胞継体で明確に定義された上漸近線を示ことができ、かつ、アッセイにとって一貫して十分なシグナル対ノイズ比を維持することができる。本実施形態の態様では、本明細書において開示した樹立したクローン細胞株由来の細胞は、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、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、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以上の、例えば、5以上の細胞継体、10以上の細胞継体、15以上の細胞継体、20以上の細胞継体、25以上の細胞継体、30以上の細胞継体、35以上の細胞継体、40以上の細胞継体、45以上の細胞継体、または50以上の細胞継体で再標的化エンドペプチダーゼ活性に関する上漸近線についてシグナル対ノイズ比を有しなければならない。本実施形態の別の態様では、本明細書において開示した樹立したクローン細胞株由来の細胞は、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、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、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以上の、例えば、約15 ~ 約60の継体、約20 ~ 約60の継体、約25 ~ 約60の継体、約30 ~ 約60の継体、約35 ~ 約60の継体、約40 ~ 約60の継体、約45 ~ 約60の継体、約50 ~ 約60の継体、約15 ~ 約50の継体、約20 ~ 約50の継体、約25 ~ 約50の継体、約30 ~ 約50の継体、約35 ~ 約50の継体、約40 ~ 約50の継体、約15 ~ 約40の継体、約20 ~ 約40の継体、約25 ~ 約40の継体、または約30 ~ 約40の継体で再標的化エンドペプチダーゼ活性に関する上漸近線について明確に定義されたシグナル対ノイズ比を有しなければならない。

【0099】

本明細書において開示した樹立したクローン細胞株由来の細胞は、複数の細胞継体で再標的化エンドペプチダーゼ活性について明確に定義された用量応答曲線を示すことができる。本明細書で使用されるとき、用語「用量応答曲線」は、どの程度生データがかかるアッセイにおける選択の統計モデルに適合するかを言う。非限定的な例として4 - パラメータロジスティック適合表示のS字状曲線は効力アッセイなどの酵素活性アッセイにおける用量応答曲線である。他の非限定的な例として単一部位飽和適合があるリガンド結合はリガンド/抗体結合アッセイにおける用量応答曲線である。

【0100】

従って、一実施形態では、本明細書において開示した樹立したクローン細胞株由来の細胞は複数の細胞継体で再標的化エンドペプチダーゼ活性について明確に定義された用量応答曲線を示す。本実施形態の態様では、本明細書において開示した樹立したクローン細胞

10

20

30

40

50

株由来の細胞は、例えば、5以上の細胞継体、10以上の細胞継体、15以上の細胞継体、20以上の細胞継体、25以上の細胞継体、30以上の細胞継体、35以上の細胞継体、40以上の細胞継体、45以上の細胞継体、または50以上の細胞継体で再標的化エンドペプチダーゼ活性について明確に定義された用量応答曲線を示す。本実施形態の別の態様では、本明細書において開示した樹立したクローン細胞株由来の細胞は、例えば、約15～約60の継体、約20～約60の継体、約25～約60の継体、約30～約60の継体、約35～約60の継体、約40～約60の継体、約45～約60の継体、約50～約60の継体、約15～約50の継体、約20～約50の継体、約25～約50の継体、約30～約50の継体、約35～約50の継体、約40～約50の継体、約15～約40の継体、約20～約40の継体、約25～約40の継体、または約30～約40の継体で再標的化エンドペプチダーゼ活性について明確に定義された用量応答曲線を示す。

10

#### 【0101】

本明細書において開示する樹立したクローン細胞株由来の細胞は複数の細胞継体で再標的化エンドペプチダーゼ活性について一貫性がある相対的な $EC_{50}$ 値を示すことができる。本明細書で使用されるとき、用語「相対的な $EC_{50}$ 」または「相対的な $EC_{50}$ 値」はそのアッセイで使用されている標準物質、標準分子または標準継体数について計算した $EC_{50}$ に対して正規化した再標的化エンドペプチダーゼ活性の $EC_{50}$ 値を言う。

#### 【0102】

従って、一実施形態では、樹立したクローン細胞株由来の細胞は複数の細胞継体で再標的化エンドペプチダーゼ活性について一貫性がある相対的な $EC_{50}$ 値を示す。本実施形態の態様では、樹立したクローン細胞株由来の細胞は、例えば、約±10%、約±20%、約±30%、約±40%、約±50%、約60%、約70%または約±75%、再標的化エンドペプチダーゼ活性について相対的な $EC_{50}$ 値、例えば、5以上の細胞継体、10以上の細胞継体、15以上の細胞継体、20以上の細胞継体、25以上の細胞継体、30以上の細胞継体、35以上の細胞継体、40以上の細胞継体、45以上の細胞継体、または50以上の細胞継体で再標的化エンドペプチダーゼ活性について一貫性がある相対的な $EC_{50}$ 値を示す。本実施形態の別の態様では、樹立したクローン細胞株由来の細胞は、例えば、約±10%～約75%、約±10%～約70%、約±10%～約60%、約±10%～約50%、約±10%～約40%、約±10%～約30%または約±10%～約20%、再標的化エンドペプチダーゼ活性について相対的な $EC_{50}$ 値、例えば、5以上の細胞継体、10以上の細胞継体、15以上の細胞継体、20以上の細胞継体、25以上の細胞継体、30以上の細胞継体、35以上の細胞継体、40以上の細胞継体、45以上の細胞継体、または50以上の細胞継体で再標的化エンドペプチダーゼ活性について一貫性がある相対的な $EC_{50}$ 値を示す。

20

30

#### 【0103】

本開示の態様は再標的化エンドペプチダーゼを一部含む。本明細書で使用されるとき、用語「再標的化エンドペプチダーゼ」は「標的化血管エキソサイトーシスモジュレーター蛋白質」または「TVEMP」と同意語とみなす。再標的化エンドペプチダーゼの非限定的な例はKeith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions (米国特許第5,989,545号); Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments (米国特許第6,461,617号); Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion (米国特許第6,632,440号); Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis (米国特許第6,843,998号); Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pai

40

50

n (米国特許出願公開第2002/0037833号); Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells (米国特許出願公開第2003/0180289号); J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins (国際公開第2001/014570号); Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates (国際公開第2005/023309号); Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use (米国特許出願公開第11/376,696号); Steward, L. E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells (米国特許出願公開第11/776,075号); Dolly, J. O. et al., Activatable Clostridial Toxins (米国特許出願公開第11/829,475号); Foster, K.A. et al., Fusion Proteins (国際公開第2006/059093号); and Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates (国際公開第2006/059105号)に開示されている。上記のそれぞれは、全内容が参照により本明細書に組み込まれる。再標的化エンドペプチダーゼの非限定的な例配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号130および配列番号131を含む。

#### 【0104】

従って、一実施形態では、検出される再標的化エンドペプチダーゼは再標的化エンドペプチダーゼからである。本実施形態の態様では、検出される再標的化エンドペプチダーゼはKeith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions (米国特許第5,989,545号); Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments (米国特許第6,461,617号); Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion (米国特許第6,632,440号); Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis (米国特許第6,843,998号); Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain (米国特許出願公開第2002/0037833号); Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells (米国特許出願公開第2003/0180289号); J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins (国際公開第2001/014570号); Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates (国際公開第2005/023309号); Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use (米国特許出願公開第11/376,696号); Steward, L. E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostrid

ial Toxin Target Cells (米国特許出願公開第11/776,075号); Dolly, J. O. et al., Activatable Clostridial Toxins, (米国特許出願公開第11/829,475号); Foster, K.A. et al., Fusion Proteins (国際公開第2006/059093号); および Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates (国際公開第2006/059105号)に開示した再標的化エンドペプチダーゼからである。上記のそれぞれは全内容が参照により本明細書に組み込まれる。本実施形態の態様では、再標的化エンドペプチダーゼは配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号130または配列番号131である。

10

## 【0105】

別の実施形態では、検出される再標的化エンドペプチダーゼはKeith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivative s Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions (米国特許第5,989,545号); Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments (米国特許第6,461,617号); Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion (米国特許第6,632,440号); Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis (米国特許第6,843,998号); Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain (米国特許出願公開第2002/0037833号); Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells (米国特許出願公開第2003/0180289号); J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins (国際公開第2001/014570号); Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates (国際公開第2005/023309号); Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use (米国特許出願公開第11/376,696号); Steward, L. E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells (米国特許出願公開第11/776,075号); Dolly, J. O. et al., Activatable Clostridial Toxins (米国特許出願公開第11/829,475号); Foster, K.A. et al., Fusion Proteins (国際公開第2006/059093号); および Foster, K.A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates (国際公開第2006/059105号)に開示されている再標的化エンドペプチダーゼを少なくとも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再標的化エンドペプチダーゼからである。上記のそれぞれは全内容が参照により本明細書に組み込まれる。別の実施形態では、検出される再標的化エンドペプチダーゼは配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号130または配列番号131の再標的化エンドペプチダーゼと少なくとも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

20

30

40

50

する再標的化エンドペプチダーゼからである。

【0106】

本実施形態の別の態様では、検出される再標的化エンドペプチダーゼはKeith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions (米国特許第5,989,545号); Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments (米国特許第6,461,617号); Conrad P. Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion (米国特許第6,632,440号); Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis (米国特許第6,843,998号); Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain (米国特許出願公開第2002/0037833号); Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells (米国特許出願公開第2003/0180289号); J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins (国際公開第2001/014570号); Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates (国際公開第2005/023309号); Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use (米国特許出願公開第11/376,696号); Steward, L. E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells (米国特許出願公開第11/776,075号); Dolly, J. O. et al., Activatable Clostridial Toxins (米国特許出願公開第11/829,475); Foster, K. A. et al., Fusion Proteins (国際公開第2006/059093号); およびFoster, K. A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates (国際公開第2006/059105号)に開示した再標的化エンドペプチダーゼと比べて1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上の非連続アミノ酸が置換、欠失または付加された再標的化エンドペプチダーゼからである。上記のそれぞれは全内容が参照により本明細書に組み込まれる。本実施形態の別の態様では、検出される再標的化エンドペプチダーゼは配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号130または配列番号131の再標的化エンドペプチダーゼと比べて1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上の非連続アミノ酸が置換、欠失または付加された再標的化エンドペプチダーゼからである。

【0107】

本実施形態の更に別の態様では、検出される再標的化エンドペプチダーゼはKeith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions (米国特許第5,989,545号); Clifford C. Shone et al., Recombinant Toxin Fragments (米国特許第6,461,617号); Conrad P.

10

20

30

40

50

Quinn et al., Methods and Compounds for the Treatment of Mucus Hypersecretion (米国特許第6,632,440号); Lance E. Steward et al., Methods And Compositions For The Treatment Of Pancreatitis (米国特許第6,843,998号); Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain (米国特許出願公開第2002/0037833号); Keith A. Foster et al., Inhibition of Secretion from Non-neural Cells (米国特許出願公開第2003/0180289号); J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins (国際公開第2001/014570号); Keith A. Foster et al., e-targeted Toxin Conjugates (国際公開第2005/023309号); Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use (米国特許出願公開第11/376,696号); Steward, L. E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells (米国特許出願公開第11/776,075号); Dolly, J. O. et al., Activatable Clostridial Toxins (米国特許出願公開第11/829,475号); Foster, K. A. et al., Fusion Proteins (国際公開第2006/059093号); および Foster, K. A. et al., Non-Cytotoxic Protein Conjugates (国際公開第2006/059105号) に開示した再標的化エンドペプチダーゼと比べて例えば、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上の連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ変異体からである。上記のそれぞれは全内容が参照により本明細書に組み込まれる。本実施形態の更に別の態様では、検出される再標的化エンドペプチダーゼは配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号130または配列番号131の再標的化エンドペプチダーゼと比べて1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上の連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼからである。

【0108】

更に別の実施形態では、検出される再標的化エンドペプチダーゼ活性はオピオイド再標的化エンドペプチダーゼからである。オピオイド再標的化エンドペプチダーゼまたはオピオイド-TVEMPの非限定的な例はKeith A. Foster et al., Clostridial Toxin Derivatives Able To Modify Peripheral Sensory Afferent Functions (米国特許第5,989,545号); J. Oliver Dolly et al., Activatable Recombinant Neurotoxins (米国特許第7,132,259号); Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain (米国特許第7,244,437号); Stephan Donovan, Clostridial Toxin Derivatives and Methods For Treating Pain (米国特許第7,413,742号); Stephan Donovan, Clostridial T

10

20

30

40

50

oxin Derivatives and Methods For Treating Pain (米国特許第7,415,338号); Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use (米国特許第7,514,088号); Keith A. Foster, Fusion Proteins (米国特許出願公開第2008/0064092号); Keith A. Foster, Fusion Proteins (米国特許出願公開第2009/0035822号); Lance E. Steward et al., Multivalent Clostridial Toxin Derivatives and Methods of Their Use (米国特許出願公開第2009/0048431号); Keith A. Foster, Non-Cytotoxic Protein Conjugates (米国特許出願公開第2009/0162341号); Keith A. Foster et al., Re-targeted Toxin Conjugates (国際公開第2005/023309号); および Lance E. Steward, Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Capabilities for Non-Clostridial Toxin Target Cells (国際公開第2008/008805号)に開示した。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

## 【0109】

更に別の実施形態では、検出される再標的化エンドペプチダーゼ活性は、ガラニン再標的化エンドペプチダーゼからである。ガラニン再標的化エンドペプチダーゼまたはガラニン-TVEMPの非限定的な例はSteward, L. E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capability and Enhanced Targeting Activity (米国特許出願公開第11/776,043号)(Jul. 11, 2007); Steward, L. E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells (米国特許出願公開第11/776,052号)(Jul. 11, 2007); およびSteward, L. E. et al., Modified Clostridial Toxins with Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Non-Clostridial Toxin Target Cells (米国特許出願公開第11/776,075号)(Jul. 11, 2007)に開示した。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

30

## 【0110】

本開示の態様はSNAP-25を一部を含む。本明細書で使用されるとき、用語「SNAP-25」は、天然のSNAP-25または再標的化エンドペプチダーゼにより優先的に切断されている天然には存在しないSNAP-25を言う。本明細書で使用されるとき、用語「優先的に切断されている」は再標的化エンドペプチダーゼによる他の基質と比べて少なくとも1桁より高い再標的化エンドペプチダーゼによるSNAP-25の開裂速度を言う。本実施形態の態様では、再標的化エンドペプチダーゼによるSNAP-25の開裂速度は再標的化エンドペプチダーゼによる他の基質の開裂速度と比べて少なくとも2桁より高い、少なくとも3桁より高い、少なくとも4桁より高い、または少なくとも5桁より高い。

40

## 【0111】

本明細書で使用されるとき、用語「天然のSNAP-25」は、天然のプロセス、限定

50

するものではなく、翻訳後修飾から産生されたSNAP - 25アイソフォーム、異なるスプライシングにより生成した転写物または自発突然変異およびSNAP - 25サブタイプにより産生されたSNAP - 25を言う。天然のSNAP - 25は、限定するものではなく、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または配列番号24からの1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上のアミノ酸を置換、欠失または付加したものを含む。

10

**【0112】**

本明細書で使用されるとき、用語「天然には存在しないSNAP - 25」は、限定するものではなく、ランダム突然変異誘導または合理的な設計を用いて遺伝子操作により産生されたSNAP - 25およびインビトロでの化学合成により産生されたSNAP - 25を含むヒトの操作の支援で修飾された構造のSNAP - 25を言う。天然には存在しないSNAP - 25の非限定的例は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 (米国特許出願公開第2008/0160561号)に開示した。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。天然には存在しない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からの1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上のアミノ酸を置換、欠失または付加してもよい。

20

30

**【0113】**

従って、一実施形態では、SNAP - 25は天然のSNAP - 25である。本実施形態の態様では、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。本実施形態の態様では、天然のSNAP - 25は少なくとも70%のアミノ酸同一性、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の天然のSNAP - 25である。本実施形態の別の態様では、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との少なくとも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のSNAP - 25である。

40

**【0114】**

別の実施形態では、SNAP - 25は天然には存在しないSNAP - 25である。本実施形態の別の態様では、SNAP - 25は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4との少なくとも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天然には存在しない

50

S N A P - 2 5 である。本実施形態の別の態様では、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 と比べて 1 以上、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、20 以上、30 以上、40 以上、50 以上または 100 以上の非連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しない S N A P - 2 5 である。本実施形態のさらに別の態様では、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 と比べて例えば、1 以上、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、20 以上、30 以上、40 以上、50 以上または 100 以上の連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しない S N A P - 2 5 である。

#### 【 0 1 1 5 】

S N A P - 2 5 は内因性 S N A P - 2 5 または外因性 S N A P - 2 5 であってもよい。本明細書で使用されるとき、用語「内因性 S N A P - 2 5」は、S N A P - 2 5 の外部物質源または S N A P - 2 5 をコード化する遺伝物質の外部物質源を必要とすることなく細胞が S N A P - 2 5 を固有に発現するように細胞のゲノム中に天然にコードされている細胞に天然に存在する S N A P - 2 5 を言う。内因性 S N A P - 2 5 の発現は細胞分化などの環境刺激を加えてもまた加えなくてもよい。定義に従い、内因性 S N A P - 2 5 は天然の S N A P - 2 5 またはその変異体だけである。例えば、以下の樹立された細胞株は B E ( 2 ) - M 1 7、K e l l y、L A 1 - 5 5 n、N 1 E - 1 1 5、N 4 T G 3、N 1 8、N e u r o - 2 a、N G 1 0 8 - 1 5、P C 1 2、S H - S Y 5 Y、S i M a、S K - N - D Z および S K - N - B E ( 2 ) - C などの内因性 S N A P - 2 5 を発現する。

#### 【 0 1 1 6 】

本明細書で使用されるとき、用語「外因性 S N A P - 2 5」は、S N A P - 2 5 の外部物質源またはヒトの操作により S N A P - 2 5 をコード化する遺伝物質の外部物質源を導入することで細胞内に発現する S N A P - 2 5 を言う。外因性 S N A P - 2 5 の発現は細胞分化などの環境刺激を加えてもまた加えなくてもよい。非限定的な例として、樹立した細胞株由来の細胞は S N A P - 2 5 の一時的または安定したトランスフェクションにより外因性 S N A P - 2 5 を発現できる。他の非限定的な例として、樹立した細胞株由来の細胞は S N A P - 2 5 の蛋白質移入により外因性 S N A P - 2 5 を発現できる。外因性 S N A P - 2 5 は天然の S N A P - 2 5 またはその変異体でありまたは天然には存在しない S N A P - 2 5 またはその変異体である。

#### 【 0 1 1 7 】

従って、一実施形態では、樹立した細胞株は内因性 S N A P - 2 5 を発現する。本実施形態の態様では、樹立した細胞株により発現する内因性 S N A P - 2 5 は天然の S N A P - 2 5 である。本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞により発現した内因性 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 である。本実施形態のさらなる態様では、樹立した細胞株由来の細胞により発現した内因性 S N A P - 2 5 は S N A P - 2 5 アイソフォームまたは S N A P - 2 5 サブタイプなどの天然の S N A P - 2 5 である。本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞により発現した内因性 S N A P - 2 5 は少なくとも 70% のアミノ酸同一性、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 との

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のSNAP-25である。

【0118】

別の実施形態では、樹立した細胞株由来の細胞は、一過性にまたは安定的に操作され、内因性SNAP-25を発現する。本実施形態の一態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、天然のSNAP-25を発現する。本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、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の天然のSNAP-25を発現する。さらに別の実施形態では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、SNAP-25アイソフォームまたはSNAP-25サブタイプなどの天然のSNAP-25を発現する。本実施形態の更に別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は、一過性にまたは安定的に操作され、少なくとも70%のアミノ酸同一性、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との少なくとも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のSNAP-25を発現する。

10

20

【0119】

本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は、一過性にまたは安定的に操作され、天然では存在しないSNAP-25を発現する。本実施形態の別の態様では、樹立したクローン細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、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との少なくとも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天然では存在しないSNAP-25を発現する。本実施形態の別の態様では、樹立したクローン細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、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と比べて例えば、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上の非連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しないSNAP-25を発現する。本実施形態のさらに別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、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と比べて例えば、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上の連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しないSNAP-25を発現する。

30

40

【0120】

再標的化エンドペプチダーゼ曝露後のSNAP-25の切断を検出するアッセイは、細胞が内因性または外因性SNAP-25を発現するかを評価するに用いることができる。このアッセイにおいてはSNAP-25切断産物の生成は再標的化エンドペプチダーゼ曝露後にSNAP-25を発現する細胞で検出される。ウェスタンブロット法ならびに十分

50

に特性が明らかな試薬、条件およびプロトコルの非限定的な例は、限定するものではなく、Amersham Biosciences、Piscataway、NJ；Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA；Pierce Biotechnology、Inc.、Rockford、IL；Promega Corporation、Madison、WI、and Stratagene、Inc.、La Jolla、CAなどの業者から容易に利用可能である。SNAP-25切断におけるこれらおよび類似のアッセイは内因性または外因性SNAP-25を発現する細胞を同定するのに有用となる可能性があることが理解される。

#### 【0121】

非限定的な例として、SNAP-25-切断産物またはSNAP-25の切断型と非切断型の両方を認識する抗体を用いたウェスタンブロット法は、再標的化エンドペプチダーゼ取込のアッセイに使用してもよい。このアッセイに有用なSNAP-25抗体の例は、限定するものではなく、SNAP-25マウスモノクローナル抗体SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc.、Lutherville、MD)、mouse SNAP-25 monoclonal antibody Cl 71.1 (Synaptic Systems、Goettingen、Germany)、SNAP-25マウスモノクローナル抗体Cl 71.2 (Synaptic Systems、Goettingen、Germany)、SNAP-25マウスモノクローナル抗体SP12 (Abeam、Cambridge、MA)、SNAP-25ウサギポリクローナル抗血清 (Synaptic Systems、Goettingen、Germany)、SNAP-25ウサギポリクローナル抗血清 (Abeam、Cambridge、MA)およびSNAP-25ウサギポリクローナル抗血清S9684 (Sigma、St Louis、MO)を含む。

#### 【0122】

開示の態様は再標的化エンドペプチダーゼ受容体を一部含む。本明細書で使用されるとき、用語「再標的化エンドペプチダーゼ受容体」は、再標的化エンドペプチダーゼ反応を誘発するように再標的化エンドペプチダーゼと優先的に相互作用する天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体または天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体と言う。本明細書で使用されるとき、用語「優先的に相互作用する」は、再標的化エンドペプチダーゼ受容体における再標的化エンドペプチダーゼの平衡解離定数(KD)が他の受容体における再標的化エンドペプチダーゼの場合よりも少なくとも1桁低いことを言う。平衡解離定数は再標的化エンドペプチダーゼおよび再標的化エンドペプチダーゼ受容体複合体などの構成要素分子へ可逆的に分離(解離)を行う再標的化エンドペプチダーゼ-再標的化エンドペプチダーゼ受容体複合体を性質を測定する特定のタイプの平衡定数である。平衡では $KD = K_a / K_d$ と定義する。会合定数( $K_a$ )は $K_a = [C] / [L][R]$ と定義し、解離定数( $K_d$ )は $K_d = [L][R] / [C]$ と定義する。ここで、[L]は再標的化エンドペプチダーゼのモル濃度、[R]は再標的化エンドペプチダーゼ受容体のモル濃度および[C]はエンドペプチダーゼ受容体複合体のモル濃度であり、さらにすべての濃度は系が平衡である場合の成分である。解離定数が小さくなるほど、再標的化エンドペプチダーゼがその受容体により強く結合し、または再標的化エンドペプチダーゼと再標的化エンドペプチダーゼ受容体間の結合親和性が高くなる。本実施形態の態様では、再標的化エンドペプチダーゼのその受容体における解離定数は他の受容体における再標的化エンドペプチダーゼと比べて少なくとも2桁低い、少なくとも3桁低い、少なくとも4桁低いまたは少なくとも5桁低い。本実施形態の別の態様では、受容体と優先的に相互作用する再標的化エンドペプチダーゼの結合親和性は、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(KD)を有することができる。本実施形態の別の態様では、受容体と優先的に相互作用する再標的化エンドペプチダーゼの結合親和性は90 nM以下、80 nM以下、70 nM以下、60 nM以下、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

10

20

30

40

50

衡解離定数 (KD) を有することができる。本明細書で使用されるとき、用語「再標的化エンドペプチダーゼ反応を誘発する」は、再標的化エンドペプチダーゼと相互作用してエンドペプチダーゼ/受容体複合体を形成し、かつ、その後、複合体を細胞質への内在化する再標的化エンドペプチダーゼ受容体の能力を言う。

【0123】

本明細書で使用されるとき、用語「天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体」は天然のプロセス、限定するものではなく、翻訳後修飾から産生された再標的化エンドペプチダーゼ受容体アイソフォーム、異なるスプライシングにより生成した転写物または自発突然変異および再標的化エンドペプチダーゼ受容体サブタイプで産生された再標的化エンドペプチダーゼ受容体を言う。天然の再標的化エンドペプチダーゼは、Christopher Evans et al., Opioid Receptor Genes, U.S. Patent 6,265,563; Christopher Evans et al., Methods of Screening Modulators of Opioid Receptor Activity (米国特許第6,432,652号); Christopher Evans et al., Opioid Receptors and Methods of Use (米国特許第7,282,563号); および Christopher Evans et al., Delta Opioid Receptor Proteins (米国特許出願公開第2008/0219925号)に記載されている、限定するものではなく、アヘン剤様受容体1 (ORL1)、 $\mu$ -オピオイド受容体 (DOR)、 $\kappa$ -オピオイド受容体 (KOR) および  $\mu$ -オピオイド受容体 (MOR) などの天然のオピオイド受容体を含む。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。天然の再標的化エンドペプチダーゼの他の例は、限定するものではなく、ガラニン受容体1、ガラニン受容体2およびガラニン受容体3を含む。霊長類、ウシ、イヌ、マウス、ニワトリおよび魚などの他の脊椎動物天然のオピオイド受容体は当該分野で周知であり本明細書の態様において使用することができる。

【0124】

天然のORL1は、限定するものではなく、配列番号25および配列番号26または配列番号25あるいは配列番号26から1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上のアミノ酸を置換、欠失または付加したものを含む。天然のDORは、限定するものではなく、配列番号27および配列番号28または配列番号27あるいは配列番号28から1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上のアミノ酸を置換、欠失または付加したものを含む。天然のKORは、限定するものではなく、配列番号29および配列番号30または配列番号29あるいは配列番号30から1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上のアミノ酸を置換、欠失または付加したものを含む。天然のMORは、限定するものではなく、配列番号31または配列番号31から1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上のアミノ酸を置換、欠失または付加したものを含む。

【0125】

天然のガラニン受容体1は、限定するものではなく、配列番号136、配列番号137および配列番号138または配列番号136、配列番号137あるいは配列番号138から1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上のアミノ酸を置換、欠失または付加したものを含む。天然のガラニン受容体2は、限定するものではなく、配列番号139または配列番号139から1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上のアミノ酸を置換、欠失または付加したものを含む。天然のガラニン受容体3は

10

20

30

40

50

、限定するものではなく、配列番号140または配列番号140から1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上のアミノ酸を置換、欠失または付加したものを含む。

【0126】

本明細書で使用されるとき、用語「天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体変異体」は、限定するものではなく、ランダム突然変異誘導または合理的な設計を用いて遺伝子操作により産生された再標的化エンドペプチダーゼ受容体、および、化学合成により産生された再標的化エンドペプチダーゼ受容体を含むヒトの操作または設計の支援で産生した再標的化エンドペプチダーゼ受容体を言う。天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体変異型の非限定的な例は保存的な再標的化エンドペプチダーゼ受容体変異体、非保存的な再標的化エンドペプチダーゼ受容体変異体再標的化エンドペプチダーゼ受容体キメラ変異体および活性再標的化エンドペプチダーゼ受容体断片などを含む。

10

【0127】

本明細書で使用されるとき、用語「天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体」は、限定するものではなく、ランダム突然変異誘導または合理的な設計を用いて遺伝子操作により産生された再標的化エンドペプチダーゼ受容体およびインビトロでの化学合成により産生された再標的化エンドペプチダーゼ受容体を含むヒトの操作の支援で修飾された構造の再標的化エンドペプチダーゼ受容体を言う。天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号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136、配列番号137、配列番号138、配列番号139または配列番号140からの1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上のアミノ酸を置換、欠失または付加したものを含んでもよい。

20

【0128】

従って、一実施形態では、再標的化エンドペプチダーゼはORL1、DOR、KORまたはMORなどの天然の再標的化エンドペプチダーゼである。本実施形態の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は再標的化エンドペプチダーゼ受容体アイソフォームまたは再標的化エンドペプチダーゼ受容体サブタイプである。本実施形態の態様では、天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号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または配列番号31の天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号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または配列番号31の少なくとも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天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。

30

【0129】

別の実施形態では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は遺伝子改変ORL1、遺伝子改変DOR、遺伝子改変KORまたは遺伝子改変MORなどの天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼである。本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号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または配列番号31の少なくとも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天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号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または配列番号31と比べて例えば、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上の非連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。本実

40

50

施形態のさらに別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号 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 または配列番号 31 と比べて例えば、1 以上、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、20 以上、30 以上、40 以上、50 以上または 100 以上の連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。

【0130】

別の実施形態では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体はガラニン受容体 1、ガラニン受容体 2 またはガラニン受容体 3 などの天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。本実施形態の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は再標的化エンドペプチダーゼ受容体アイソフォームまたは再標的化エンドペプチダーゼ受容体サブタイプである。本実施形態の態様では、天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号 136、配列番号 137、配列番号 138、配列番号 139、または配列番号 140 の天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号 136、配列番号 137、配列番号 138、配列番号 139、または配列番号 140 の少なくとも 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天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。

【0131】

別の実施形態では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は遺伝子改変ガラニン受容体 1、遺伝子改変ガラニン受容体 2 または遺伝子改変ガラニン受容体 3 などの天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号 136、配列番号 137、配列番号 138、配列番号 139、または配列番号 140 の少なくとも 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天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号 136、配列番号 137、配列番号 138、配列番号 139 または配列番号 140 と比べて例えば、1 以上、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、20 以上、30 以上、40 以上、50 以上または 100 以上の非連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。本実施形態の更に別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号 136、配列番号 137、配列番号 138、配列番号 139 または配列番号 140 と比べて例えば、1 以上、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、20 以上、30 以上、40 以上、50 以上または 100 以上の連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。

【0132】

再標的化エンドペプチダーゼ受容体は内因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体または外因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体であってもよい。本明細書で使用されるとき、用語「内因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体」は細胞内に天然に存在する再標的化エンドペプチダーゼ受容体を言う。これは細胞のゲノム中に天然にコードされており、再標的化エンドペプチダーゼ受容体の外部原因または再標的化エンドペプチダーゼ受容体をコード化する遺伝物質の外部原因を必要とすることなく細胞が再標的化エンドペプチダーゼ受容体を固有に発現するからである。内因性標的化エンドペプチダーゼ受容体の発現は細胞分化またはプロモータ活性化などの環境刺激を加えてもまた加えなくてもよい。例えば、次の樹立した細胞株は少なくとも 1 つの内因性標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する。それらは AGN P33、Neuro-2a、SiMa および SK-N-DZ である。内因性標的化エンドペプチダーゼ受容体は天然の標的化エンドペプチダーゼ受容体またはそれらの天然の異性体だけである。

【0133】

本明細書で使用されるとき、用語「外因性標的エンドペプチダーゼ受容体」は標的エンドペプチダーゼ受容体の外部の原因またはヒトの操作により標的エンドペプチダーゼ受容体をコード化する遺伝物質の外部原因を導入することで細胞内に発現する標的エンドペプチダーゼ受容体を言う。外因性標的エンドペプチダーゼ受容体の発現は細胞分化またはプロモータ活性化などの環境刺激を加えてもまた加えなくてもよい。非限定的な例として、樹立した細胞株由来の細胞はORL1、DOR、KOR、MOR、ガラニン受容体1、ガラニン受容体2またはガラニン受容体3などの標的エンドペプチダーゼ受容体をコード化するポリヌクレオチド分子の一時的または安定したトランスフェクションによる1つ以上の外因性標的エンドペプチダーゼ受容体を発現できる。別の非限定的な例として、樹立した細胞株由来の細胞はORL1、DOR、KOR、MOR、ガラニン受容体1、ガラニン受容体2またはガラニン受容体3などの標的エンドペプチダーゼ受容体の蛋白質トランスフェクションによる1つ以上の外因性標的エンドペプチダーゼ受容体を発現できる。外因性標的エンドペプチダーゼ受容体は、天然の標的エンドペプチダーゼ受容体あるいはそれらの天然の異性体または天然には存在しない標的エンドペプチダーゼ受容体あるいはそれらの天然には存在しない異性体であることができる。

10

## 【0134】

従って、一実施形態では、樹立した細胞株由来の細胞は内因性標的エンドペプチダーゼ受容体を発現する。本実施形態の態様では、樹立した細胞株由来の細胞により発現した外因性標的エンドペプチダーゼ受容体は天然の標的エンドペプチダーゼ受容体である。本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞により発現した内因性標的エンドペプチダーゼ受容体は配列番号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136、配列番号137、配列番号138、配列番号139または配列番号140である。本実施形態のさらに態様では、樹立した細胞株由来の細胞により発現した内因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体は再標的化エンドペプチダーゼ受容体アイソフォームまたは再標的化エンドペプチダーゼ受容体サブタイプなどの天然の再標的化エンドペプチダーゼである。本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞により発現した内因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体は配列番号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または配列番号31、配列番号136、配列番号137、配列番号138、配列番号139または配列番号140の少なくとも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天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体である。

20

30

## 【0135】

別の実施形態では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、内因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する。本実施形態の一態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する。本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、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または配列番号31、配列番号136、配列番号137、配列番号138、配列番号139または配列番号140の天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する。本実施形態のさらに別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、再標的化エンドペプチダーゼ受容体アイソフォームまたは再標的化エンドペプチダーゼ受容体サブタイプなどの天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する。本実施形態の更に別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、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または配列番号31、配列番号136、配列番号137、配列番号138、配列番号139または配列番号140の少なくとも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天然の再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する。

40

## 【0136】

50

本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する。本実施形態の別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、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 または配列番号 31、配列番号 136、配列番号 137、配列番号 138、配列番号 139 または配列番号 140 の少なくとも 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天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する。本実施形態の更に別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、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 136、配列番号 137、配列番号 138、配列番号 139 または配列番号 140 と比べて例えば、1 以上、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、20 以上、30 以上、40 以上、50 以上または 100 以上の非連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する。本実施形態のさらに別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、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 136、配列番号 137、配列番号 138、配列番号 139 または配列番号 140 と比べて例えば、1 以上、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、20 以上、30 以上、40 以上、50 以上または 100 以上の連続アミノ酸が置換、欠失または付加された天然には存在しない再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する。

#### 【0137】

別の実施形態では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、外因性 ORL1、外因性 DOR、外因性 KOR、外因性 MOR またはそれらの任意の組み合わせを発現する。本実施形態の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、天然の ORL1、天然の DOR、天然の KOR、天然の MOR またはそれらの任意の組み合わせを発現する。本実施形態のさらに別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、天然には存在しない ORL1、天然には存在しない DOR、天然には存在しない KOR、天然には存在しない MOR またはそれらの任意の組み合わせを発現する。本実施形態の更に別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、天然の ORL1 または天然には存在しない ORL1 のいずれか、天然の DOR または天然には存在しない DOR のいずれか、天然の KOR または天然には存在しない KOR のいずれか、天然の MOR または天然には存在しない MOR のいずれかまたはこれらの任意の組み合わせを発現する。

#### 【0138】

更に別の実施形態では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、外因性ガラニン受容体 1、外因性ガラニン受容体 2、外因性ガラニン受容体 3 またはそれらの任意の組み合わせを発現する。本実施形態の態様において、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、天然のガラニン受容体 1、天然のガラニン受容体 2、天然のガラニン受容体 3 またはそれらの任意の組み合わせを発現する。本実施形態のさらに別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、天然には存在しないガラニン受容体 1、天然には存在しないガラニン受容体 2、天然には存在しないガラニン受容体 3 またはそれらの任意の組み合わせを発現する。本実施形態の更に別の態様では、樹立した細胞株由来の細胞は一過性にまたは安定的に操作され、天然のガラニン受容体 1 または天然には存在しないガラニン受容体 1 のいずれか、天然のガラニン受容体 2 または天然には存在しないガラニン受容体 2 のいずれか、天然のガラニン受容体 3 または天然には存在しないガラニン受容体 3 のいずれかまたはこれらの組み合わせを発現する。

#### 【0139】

1 つ以上の内因性または外因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する細胞は再標的化エンドペプチダーゼ取込の直接および間接アッセイを含む定められた方法により同

定することができる。再標的化エンドペプチダーゼ結合または取込特性を測定するアッセイは細胞が再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現するかを評価するのに使用することができる。そのようなアッセイは、限定するものではなく、[125I] retargeted endopeptidase、see, e.g., Noriko Yokosawa et al., Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines, 57(1) Infect. Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa et al., Binding of botulinum type C1, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes, 29(2) Toxicol. 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)などの標識再標的化エンドペプチダーゼを用いた架橋アッセイを含む。他の非限定的なアッセイは標識または非標識抗体を用いて再標的化エンドペプチダーゼ結合を検出する免疫細胞化学的アッセイを含み例えば、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)を参照し、さらには標識または非標識抗体を用いて結合再標的化エンドペプチダーゼを検出する免疫沈降アッセイを含み例えば、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)を参照する。これらのアッセイに有用な抗体は、限定するものではなく、再標的化エンドペプチダーゼに対して選択された抗体および/または、例えば、ORL1、DOR、KOR、MOR、ガラニン受容体1、ガラニン受容体2またはガラニン受容体3などの再標的化エンドペプチダーゼ受容体に対して選択された抗体を含む。抗体が標識されている場合、分子の結合は当業者に周知の技術を用いてウェスタンブロット法、抗体の細胞内の位置を直接に顕微鏡下での観察、洗浄工程の後の細胞または基質結合抗体の測定、フローサイトメトリー、キャピラリー電気泳動などを含めた種々の方法で検出が可能である。抗体が非標識の場合、結合分子の間接的検出に標識二次抗体を用いてもよく、検出は標識抗体と同じように処理できる。再標的化エンドペプチダーゼ取込特性または特徴を測定するこれらと類似のアッセイは内因性または外因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体発現する細胞を同定するのに有用である可能性があることが理解される。

#### 【0140】

さらに再標的化エンドペプチダーゼ処理後の分子の放出をモニターするアッセイは、細胞が1つ以上の内因性または外因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現するかを評価するのに用いることができる。これらのアッセイでは分子放出の阻害が再標的化エンドペプチダーゼ処理後に再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する細胞に起こる。周知のアッセイは[3H]ノルアドレナリンまたは、例えば、[3H]ドーパミン分泌などの神経細胞からの放射能標識化カテコールアミン放出の阻害を測定する方法を含む。例えば、A Fassio et al. 破傷風毒素およびボツリヌス毒素 type Fに非感受性なカルシウム依存性小胞伝達物質放出の証拠 90(3) Neuroscience

10

20

30

40

50

893-902 (1999) および Sara Stigliani et al. ボツリヌス毒素の C1 及び E に対するカテコールアミン遊離の感受性は容易に遊離可能なプール内への小胞セットの選択的標的化を示唆する 85 (2) J. Neurochem. 409-421 (2003) または蛍光法を用いてカテコールアミン放出を測定する。参照文献の例、Anton de Paiva et al. エクトアクセプタに結合し細胞内への伝達物質遊離を阻害する毒素誘導体により明らかにされるボツリヌス神経毒 A の内在化における鎖間ジスルフィドまたはその関与するチオールの役割 268 (28) J. Biol. Chem. 20838-20844 (1993)、Gary W. Lawrence et al. 無処理および透過性クロム親和性細胞のボツリヌス毒素 A または B による 25 kDa シナプトソーム会合蛋白質 (SNAP 25) あるいはシナプトプレビン切断後の異なったエキソサイトーシス応答 236 (3) Eur. J. Biochem. 877-886 (1996) および Patrick Foran et al. ボツリヌス神経毒 C1 は無傷ならびに透過性処理クロム親和性細胞においてシタキシシンと SNAP 25 を分解する、そのカテコールアミン放出妨害との関連 35 (8) Biochemistry 2630-2636 (1996)。他の非限定的な例は垂体前葉細胞または卵巣細胞などの内分泌細胞からのホルモン放出の阻害を計測するアッセイを含む。分子の放出のこれらと類似のアッセイは内因性、外因性あるいは再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する細胞を同定するのに有用である可能性があることが理解される。

#### 【0141】

さらに再標的化エンドペプチダーゼ曝露後の SNAP - 25 基質の切断を検出するアッセイは細胞が 1 つ以上の内因性または外因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現するかを評価するのに用いることができる。このアッセイにおいては SNAP - 25 基質切断産物の生成または無処理 SNAP - 25 の消失は再標的化エンドペプチダーゼ処理後の再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する細胞内で検出できる。ウェスタンブロット法ならびに十分に特性が明らかな試薬、条件およびプロトコールの非限定的な例は、限定するものではなく、Amersham Biosciences、Piscataway、NJ; Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA; Pierce Biotechnology、Inc.、Rockford、IL; Promega Corporation、Madison、WI、and Stratagene、Inc.、La Jolla、CA などの業者から容易に利用可能である。SNAP - 25 基質切断におけるこれらおよび類似のアッセイは内因性または外因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する細胞を同定するのに有用となる可能性があることが理解される。

#### 【0142】

非限定的な例として SNAP - 25 - 切断産物または SNAP - 25 の切断型と非切断型の両方を認識する抗体を用いたウェスタンブロット法は再標的化エンドペプチダーゼ取込のアッセイに使用できる可能性がある。これらのアッセイに有用な SNAP - 25 抗体の例は、限定するものではなく、SMI - 81 - SNAP - 25 マウスモノクローナル抗体 (Sternberger Monoclonals Inc.、Lutherville、MD)、Cl 71.1 mouse - SNAP - 25 monoclonal antibody (Synaptic Systems、Goettingen、Germany)、Cl 71.2 - SNAP - 25 マウスモノクローナル抗体 (Synaptic Systems、Goettingen、Germany)、SP12 - SNAP - 25 マウスモノクローナル抗体 (Abeam、Cambridge、MA)、- SNAP - 25 ウサギポリクローナル抗血清 (Synaptic Systems、Goettingen、Germany)、- SNAP - 25 ウサギポリクローナル抗血清 S9684 (Sigma、St. Louis、MO) および - SNAP - 25 ウサギポリクローナル抗血清 (Abeam、Cambridge、MA) を含む。

## 【 0 1 4 3 】

開示の態様は外因性 S N A P - 2 5 および / または 1 つ以上の外因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する遺伝子操作または組換え技術により作製される細胞を提示する。遺伝子操作または組換え技術により作製される外因性 S N A P - 2 5 および / または 1 つ以上の外因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体の発現に有用な細胞は外因性 S N A P - 2 5 および / または 1 つ以上の外因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する場合も、発現しない場合もある神経細胞および非神経細胞を含む。そのような遺伝子操作と組換えられた細胞は構成的、組織特異的、細胞特異的、誘導プロモータエレメント、エンハンサーエレメントまたは両方の制御下で外因性 S N A P - 2 5 および 1 つ以上の外因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現するかもしれないとがさらに理解される。外因性 S N A P - 2 5 および / または 1 つ以上の外因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現するよう細胞が遺伝子操作され、かつ、組換えられ再標的化エンドペプチダーゼ活性となりえる可能性がある限り細胞は有用であることが理解される。

10

## 【 0 1 4 4 】

再標的化エンドペプチダーゼが、例えば、S N A P - 2 5、O R L 1、D O R、K O R または M O R などの S N A P - 2 5 基質の蛋白質分解を起こし、全体的細胞性機構を行う細胞に必要な成分をコード化する外因性ポリヌクレオチド分子を細胞に導入するのに有用な方法は、限定するものではなく、リン酸カルシウム媒介、ジエチルアミノエチル ( 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などの化学物質媒介送達法、さらにバイオリスティック粒子送達法、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などの物理的媒介送達法およびレトロウイルス媒介トランスフェクションなどのウイルス媒介送達法を含む。例えば、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 ) を参照のこと。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。ポリヌクレオチド分子を細胞に導入する特定の方法の選択は再標的化エンドペプチダーゼが S N A P - 2 5 基質の蛋白質分解を起こし、全般的な細胞機構を行う細胞に必要な少なくとも 1 つの成分を一過性にまたは安定的に含む細胞がどうか一部依存することは当業者は理解できる。再標的化エンドペプチダーゼが S N A P - 2 5 基質の蛋白質分解を起こし全体的細胞性機構を行う細胞に必要な成分をコード化するポリヌクレオチド分子の非限定的な例は、配列番号 6 1 または配列番号 6 2 の O R L 1 ポリヌクレオチド分子、配列番号 6 3 または配列番号 6 4 の D O R ポリヌクレオチド分子、配列番号 6 5 または配列番号 6 6 の K O R ポリヌクレオチド分子、配列番号 6 7 の M O R ポリヌクレオチド分子、配列番号 1 4 1、配列番号 1 4 2 または配列番号 1 4 3 のガラニン受容体 1 ポリヌクレオチド分子、配列番号 1 4 4 のガラニン受容体 2 ポリヌクレオチド分子、配列番号 1 4 5 のガラニン受容体 3 ポリヌクレオチド分子および配列番号 6 8 または配列番号 6 9 の S N A P - 2 5 ポリヌクレオチド分子である。

20

30

40

## 【 0 1 4 5 】

化学物質媒介送達法は、例えば、Martin Jordan & Florian

50

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)に記載されており、当業者に周知である。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。そのような化学物質媒介送達法は標準的な手順で調製することができ、かつ、市販されている。例えば、CellPfect Transfection Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); Mammalian Transfection Kit, Calcium phosphate and DEAE Dextran, (Stratagene, Inc., La Jolla, CA); Lipofectamine (商標) Transfection Reagent (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); ExGen 500 Transfection kit (Fermentas, Inc., Hanover, MD)およびSuperfect and Effectene Transfection Kits (Qiagen, Inc., Valencia, CA)を参照のこと。

10

**【0146】**

物理的媒介送達法は、例えば、Jeike E. Biewenga et al., Plasmid-Mediated Gene Transfer in Neurons using the Biolistics Technique, 71(1) J. Neurosci. Methods. 67-75(1997); John O'Brien & Sarah C. R. Lummis, Biolistic and Diolistic Transfection: Using the Gene Gun to Deliver DNA and Lipophilic Dyes into Mammalian Cells, 33(2) Methods 121-125 (2004); M. Golzio et al., In Vitro and In Vivo Electric Field-Mediated Permeabilization, Gene Transfer, and Expression, 33(2) Methods 126-135 (2004);およびOliver Greschet al., New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells, 33(2) Methods 151-163 (2004)に記載されており、当業者に周知である。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

**【0147】**

ウイルス媒介送達法は、例えば、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 Retrovira

40

50

l - 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 (米国特許第5,464,758号); Hermann Bujard & Manfred Gossen、Methods for Regulating Gene Expression (米国特許第5,814,618号); David S. Hogness、Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same (米国特許第5,514,578号); David S. Hogness、Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor (米国特許第6,245,531号); Elisabetta Vegeto et al.、Progesterone Receptor Having C - Terminal Hormone Binding Domain Truncations (米国特許第5,364,791号); Elisabetta Vegeto et al.、Mutated Steroid Hormone Receptors、Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy (米国特許第5,874,534号)に記載されており、当業者に周知である。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。そのようなウイルス媒介送達法は標準的な手順で調製することができる市販されている。例えば、VIRAPOW<sup>ER</sup> (登録商標) Adenoviral Expression System (Invitrogen、Inc.、Carlsbad、CA) and VIRAPOW<sup>ER</sup> <sup>T</sup><sup>M</sup> Adenoviral Expression System Instruction Manual 25 - 0543 version A、Invitrogen、Inc.、(Jul. 15、2002); および ADEASY (登録商標) Adenoviral Vector System (Stratagene、Inc.、La Jolla、CA) and ADEASY <sup>T</sup><sup>M</sup> Adenoviral Vector System Instruction Manual 064004f、Stratagene、Inc. を参照のこと。さらにそのようなウイルス送達システムは標準的な手順で調製することができ、かつ、市販されている。例えば、BD (商標) Tet - Off and Tet - On Gene Expression Systems (BD Biosciences - Clontech、Palo Alto、CA) and BD (商標) Tet - Off and Tet - On Gene Expression Systems User Manual、PT3001 - 1、BD Biosciences Clontech、(Mar. 14、2003)、GeneSwitch (商標) System (Invitrogen、Inc.、Carlsbad、CA) and GENE SWITCH (商標) System A Mifepristone - Regulated Expression System for Mammalian Cells version D、25 - 0313、Invitrogen、Inc.、(Nov. 4、2002); VIRAPOW<sup>ER</sup> (商標) Lentiviral Expression System (Invitrogen、Inc.、Carlsbad、CA) and VIRAPOW<sup>ER</sup> (商標) Lentiviral Expression System Instruction Manual 25 - 0501 version E、Invitrogen、Inc.、(Dec. 8、2003); および COMPLETE CONTROL (登録商標) Retroviral Inducible Mammalian Expression System (Stratagene、La Jolla、CA) および COMPLETE CONTROL (登録商標

) Retroviral Inducible Mammalian Expression System Instruction Manual、064005eである。

【0148】

従って、一実施形態では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼがSNAP-25基質の蛋白質分解を起こし全体的細胞性機構を行う細胞に必要な成分をコード化するポリヌクレオチド分子を含む。別の実施形態では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞は、再標的化エンドペプチダーゼがSNAP-25基質の蛋白質分解を起こし全体的細胞性機構を行う細胞に必要な複数の成分をコード化するポリヌクレオチド分子を含む。本実施形態の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はORL1、DOR、KOR、MORまたはSNAP-25をコード化するポリヌクレオチド分子を含む。本実施形態の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はORL1をコード化する配列番号61または配列番号62のポリヌクレオチド分子を含む。本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はDORをコード化する配列番号63または配列番号64のポリヌクレオチド分子を含む。本実施形態のさらに別の態様では、標的エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はKORをコード化する配列番号65または配列番号66のポリヌクレオチド分子を含む。本実施形態の更に別の態様では、標的エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はMORをコード化する配列番号67のポリヌクレオチド分子を含む。

10

20

【0149】

本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はガラニン受容体1をコード化する配列番号141、配列番号142または配列番号143のポリヌクレオチド分子を含む。本実施形態のさらに別の態様では、標的エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はガラニン受容体2をコード化する配列番号144のポリヌクレオチド分子を含む。本実施形態の更に別の態様では、標的エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞は、ガラニン受容体3をコード化する配列番号145のポリヌクレオチド分子を含む。本実施形態の更に別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はSNAP-25をコード化する配列番号68または配列番号69のポリヌクレオチド分子を含む。

30

【0150】

別の実施形態では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞は、再標的化エンドペプチダーゼがSNAP-25基質の蛋白質分解を起こし全体的細胞性機構を行う細胞に必要な成分をコード化するポリヌクレオチド分子を安定的に含む。別の実施形態では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞は、再標的化エンドペプチダーゼがSNAP-25基質の蛋白質分解を起こし全体的細胞性機構を行う細胞に必要な複数の成分をコード化するポリヌクレオチド分子を安定的に含む。本実施形態の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はORL1、DOR、KOR、MORまたはSNAP-25をコード化するポリヌクレオチド分子を安定的に含む。本実施形態の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はORL1をコード化する配列番号61または配列番号62のポリヌクレオチド分子を安定的に含む。本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はDORをコード化する配列番号63または配列番号64のポリヌクレオチド分子を安定的に含む。本実施形態のさらに別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はKORをコード化する配列番号65または配列番号66のポリヌクレオチド分子を安定的に含む。本実施形態のさらに別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はMORをコー

40

50

ド化する配列番号67のポリヌクレオチド分子を安定的に含む。

【0151】

本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はガラニン受容体1をコード化する配列番号141、配列番号142または配列番号143のポリヌクレオチド分子を安定的に含む。本実施形態のさらに別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はガラニン受容体2をコード化する配列番号144のポリヌクレオチド分子を安定的に含む。本実施形態のさらに別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はガラニン受容体3をコード化する配列番号145のポリヌクレオチド分子を安定的に含む。本実施形態の更に別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である樹立した細胞株由来の細胞はSNAP-25をコード化する配列番号68または配列番号69のポリヌクレオチド分子を安定的に含む。

10

【0152】

上記のように、本明細書に記載されているSNAP-25、ORL1、DOR、KOR、MOR、ガラニン受容体1、ガラニン受容体2またはガラニン受容体3などの再標的化エンドペプチダーゼがSNAP-25基質の蛋白質分解を起こし全般的な細胞機構を行う細胞に必要な外因性成分を細胞に導入することができる。細胞集団へ送達させる送達剤を有している全てのそのような外因性成分の導入に有用な方法は、方法が所与の細胞集団内の少なくとも50%の細胞に本明細書に記載した外因性成分を一過性に導入する条件下では有用であることができる。従って本実施形態の態様は、再標的化エンドペプチダーゼが本明細書に記載されているSNAP-25、ORL1、DOR、KOR、MOR、ガラニン受容体1、ガラニン受容体2またはガラニン受容体3などのSNAP-25基質の蛋白質分解を起こし、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%の所与の細胞集団は全般的な細胞機構を行う細胞に必要な外因性成分を含む細胞集団を含むことができる。本明細書で使用されるとき、用語「送達剤」は共有結合、非共有結合する剤または他の方法においてポリペプチドの細胞への導入に関連する剤の内在化を可能にして高める分子を言う。従って用語「送達剤」は、限定するものではなく、蛋白質、ペプチド、ペプチド模倣物、小分子、ポリヌクレオチド分子、リボソーム、脂質、ウイルス、レトロウイルスであり、かつ、限定するものではないが、細胞膜、細胞質または核に共有結合または非共有結合した分子を輸送する細胞を含む。用語「送達剤」は、その機能が受容体媒介エンドサイトーシスを介し、かつ、受容体媒介エンドサイトーシスとは独立している送達剤を含む機構により取り込まれる分子を含むことがさらに理解される。

20

30

【0153】

さらに送達剤は、例えば、化学結合または一般的に産生された融合蛋白質を用いてSNAP-25、ORL1、DOR、KOR、MOR、ガラニン受容体1、ガラニン受容体2またはガラニン受容体3などの共有結合成分の細胞組込みを可能にし、高める薬剤であってもよい。送達剤と共有結合させる方法およびそのような薬剤を用いる方法は、例えば、Steven F. Dowdy、Protein Transduction System and Methods of Use Thereof、International Publication No WO 00/34308; Gerard Chassaing & Alain Prochiantz、Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules (米国特許第6,080,724号); Alan Frankel et al.、Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiety (米国特許第5,674,980号); Alan Frankel et al.、TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates (米国特許第5,747,641号); Alan Frankel et al.、TAT-derived Transport Poly

40

50

peptides and Fusion Proteins (米国特許第5,804,604号); Peter F. J. O'Hare et al., Use of Transport Proteins (米国特許第6,734,167号); Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells (米国特許第5,807,746号); Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells (米国特許第6,043,339号); Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity (米国特許第6,248,558号); Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity (米国特許第6,432,680号); Jack J. Hawiger et al., Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells (米国特許第6,495,518号); Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity (米国特許第6,780,843号); Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes (米国特許第6,306,993号); Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes (米国特許第6,495,663号); および Pamela B. Davis et al., Fusion Proteins for Protein Delivery (米国特許第6,287,817号)に記載されている。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0154】

さらに送達剤はSNAP-25、ORL1、DOR、KOR、MOR、ガラニン受容体1、ガラニン受容体2またはガラニン受容体3などの非共有結合と関連する成分の細胞取込を可能にして高める薬剤でありることができる。共有結合の不存在下において機能する方法およびそのような薬剤を使用する方法は、例えば、Gilles Divita et al., Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use (米国特許第6,841,535号); Philip L Feigner and Olivier Zelphati, Intracellular Protein Delivery Composition and Methods of Use (米国特許出願公開第2003/0008813号); および Michael Karas, Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids (米国特許出願公開第2004/0209797号)に記載されている。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。そのようなペプチド送達剤は標準的な手順で調製することができ、かつ、市販されている。例えば、CHARIOT (商標) Reagent (Active Motif, Carlsbad, CA); BIO-PORTER (登録商標) Reagent (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA)、BIO TREK (商標) Protein Delivery Reagent (Stratagene, La Jolla

a、CA)およびPRO-JECT(商標) Protein Transfection Reagent (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL)である。

【0155】

開示の態様は再標的化エンドペプチダーゼ受容体含む試料を一部含む。本明細書で使用されるとき、用語「再標的化エンドペプチダーゼ受容体含む試料」は活性再標的化エンドペプチダーゼを含むかまたは潜在的に含む生体物質を言う。本明細書に開示した方法に従い、限定するものではなく、精製された、部分精製されたまたは未精製の再標的化エンドペプチダーゼ、天然のまたは天然には存在しない配列を有する組み換え1本または2本鎖再標的化エンドペプチダーゼ、修飾プロテアーゼ特異性を有する組み換え再標的化エンドペプチダーゼ、変化した細胞特異性を有する組み換え再標的化エンドペプチダーゼ、バルク再標的化エンドペプチダーゼ、製剤再標的化エンドペプチダーゼ製品、供給源がバクテリア、酵母菌、昆虫または哺乳動物からである細胞または粗製、分画した、あるいは部分精製した細胞溶解物、血液、血漿または血清、生の部分的に調理した、調理したまたは加工食品、飲料、動物のエサ、土壌試料、水試料、池の堆積物、ローション、化粧品および臨床製剤を含ま含んだ様々な試料をアッセイすることができる。試料という用語は組織試料、限定するものではなく、哺乳動物の組織試料、ヒツジ、ウシ、ブタの組織細胞を含む家畜組織試料およびヒト組織試料を含むことが理解される。そのような試料は、限定するものではなく、幼児腸内試料などの腸内試料および創傷の細胞試料を含む。非限定的な例として再標的化エンドペプチダーゼを投与されたかまたはボツリヌス中毒の1つ以上の症状を有するヒトまたは動物由来の試料のアッセイをする、バルク再標的化エンドペプチダーゼの産生および精製中の活性に従う、医薬または化粧品の用途での製剤再標的化エンドペプチダーゼ製品をアッセイする、再標的化エンドペプチダーゼ抗体の中和の存在または非存在について被験体の血清のアッセイをするなど、再標的化エンドペプチダーゼ活性のピコモル量を検出する方法は再標的化エンドペプチダーゼの存在または活性を測定するのに有用であることができる。

【0156】

従って、一実施形態では、再標的化エンドペプチダーゼを含む試料はいずれかの大きさの再標的化エンドペプチダーゼを含む試料である。本実施形態の態様では、再標的化エンドペプチダーゼを含む試料は約100ng以下、約10ng以下、約1ng以下、約100pg以下、約10pg以下または約1pg以下の再標的化エンドペプチダーゼを含む。本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼを含む試料は約1μM以下、約100nM以下、約10nM以下、約1nM以下、約100nM以下、約10nM以下、約1nM以下の再標的化エンドペプチダーゼを含む。

【0157】

開示の態様はBONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25を含むSNAP-25成分から処理した細胞を単離する、を一部含む。本明細書で使用されるとき、用語「BONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25を含むSNAP-25成分」はSNAP-25切断産物を含む細胞成分を言う。SNAP-25成分を富化するまたは単離するのに好適な方法は、限定するものではなく、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、アフィニティ精製および蛋白質クロマトグラフィを含め有用であることができるように構成されたものである。

【0158】

開示の態様は固相支持体に結合したSNAP-25抗体を一部含む。本明細書で使用されるとき、用語「固相支持体」は、「固相」と同意語とみなし本明細書に開示したSNAP-25抗体を固定化するのに使用することができるマトリックスを言う。固相支持体の非限定的な例は試験管内、プレート、カラム、ピン、「試験紙」、アガロース、セファロース、シリカおよびプラスチックなどの磁性粒子、ビーズまたは他の球体あるいは繊維性クロマトグラフィ充填剤、ならびにニトロセルロースおよびポリビニリデンフル

10

20

30

40

50

オリド (P V D F) などのシートまたは膜を含む。固相支持体はガラス、カーボン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、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でんぷんなどの多種多様の材料を用いて構築することができる。選択された固相支持体は溶解性または非結合材料から容易に分離することができ、かつ、一般的に過剰の試薬、反応副産物または溶媒などの非結合材料を固相支持体結合アッセイ成分から (洗浄、濾過、遠心分離などにより) 分離させるかまたは除去させることができる物性を持つことができる。固相支持体の生成および使用方法の非限定的な例は Molecular Cloning, A Laboratory Manual, supra, (2001); および Current Protocols in Molecular Biology, supra, (2004) に記載されている。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

10

## 【0159】

開示の態様は B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 切断産物を含む抗体 - 抗原複合体の存在を検出することを一部含む。シグナル対ノイズ比が抗体 - 抗原複合体のシグナルをバックグラウンドシグナルから統計学的に有意な程度で識別できる条件下で、検出システムは本開示免疫を利用した方法を実施に使用するように構成されたものである。開示免疫を利用した方法の非限定的な例はウェスタンブロット法およびドットブロット法、免疫沈降分析、酵素免疫吸着測定法 (E L I S A) およびサンドイッチ E L I S A などのイムノブロット分析を含む。シグナルの検出は画像およびりん画像診断を用いたオートラジオグラフィ (A U)、化学ルミネセンス (C L)、電気化学ルミネセンス (E C L)、バイオルミネセンス (B L)、を蛍光、共鳴エネルギー移動、面内偏光、比色またはフローサイトメトリー (F C) を用いて達成することができる。免疫を利用した検出システムの記載は 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) に開示されている。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

40

## 【0160】

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、抗原の異なるエピトープに結合した2つの抗体に基づく方法である。目的の抗原の高い特異性を有する捕捉抗体は固体表面に結合している。次に抗原を添加し、検出抗体で参照した第二の抗体を添加する。検出抗体は抗原を捕捉抗体と異なるエピトープに結合する。従って抗原は2つの

50

抗体の間に「サンドイッチされた」状態になる。通常は、抗原に対する抗体結合親和性はイムノアッセイ感度の決定要因である。抗原の濃度が上昇するに従い、検出抗体の量が上昇して測定した応答がより大きくなる。第二の抗体に結合した酵素および酵素反応が検出シグナルとして読み取りを形成するリポーター基質などの異なるレポーターシステムの結合程度の定量化を使用することができる。発信する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リポーター基質が検出モードを決定する。分光光度計プレート読み出し器は比色検出に使用される。シグナルをより増幅させ、かつ、蛍光読み出し器で読める化学ルミネセンスおよび電気化学ルミネセンスが作成されてきた。さらにリポーターはアッセイの酵素工程がフルオロフォアで代替されている読み出しであってもよく、さらに読み出しは蛍光読み出し器を用いて計測される。ECLサンドイッチELISAを実施するのに必要な試薬およびプロトコールは、限定するものではなく、MSD sandwich ELISA - ECL detection platform (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) から市販されている。

10

## 【0161】

従って、一実施形態では、BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する - SNAP-25抗体およびBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25切断産物を含む抗体-抗原複合体の存在を検出することは、イムノプロット分析、免疫沈降分析、ELISAまたはサンドイッチELISAを用いて実施することができる。本実施形態の態様では、検出はAU、CL、ECLあるいはBLイムノプロット分析、AU、CL、ECL、BLあるいはFC免疫沈降分析、AU、CL、ECL、BLあるいはFC ELISAまたはAU、CL、ECL、BLあるいはFCサンドイッチELISAを用いて実施する。

20

## 【0162】

本開示の態様は一重(singleplex)または多重(multiplex)の方法で実施することができる。一重の方法で実施する再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する免疫を利用した方法は - SNAP-25およびBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有する - SNAP-25切断産物を含む抗体-抗原複合体の存在を検出するのみの方法である。多重の方法で実施する再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する免疫を利用した方法は2以上の抗体-抗原複合体の存在を同時に検出する方法であり、その1つは - SNAP-25およびBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有する - SNAP-25切断産物を含む抗体-抗原複合体であり、他は第2、第3、第4などの異なる蛋白質に結合する抗体-抗原複合体である。例えば、検出した - SNAP-25/SNAP-25抗体-抗原複合体の量を第二の蛋白質用に検出した抗体-抗原複合体の量に正規化することで第二の蛋白質を試料間のバラツキを最小にする内部標準などに使用することができる。そのために通常、第二の蛋白質はハウスキーパー蛋白質などの細胞により一貫して発現される蛋白質である。有用な第二の蛋白質の非限定的な例は、例えば、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、シタキシン、サイトカインを含む。多重の方法で免疫を利用したアッセイを実施する方法は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-

30

40

50

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)に記載されている。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【0163】

従って、一実施形態では、 $\alpha$ -SNAP25抗体およびBONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25切断産物を含む抗体-抗原複合体の存在を検出することだけで、一重の方法で実施する再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する免疫を利用した方法である。別の実施形態では、 $\alpha$ -SNAP25抗体およびBONT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25切断産物、ならびに例えば、GAPDHあるいはシタキシンなどのSNAP-25以外の蛋白質に結合する少なくとも1つの他の抗体-抗原複合体を含む抗体-抗原複合体の存在を同時に検出することで、多重の方法で実施する再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する免疫を利用した方法である。

【0164】

開示の態様は再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗性を測定する方法を一部で提示する。本明細書で使用されるとき、用語「再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗性」は哺乳動物の免疫反応が治療の有効性を直接的または間接的に低減させることにより再標的化エンドペプチダーゼ治療に完全に反応しないかまたは、再標的化エンドペプチダーゼ治療の有効性が低減した哺乳動物を意味する。有効性を低減させる非限定的な例は、再標的化エンドペプチダーゼの特異性または活性を低減または妨げるように再標的化エンドペプチダーゼに結合する哺乳動物における少なくとも1つの中和 $\alpha$ -再標的化エンドペプチダーゼ抗体の存在である。本明細書で使用されるとき、用語「再標的化エンドペプチダーゼ治療」は哺乳動物に再標的化エンドペプチダーゼを用いて、あるいは医薬、臨床、治療、美容、治療、その他の有効作用がある再標的化エンドペプチダーゼの薬、製剤または混合物の統制した用量を複数投与することで処置、治療、施療、ヒーリング、リハビリテーションまたは神経調節を必要とする哺乳動物において好ましくないものを打ち消すなどの他の手段を意味する。再標的化エンドペプチダーゼ治療は、限定するものではなく、いかなる製剤であれキャリアまたは有効成分と混合し、かつ、任意の経路により投与された天然のまたはそれらの修飾断片の使用を含む。

【0165】

開示の態様は再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の有無について試験をした哺乳動物から取得した試験試料を一部提示する。本明細書で使用されるとき、用語「試験試料」は少なくとも1つの $\alpha$ -再標的化エンドペプチダーゼを含むかまたは潜在的に含む生体物質を言う。 $\alpha$ -再標的化エンドペプチダーゼ抗体は中和 $\alpha$ -再標的化エンドペプチダーゼ抗体または非中和 $\alpha$ -再標的化エンドペプチダーゼ抗体であることができる。本明細書で使用されるとき、用語「中和 $\alpha$ -再標的化エンドペプチダーゼ抗体」は生理学的条件下で、再標的化エンドペプチダーゼ治療において再標的化エンドペプチダーゼの効果の発揮を低減または防止するように再標的化エンドペプチダーゼの領域に結合する任意の中和 $\alpha$ -再標的化エンドペプチダーゼ抗体を意味する。本明細書で使用されるとき、用語「非中和 $\alpha$ -再標的化エンドペプチダーゼ抗体」は生理学的条件下で、再標的化エンドペプチダーゼ治療において再標的化エンドペプチダーゼの効果の発揮を防止しないように再標的化エンドペプチダーゼの領域に結合する任意の中和 $\alpha$ -再標的化エンドペプチダーゼ抗体を意味する。 $\alpha$ -再標的化エンドペプチダーゼ抗体を含んでもよいすべての試料は、限定するものではなく、血液、血漿、血清およびリンパ液を含めた方法で使用することができるように構成されたものである。加えて、再標的化エンドペプチダーゼに対して $\alpha$ -再標的化エンドペプチダーゼ抗体を作ることができるすべての生物は、限定するものではなく、トリ、さらにはマウス、ヒツジ、ロバ、ウシ、霊長類およびヒトを含めた哺乳動物を含んだ試

10

20

30

40

50

料の源となることができる。血液回収および血清調製物の特異的プロトコールの非限定的な例は Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, BLOOD COLLECTION IN HEALTH CARE (F. A. Davis Company, 2001); and Diana Garza & Kathleen Becan-McBride, PLEBOTOMY HANDBOOK: BLOOD COLLECTION ESSENTIALS (Prentice Hall, 6th ed., 2002) に記載されている。これらのプロトコールは当業者と本明細書中の教示の範囲内である慣用の手順である。試験試料は再標的化エンドペプチダーゼを投与する前、再標的化エンドペプチダーゼを単回投与後、再標的化エンドペプチダーゼを複数回投与後、再標的化エンドペプチダーゼ治療に対して耐性が出る前または再標的化エンドペプチダーゼ治療に対して耐性が出た後に生物から得ることができる。

10

## 【0166】

開示の態様は標準試料を一部提示する。本明細書で使用されるとき、用語「標準試料」は試験試料の有無が周知であり陰性対照試料と陽性対照試料の両方を含む任意の試料を意味する。中和 - 再標的化エンドペプチダーゼ抗体に関して、陰性対照試料は再標的化エンドペプチダーゼを一度も投与されることがない個体から取得することができる。かつ、限定するものではなく、再標的化エンドペプチダーゼ療法能の実施前であれば試験試料を提供している同一の個体からの試料、再標的化エンドペプチダーゼを一度も投与されることがない異なる個体からの試料、BONT/A を一度も投与されることがない複数の異なる個体からのプール試料を含んでもよい。中和 - 再標的化エンドペプチダーゼ抗体に関して、陽性対照試料は再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗性を呈する個体から取得することができる。かつ、限定するものではなく、患者に基づく試験アッセイで陽性であった個体、インビボバイオアッセイで陽性であった個体、ならびに再標的化エンドペプチダーゼをワクチン接種された個体などの過剰免疫を呈する個体を含める。

20

## 【0167】

さらに - 再標的化エンドペプチダーゼ抗体は試料から精製が可能であることが見通されます。限定するものではなく、蛋白質A/Gクロマトグラフィおよびアフィニティクロマトグラフィを含む種々の手順を用いて - 再標的化エンドペプチダーゼ抗体は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特異なプロトコールの非限定的な例は ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998); USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL NO. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998); and MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, supra, (2001) に記載されている。全内容が参照により本明細書に組み込まれる。加えて、抗体精製方法ならびに十分に特性が明らかでない試薬、条件、プロトコールの非限定的な例は、限定するものではなく、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; and Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA を含んだ販売業者から入手できる。これらのプロトコールは当業者が理解できる範囲内の慣用の手順である。

30

40

## 【0168】

従って、一実施形態では、試料は血液を含む。本実施形態の態様では、試料はマウスの血液、ラットの血液、ヤギの血液、ヒツジの血液、ウマの血液、口バの血液、霊長類の血液またはヒトの血液を含む。別の実施形態では、試料は血漿を含む。本実施形態の一態様では、試験試料はマウスの血漿、ラットの血漿、ヤギの血漿、ヒツジの血漿、ウマの血漿、口バの血漿、ウシの血漿、霊長類の血漿またはヒトの血漿を含む。別の実施形態では、

50

試料は血清を含む。本実施形態の一態様では、試験試料はマウスの血清、ラットの血清、ヤギの血清、ヒツジの血清、ウマの血清、ロバの血清、ウシの血清、霊長類の血清またはヒトの血清を含む。別の実施形態では、試料はリンパ液を含む。本実施形態の一態様では、試験試料はマウスのリンパ液、ラットのリンパ液、ヤギのリンパ液、ヒツジのリンパ液、ウマの血清、ロバのリンパ液、ウシのリンパ液、霊長類のリンパ液またはヒトのリンパ液を含む。更に別の実施形態では、試料は試験試料である。更に別の実施形態では、試料は標準試料である。本実施形態の態様では、標準試料は陰性対照試料または陽性対照試料である。

#### 【0169】

開示の態様は工程(d)で検出したBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25の量と工程(e)で検出したBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25の量を比較することを一部提示する。一実施形態では、試験試料中のSNAP-25切断産物の量は標準試料中のSNAP-25切断産物の量と比べて大きい。本実施形態の態様では、陽性対照試料とくらべて多量の標準試料中のSNAP-25切断産物は哺乳動物における再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗性の低減または欠如を示す。本実施形態の別の態様では、陰性対照試料と比べて試験試料中の等量のSNAP-25切断産物は哺乳動物における再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗性の低減または欠如を示す。別の実施形態では、試験試料中のSNAP-25切断産物の量は標準試料中のSNAP-25切断産物の量と比べて少量である。本実施形態の態様では、陽性対照試料と比べて試験試料中の少量または等量のSNAP-25切断産物は哺乳動物における再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗性の増大または存在を示す。本実施形態の別の態様では、陰性対照試料と比べた試験試料中の少量のSNAP-25切断産物は哺乳動物における再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗性の増大または存在を示す。

#### 【0170】

直線のおよび非直線のアッセイ条件などの試料中の中和 - 再標的化エンドペプチダーゼ抗体の存在を検出するのに好適な全てのアッセイ条件は、本明細書に開示した方法において有用であるように構成されたものである。一実施形態では、アッセイ条件は直線的である。本実施形態の態様では、再標的化エンドペプチダーゼのアッセイ量は超過である。本実施形態の別の態様では、再標的化エンドペプチダーゼのアッセイ量は律速である。本実施形態の別の態様では、試験試料のアッセイ量は律速である。

#### 【0171】

本開示の態様は以下のように記載することができる。

1. 以下を含む、再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する方法：a) 樹立した細胞株由来の細胞を再標的化エンドペプチダーゼを含む試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である、b) BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25切断産物を含むSNAP-25成分を処理された細胞から単離する工程、c) SNAP-25成分を - SNAP-25抗体に接触させる工程、ここで該 - SNAP-25抗体はSNAP-25切断産物からのBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、d) - SNAP-25抗体およびSNAP-25切断産物を含む抗体 - 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再標的化エンドペプチダーゼ活性を示す。

2. 以下を含む、再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する方法：a) 樹立した細胞株由来の細胞を再標的化エンドペプチダーゼを含む試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞は該再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である、b) BoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を有するSNAP-25切断産物を含むSNAP-25成分を、処理した細胞から単離する工程、c) SNAP-25成分を固相支持体に結合した - SNAP-25抗体に接触させる工程、ここで該 - SNAP-25抗体がSNAP-25切断産物からのBoNT

10

20

30

40

50

T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、d) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断産物を含む抗体 - 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が再標的化エンドペプチダーゼ活性を示す。

3. 以下を含む、再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する方法：a) 樹立した細胞株由来の細胞を再標的化エンドペプチダーゼを含む試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である、b) B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 切断産物を含む S N A P - 2 5 成分を処理された細胞から単離する工程、c) S N A P - 2 5 成分を固相支持体に固定化する工程、d) S N A P - 2 5 成分を - S N A P - 2 5 抗体に接触させる工程、ここで該 - S N A P - 2 5 抗体が S N A P - 2 5 切断産物からの B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、および e) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断産物を含む抗体 - 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が再標的化エンドペプチダーゼ活性を示す。

10

4. 以下を含む、再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する方法：a) 樹立した細胞株由来の細胞を再標的化エンドペプチダーゼを含む試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼを取り込むことができる、b) B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 切断産物を含む S N A P - 2 5 成分を処理された細胞から単離する工程、c) S N A P - 2 5 成分を - S N A P - 2 5 抗体に接触させる工程、ここで該 - S N A P - 2 5 抗体が S N A P - 2 5 切断産物からの B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、および d) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断産物を含む抗体 - 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が再標的化エンドペプチダーゼ活性を示す。

20

5. 以下を含む、再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する方法：a) 樹立した細胞株由来の細胞を再標的化エンドペプチダーゼを含む試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼを取り込むことができる、b) B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 切断産物を含む S N A P - 2 5 成分を処理した細胞から単離する工程、c) S N A P - 2 5 成分を固相支持体に結合した - S N A P - 2 5 抗体に接触させる工程、ここで該 - S N A P - 2 5 抗体が S N A P - 2 5 切断産物からの B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、および d) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断産物を含む抗体 - 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が再標的化エンドペプチダーゼ活性を示す。

30

6. 以下を含む、再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する方法：a) 樹立した細胞株由来の細胞を再標的化エンドペプチダーゼを含む試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼを取り込むことができる、b) B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 切断産物を含む S N A P - 2 5 成分を処理された細胞から単離する工程、c) S N A P - 2 5 成分を固相支持体に固定化する工程、d) S N A P - 2 5 成分を - S N A P - 2 5 抗体に接触させる工程、ここで該 - S N A P - 2 5 抗体が S N A P - 2 5 切断産物からの B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、および e) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断産物を含む抗体 - 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が再標的化エンドペプチダーゼ活性を示す、を含む。

40

7. 以下を含む、哺乳動物の再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗を測定する方法：a) - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の有無について試験をした哺乳動物から取得した試験試料に再標的化エンドペプチダーゼを添加する工程、b) 樹立した細胞株由来の細胞を試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダ

50

ーゼ活性に感受性である、c) B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 切断産物を含む S N A P - 2 5 成分を処理された細胞から単離する工程、d) S N A P - 2 5 成分を - S N A P - 2 5 抗体に接触させる工程、ここで該 - S N A P - 2 5 抗体が S N A P - 2 5 切断産物からの B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、e) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断産物を含む抗体 - 抗原複合体の存在を検出する工程、f) 試験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b - e を繰り返す工程、該陰性対照試料は再標的化エンドペプチダーゼおよび - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体を含まないことが公知である血清を含む、および g) 工程 f で検出した抗体 - 抗原複合体の量を工程 e で検出した抗体 - 抗原複合体の量と比較する工程、ここで該工程 f において検出した抗体 - 抗原複合体の量と比べて工程 e で検出した少量の抗体 - 抗原複合体の検出は - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の存在を示す。

10

8. 以下を含む、哺乳動物の再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗を測定する方法：a) - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の有無について試験をした哺乳動物から取得した試験試料に再標的化エンドペプチダーゼを添加する工程、b) 樹立した細胞株由来の細胞を試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である、c) B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 切断産物を含む S N A P - 2 5 成分を処理された細胞から単離する工程、d) S N A P - 2 5 成分を固相支持体に結合した - S N A P - 2 5 抗体に接触させる工程、ここで該 - S N A P - 2 5 抗体が S N A P - 2 5 切断産物からの B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、e) - 再標的化エンドペプチダーゼ抗体および S N A P - 2 5 切断産物を含む抗体 - 抗原複合体の存在を検出する工程、f) 試験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b - e を繰り返す工程、該陰性対照試料は再標的化エンドペプチダーゼおよび - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体を含まないことが公知である血清を含む、および g) 工程 f で検出した抗体 - 抗原複合体の量を工程 e で検出した抗体 - 抗原複合体の量と比較する工程、ここで該工程 f で検出した抗体 - 抗原複合体の量と比べて工程 e で検出した少量の抗体 - 抗原複合体は - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の存在を示す。

20

9. 以下を含む、哺乳動物の再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗を測定する方法：a) - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の有無につて試験をした哺乳動物から取得した試験試料に再標的化エンドペプチダーゼを添加する工程、b) 樹立した細胞株由来の細胞を試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞は再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である、c) B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する S N A P - 2 5 切断産物を含む S N A P - 2 5 成分を処理された細胞から単離する工程、d) S N A P - 2 5 成分を固相支持体に固定化する工程、e) S N A P - 2 5 成分を - S N A P - 2 5 抗体に接触させる工程、ここで該 - S N A P - 2 5 抗体が S N A P - 2 5 切断産物からの B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、f) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断産物を含む抗体 - 抗原複合体の存在を検出する工程、g) 試験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b - f を繰り返す工程、該陰性対照試料は、再標的化エンドペプチダーゼおよび - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体を含まないことが公知である血清を含む、および h) 工程 g で検出した抗体 - 抗原複合体の量を工程 f で検出した抗体 - 抗原複合体の量と比較する工程、ここで該工程 g で検出した抗体 - 抗原複合体の量と比べて工程 f で検出した少量の抗体 - 抗原複合体の検出は - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の存在を示す。

30

40

10. 以下を含む、哺乳動物の再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗を測定する方法：a) - 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の有無について試験をした哺乳動物から取得した試験試料に再標的化エンドペプチダーゼを添加する工程、b) 樹立した細胞株由来の細胞を試験試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞が再標的化エンドペプチダーゼを取り込むことができる、c) B o N T / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残

50

基でカルボキシ末端を有する SNAP - 25 切断産物を含む SNAP - 25 成分を処理された細胞から単離する工程、 d ) SNAP - 25 成分を SNAP - 25 抗体に接触させる工程、ここで該 SNAP - 25 抗体が SNAP - 25 切断産物からの BoNT / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、 e ) SNAP - 25 抗体および SNAP - 25 切断産物を含む抗体 - 抗原複合体の存在を検出する工程、 f ) 試験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b - e を繰り返す工程、該陰性対照試料は再標的化エンドペプチダーゼおよび再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体を包含しないことが公知である血清を含む、および g ) 工程 f で検出した抗体 - 抗原複合体の量を工程 e で検出した抗体 - 抗原複合体の量と比較する工程、ここで該工程 f で検出した抗体 - 抗原複合体の量と比べて工程 e で検出した少量の抗体 - 抗原複合体の検出は再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の存在を示す。

10

11. 以下を含む、哺乳動物の再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗を測定する方法： a ) 抗体を中和する再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の有無を試験する哺乳動物から得た再標的化エンドペプチダーゼを試験試料に添加する工程、 b ) 樹立した細胞株由来の細胞を試験試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞が再標的化エンドペプチダーゼを取り込むことができる、 c ) BoNT / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する SNAP - 25 切断産物を含む SNAP - 25 成分を処理された細胞から単離する工程、 d ) SNAP - 25 成分を固相支持体に結合した SNAP - 25 抗体に接触させる工程、ここで該 SNAP - 25 抗体が SNAP - 25 切断産物からの BoNT / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、 e ) SNAP - 25 抗体および SNAP - 25 切断産物を含む抗体 - 抗原複合体の存在を検出する工程、 f ) 試験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b - e を繰り返す工程、ここで該陰性対照試料は再標的化エンドペプチダーゼおよび再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体を包含しないことが公知である血清を含む、および g ) 工程 f で検出した抗体 - 抗原複合体の量を工程 e で検出した抗体 - 抗原複合体の量と比較する工程、ここで該工程 f で検出した抗体 - 抗原複合体の量と比べて工程 e で検出した少量の抗体 - 抗原複合体の検出は再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の存在を示す。

20

12. 以下を含む、哺乳動物の再標的化エンドペプチダーゼ免疫抵抗を測定する方法： a ) 再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の有無について試験をした哺乳動物から取得した試験試料に再標的化エンドペプチダーゼを添加する工程、 b ) 樹立した細胞株由来の細胞を試験試料で処理する工程、ここで該樹立した細胞株由来の細胞が再標的化エンドペプチダーゼを取り込むことができる、 c ) BoNT / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を有する SNAP - 25 切断産物を含む SNAP - 25 成分を処理された細胞から単離する工程、 d ) SNAP - 25 成分を固相支持体に固定化する工程、 e ) SNAP - 25 成分を SNAP - 25 抗体に接触させる工程、ここで該 SNAP - 25 抗体が SNAP - 25 切断産物からの BoNT / A 切断部位の切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、 f ) SNAP - 25 抗体および SNAP - 25 切断産物を含む抗体 - 抗原複合体の存在を検出する工程、 g ) 試験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b - f を繰り返す工程、ここで該陰性対照試料は再標的化エンドペプチダーゼおよび再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体を包含しないことが公知である血清を含む、および h ) 工程 g で検出した抗体 - 抗原複合体の量を工程 f で検出した抗体 - 抗原複合体の量と比較する工程、ここで該工程 g で検出した抗体 - 抗原複合体の量と比べて工程 f で検出した少量の抗体 - 抗原複合体の検出は再標的化エンドペプチダーゼ中和抗体の存在を示す。

30

40

13. 細胞が約 500 nM 以下、約 400 nM 以下、約 300 nM 以下、約 200 nM 以下、約 100 nM 以下の再標的化エンドペプチダーゼによる再標的化エンドペプチダーゼ活性に感受性である、1 ~ 3 および 7 ~ 9 の方法。

14. 細胞が約 500 nM 以下、約 400 nM 以下、約 300 nM 以下、約 200 nM 以下、約 100 nM 以下の再標的化エンドペプチダーゼを取り込むことができる、4 ~ 6 お

50

よび10～12の方法。

15．試料が約100ng以下、約10ng以下、約1ng以下、100fg以下、10fg以下、または1fg以下の再標的化エンドペプチダーゼを含む、1-6の方法。

16．試料が約100nM以下、約10nM以下、約1nM以下、約100nM以下、約10nM以下、約1nM以下、約0.5nM以下、または約0.1nM以下の再標的化エンドペプチダーゼを含む、1～6の方法。

17．抗体-抗原複合体の存在がイムノプロット分析、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、1-12の方法。

18．本方法の下漸近線におけるシグナル対ノイズ比が少なくとも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である、1～12の方法。

19．本方法の上漸近線におけるシグナル対ノイズ比が少なくとも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である、1～12の方法。

20．本方法が少なくとも100ng、少なくとも50ng、少なくとも10ng、少なくとも5ng、少なくとも100pg、少なくとも50pg、少なくとも10pg、少なくとも5pg、少なくとも100fg、少なくとも50fg、少なくとも10fg、または少なくとも5fgの再標的化エンドペプチダーゼのEC<sub>50</sub>活性を検出できる、1～12の方法。

21．本方法は少なくとも10nM、少なくとも5nM、少なくとも100nM、少なくとも50nM、少なくとも10nM、少なくとも5nM、少なくとも1nM、少なくとも0.5nMまたは少なくとも0.1nMの再標的化エンドペプチダーゼのEC<sub>50</sub>活性を検出できる方法であり、1～12の方法。

22．本方法は10pg以下、9pg以下、8pg以下、7pg以下、6pg以下、5pg以下、4pg以下、3pg以下、2pg以下、1pg以下の再標的化エンドペプチダーゼのLODを有する、1～12の方法。

23．本方法は100nM以下、90nM以下、80nM以下、70nM以下、60nM以下、50nM以下、40nM以下、30nM以下、20nM以下または10nM以下の再標的化エンドペプチダーゼのLODを有する、1～12の方法。

24．本方法は10pg以下、9pg以下、8pg以下、7pg以下、6pg以下、5pg以下、4pg以下、3pg以下、2pg以下、1pg以下の再標的化エンドペプチダーゼのLOQを有する、1～12の方法。

25．本方法は100nM以下、90nM以下、80nM以下、70nM以下、60nM以下、50nM以下、40nM以下、30nM以下、20nM以下、または10nM以下の再標的化エンドペプチダーゼのLOQを有する、1～12の方法。

26．本方法は完全に活性な再標的化エンドペプチダーゼAの70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下または10%以下の活性を有する部分的に活性な再標的化エンドペプチダーゼから完全に活性な再標的化エンドペプチダーゼを識別できる、1～12の方法。

27．-SNAP-25抗体がSNAP-25切断産物からのBoNT/A切断部位の切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシ末端を含むエピトープを結合する、1～12の方法。

28．-SNAP-25抗体が1 × 10<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>以下であるSNAP-25切断製品からのBoNT/A切断部位の切断可能結合のカルボキシ末端グルタミンを含まないエピトープの会合速度定数を有し、かつ、-SNAP-25抗体が0.450nM以下であるエピトープの平衡解離定数を有する、27の方法。

29．単離した-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を包含する基から選択されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、さらには配列番号84、配列番号86、配列番号88、配列番号90および配

10

20

30

40

50

列番号 92 包含する基から選択されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、27の方法。

30. 単離した - 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 を含む、27の方法。

32. 単離した - 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 を含む、27の方法。

33. 単離した - 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 を含む、27の方法。

34. 単離した - 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 を含む、27の方法。

35. 単離した - 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 を含む、27の方法。

36. 単離した - 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 を含む、27の方法。

37. 単離した - SNAP - 25 抗体が配列番号 93、配列番号 121 および配列番号 100 を含む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 を含む軽鎖可変領域を含む、27の方法。

38. 単離した - 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 エピトープを選択的に結合する、27の方法。

39. 単離した - 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 エピトープを選択的に結合する、27の方法。

#### 【実施例】

##### 【0172】

実施例 I 内因性再標的化再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する候補細胞株のスクリーニング

以下の実施例は、細胞を用いた効力アッセイの作成に必要とされる、再標的化エンドペプチダーゼの取り込み能力を有する確立された細胞株をどのように同定したかを説明する。

##### 【0173】

1. 候補細胞株のストック培養の成長。

細胞株を生育させるために、試験する細胞株由来の好適な密度の細胞を 30 mL の好適な成長培地（表 1 を参照）を入れた 162 cm<sup>2</sup> の組織培養フラスコにプレATING、37 のインキュベーター中、5% 又は 10% 二酸化炭素存在下で細胞が所望の密度に達するまで生育させた。

10

20

30

40

【表 1】

表1 細胞株のスクリーニングに用いた培地	
細胞株	血清成長培地組成
SiMa及び SiMaクローン	RPMI 1640、10% ウシ胎仔血清、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、2mM L-グルタミン
PC12	RPMI 1640、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-ストレプトマイシン
N18 ND8/34 NG108-15	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
SK-N-DZ SK-N-F1 SK-N-SH	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 <sub>3</sub>
BE(2)-C 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
ND3, ND7 ND15	2mM グルタミンを含むDMEM培地(Invitrogen, カタログ番号11885)、10% ウシ胎仔血清(Invitrogen, カタログ番号16140)、1x抗生物質/抗真菌薬
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 <sub>3</sub> 、1mM ピルビン酸ナトリウム

10

20

## 【0174】

2. 細胞表面に標的受容体を発現する細胞のスクリーニング。

フローサイトメトリー及び/又はリガンド結合アッセイを用い、所望の標的受容体の存在について細胞株をスクリーニングした。下記の実施例においては原形質膜におけるオピオイド又はオピオイド様受容体を同定するための試薬を用いたが、開示した方法は、い

30

## 【0175】

a. フローサイトメトリーを用いた細胞株の同定。

細胞表面において再標的化エンドペプチダーゼに対する標的受容体を発現する確立された細胞株を構成する細胞を同定するために、フローサイトメトリー解析を行った。それぞれの候補細胞株の細胞をセクション1に記載した通りに生育させ、トリプシンで処理し、1xPBS、0.5% BSAを含む染色バッファー中で洗浄し、1200rpmで3分間遠心分離した。沈殿した細胞を染色バッファー中に再懸濁し、約 $2.0 \times 10^6$ 個の細胞を、試験するそれぞれの受容体用の2本の新しいチューブに移した。オピオイド又はオピオイド様受容体の存在をスクリーニングするために、約2.0~5.0 $\mu$ Lの -ORL-1 RA14133(Neuromics, Edina, MN)、 -DORウサギポリクローナル抗体RA10101(Neuromics, Edina, MN)、 -KORウサギポリクローナル抗体RA10103(Neuromics, Edina, MN)、又は -MORウサギポリクローナル抗体RA10104(Neuromics, Edina, MN)を1本のチューブに加え、その混合液を4 で1時間インキュベートした。2本目のチューブにはいずれの抗体も加えずに4 で1時間インキュベートし、陰性対照とした。抗体をインキュベートした後、1.0mLの染色バッファーをそれぞれのチューブに加え、1200rpmで3分間遠心分離した。細胞沈殿物を1.0mLの染色バッファーでもう一度洗浄した。細胞沈殿物を200 $\mu$ Lの染色バッファーに再懸濁し、2

40

50

．0 μLのヤギ抗ウサギIgG FITC抗体をそれぞれのチューブに加え、4 で1時間、暗所にてインキュベートした。二次抗体とインキュベートした後、1.0 mLの染色バッファーをそれぞれのチューブに加え、1200 rpmで3分間遠心分離した。細胞沈殿物を1.0 mLの染色バッファーでもう一度洗浄し、沈殿物を500 μLの染色バッファー中に再懸濁した。フローサイトメーターを用いて試料を解析し、ウサギIgG FITC染色の上に抗受容体抗体染色を重ねたものをデータとして表示させた。

【0176】

結果は、試験した細胞株のうち、SiMa、SiMa P>33、クローン H10、ND7、及びSK-N-DZ確立された細胞株を構成する細胞の約50%の細胞表面でORL-1が発現し；SH-SY5Y及びND15確立された細胞株を構成する細胞の約25%～約50%の細胞表面でORL-1が発現し；及びND3、ND8、N18、及びNeuro-2a確立された細胞株を構成する細胞の約25%未満の細胞表面でORL-1が発現したことを示す（表2）。結果は、SH-SY5Y及びND7確立された細胞株を構成する細胞の約50%の細胞表面でKORが発現し；SiMa クローン H10、SiMa P>33、ND15、及びNeuro-2a確立された細胞株を構成する細胞の約25%～約50%の細胞表面でKORが発現し；及びND3、ND8、及びN18確立された細胞株を構成する細胞の約25%未満の細胞表面で発現したことをもまた示す（表2）。結果は、ND7、ND15、及びSiMa P>33確立された細胞株を構成する細胞の約50%の細胞表面でMORが発現し；SH-SY5Y、SiMa クローン H10、ND8、及びNeuro-2a確立された細胞株を構成する細胞の約25%～約50%の細胞表面で発現し；並びにND3及びN18確立された細胞株を構成する細胞の約25%未満の細胞表面でMORが発現したことをもまた明らかにした（表2）。-DORウサギポリクローナル抗体RA10101は正確に機能しなかったため、使用可能なデータが生成されなかった。

【0177】

b. リガンド結合を用いた細胞株の同定。

細胞表面に再標的化エンドペプチダーゼに対する標的受容体を発現する確立された細胞株を構成する細胞を同定するために、リガンド結合解析を行った。結合を促進するために、試験する候補細胞株由来の細胞を黒色-透明底型96ウェルプレート上に約4時間播種した。オピオイド又はオピオイド様受容体の存在をスクリーニングするために、その後それぞれのウェルから培地を吸引し、0（未処理対照）、0.001 nM、0.01 nM、0.1 nM、又は1 nMいずれかのFAM-ノシセプチン（Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA）；又は0（未処理対照）、0.001 nM、0.01 nM、0.1 nM、又は1 nMいずれかのFAM-ダイノルフィンA（Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA）を含む50 μLのリガンド溶液で置換した。細胞をリガンド溶液と共に、37 インキュベーター中、5%二酸化炭素存在下で1時間インキュベートした。結合しなかったリガンドを除去するために、100 μLの1xPBSを用いて細胞を3回洗うことによって細胞を洗浄した。プレートをTyphoon（Ex488及びEm520nm）でスキャンし、その後RFUシグナルをM5プレートリーダー（Ex495及びEm520nm）で測定した。結果は、SiMa クローン H10、SH-SY5Y、及びSK-N-DZ確立された細胞株を構成する細胞はノシセプチンと結合し、SiMa クローン H10を構成する細胞はダイノルフィンともまた結合することを示す（表2）。

【表 2】

表 2 細胞表面に標的受容体を発現する細胞株					
標的受容体	同定した細胞株				
	フローサイトメトリー			リガンド結合	
	50%を超える発現	25%~50%の発現	50%未満の発現	ノシセプチン	ダイノルフィンA
ORL-1	AGN P 33、SiMa a、SiMa クローンH 10、ND 7、SK-N-DZ	SH-SY 5Y、ND 15	ND 3、ND 8、N18、Neuro-2a	SiMa クローンH 10、SH-SY 5Y、SK-N-DZ	—
DOR	ND	ND	ND	ND	ND
KOR	SH-SY 5Y、ND 7	SiMa クローンH 10、AGN P 33、ND 15、Neuro-2a	ND 3、ND 8、N18	—	SiMa クローンH 10
MOR	ND 7、ND 15、AGN P 33	SH-SY 5Y、SiMa クローンH 10、ND 8、Neuro-2a	ND 3、N 18	ND	ND

10

20

## 【0178】

同様の方法を用い、その他の再標的化エンドペプチダーゼに対する関連する受容体を有する細胞を含む細胞株を、これらエンドペプチダーゼへの標的ドメインのFAM標識及び上述したような細胞株のスクリーニングによって同定することができる。

30

## 【0179】

3. 再標的化エンドペプチダーゼ分子を用いた候補細胞株の単回投与スクリーニング。

細胞株が適切な再標的化エンドペプチダーゼ分子を取り込むことができるかどうかを決定するために、試験する細胞株のストック培養由来の好適な密度の細胞を1mLの適切な血清成長培地(表1)を入れた24ウェル組織培養プレートのウェルにプレATINGした。37のインキュベーター中、5%二酸化炭素存在下で細胞が所望の密度に達するまで細胞を生育させた(およそ18~24時間)。オピオイド再標的化エンドペプチダーゼの取り込みを評価するために、成長培地をそれぞれのウェルから吸引し、1)オピオイド再標的化エンドペプチダーゼを含まない新しい成長培地(未処理細胞株)又は2)30nMのノシセプチン再標的化エンドペプチダーゼ(Noc/A)又は100nMのダイノルフィン再標的化エンドペプチダーゼ(Dyn/A)(処理細胞株)を含む新しい成長培地のいずれかで置換した。一晩インキュベートした後、成長培地を吸引し、200µLの1xPBSでそれぞれのウェルをリンスすることによって細胞を洗浄した。細胞を回収するために、1xPBSを吸引し、50µLの2xSDSローディングバッファーを加えることによって細胞を溶解し、溶解物を清潔なテストチューブに移し、試料を95℃まで5分間加熱した。

40

## 【0180】

開裂していないSNAP-25基質及び開裂したSNAP-25産物両方の存在を検出

50

するために、それぞれの回収した試料の一部をウエスタンブロットによって解析した。この解析においては、12  $\mu$ Lの回収した試料を変性、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）を用いて、MOPSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。分離したタンパク質を、TRANS-BLOT（登録商標）SDセミドライ電気泳動トランスファーセル装置（Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA）を用いたウエスタンブロットにより、ゲルからポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜（Invitrogen Inc.、Carlsbad、CA）上に移した。トリス緩衝食塩水（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）

10、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（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）、2% ウシ血清アルブミン（BSA）、5% 脱脂粉乳を含む溶液中、室温で2時間インキュベートすることによりPVDF膜をブロックした。ブロックした膜を、1）1：5,000希釈した SNAP-25マウスモノクローナル抗体（SMI-81；Sternberger monoclonals Inc.、Lutherville、MD）；又は2）1：5,000希釈したS9684 SNAP-25ウサギポリクローナル抗血清（Sigma、St. Louis、MO）のいずれかを一次抗体として含む、TBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）、2% BSA、及び5% 脱脂粉乳中、4

20で一晚インキュベートした。それぞれの細胞株における全SNAP-25発現と、再標的化エンドペプチダーゼの取り込み量を評価するための指標として再標的化エンドペプチダーゼ処理後のSNAP-25開裂のパーセンテージを評価することを可能にすることにより、SNAP-25マウスモノクローナル及びウサギポリクローナル抗体の両方は、開裂していないSNAP-25基質及びSNAP-25開裂産物の両方を検出することができる。一次抗体でプロービングしたブロットをTBS、TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）中で3回、それぞれの回につき15分間洗浄した。洗浄した膜を、1）1：10,000希釈した、西洋ワサビペルオキシダーゼ（Zymed、South San Francisco、CA）に結合したヤギポリクローナル抗マウス免疫グロブリンG、重鎖及び軽鎖（IgG、H+L）抗体；

30又は2）1：10,000希釈した、西洋ワサビペルオキシダーゼ（Zymed、South San Francisco、CA）に結合したヤギポリクローナル抗ウサギ免疫グロブリンG、重鎖及び軽鎖（IgG、H+L）抗体のいずれかを二次抗体として含むTBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）、2% BSA、及び5% 脱脂粉乳中、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したブロットをTBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）中で3回、それぞれの回につき15分間洗浄した。ECL Plus（商標）ウエスタンブロット検出システム（GE Healthcare、Amersham Biosciences、Piscataway、NJ）を用いて標識したSNAP-25産物のシグ

40ナル検出を可視化し、膜を画像化して開裂したSNAP-25産物のパーセンテージをTyphoon 9410 Variable Mode Imager及びImager Analysis software（GE Healthcare、Amersham Biosciences、Piscataway、NJ）を用いて定量した。ピクセルサイズを選択（100～200ピクセル）及びPMT電圧設定（350～600、通常は400）は、それぞれのブロットに依存する。

#### 【0181】

SNAP-25開裂産物の検出に基づき、BE（2）-C、N18TG2、Neuro-2a、SiMa、SK-N-BE（2）-C、及びSK-N-DZの細胞株が30 nM Noc/Aの取り込みを示し（表3）；一方、N18TG2、Neuro-2a、PC

10

20

30

40

50

12、及びSiMa細胞株が100nM Dyn/Aの取り込みを示した。これらのうちいくつかの感受性細胞株をより低容量の化合物及び/又は完全用量反応を用いて試験した。

【表3】

細胞株	説明	由来	30nM Noc/A 取り込み	100nM Dyn/A 取り込み
BE(2)-C	ヒト神経芽腫	ATCC CRL-2268	有	NT
N18TG2	マウス神経芽腫	DSMZ ACC 103	有	有
ND3	マウス神経芽腫と ラット初代新生児DRGの雑種	ECACC 92090901	NDA	NDA
ND7/23	マウス神経芽腫と ラット初代DRGの雑種	ECACC 92090903	無	無
ND8	マウス神経芽腫と ラット初代DRGの雑種	ECACC 92090904	NDA	NDA
ND15	マウス神経芽腫と ラット初代新生児DRGの雑種	ECACC 92090907	無	無
Neuro-2a	マウス神経芽腫	ATCC CCL-131	有	有
NG108-15	マウス神経芽腫とラット神経膠腫の雑種	ECACC 88112302	無	NT
PC12	ラット褐色細胞腫	ATCC CRL-1721	NT	有
SH-SY5Y	ヒト神経芽腫	ATCC CRL-2266	無	NT
SiMa	ヒト神経芽腫	DSMZ ACC 164	有	有
SK-N-BE(2)-C	ヒト神経芽腫	ATCC CRL-2271	有	NT
SK-N-DZ	ヒト神経芽腫	ATCC CRL-2149	有	NT
SK-N-F1	ヒト神経芽腫	ATCC CRL-2142	無	NT
SK-N-SH	ヒト神経芽腫	ECACC 86012802	無	NT

NT：未試験  
NDA：この細胞株においては検出可能な量のSNAP-25は検出されなかった

## 【0182】

同様の方法を用い、その他の再標的化エンドペプチダーゼに対する関連する受容体を有する細胞を含む細胞株の、再標的化エンドペプチダーゼの取り込みを評価することができる。

## 【0183】

実施例II 内因性再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する候補クローン細胞株のスクリーニング

1. 親SiMa細胞株からの、候補クローン細胞株の単回投与再標的化エンドペプチダーゼスクリーニング。

関連特許出願であるZhu Hong et al., Cell Lines Useful in Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays (米国特許出願第61/160,199号)は、Ester Fernandez-Salas, et al., Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays (米国特許出願第12/403,531号)に記載されたようなBoNT/A効力アッセイにおいて有用な、親SiMa細胞株由来のクローン細胞株を開示し、それぞれの特許は引用することによりその全文が本明細書に組み入れられる。これらクローン細胞株が適切な再標的化エンドペプチダーゼを取り込むことができるかどうかを決定するために、ECLサンドイッチELISAアッセイを用いてそれぞれをスクリーニングした。

## 【0184】

再標的化エンドペプチダーゼで処理した溶解物を調製するために、試験する細胞株のス

トック培養由来の好適な密度の細胞を100 $\mu$ Lの適切な血清成長培地(表1)を入れた96ウェル組織培養プレートのウェルに一晩プレティングした。播種した細胞からの培地をそれぞれのウェルから吸引し、30nMのNo c / A再標的化エンドペプチダーゼ又は80nMのD y n / A再標的化エンドペプチダーゼのいずれかを含む新しい培地で置換した。24時間インキュベートした後、成長培地を吸引し、200 $\mu$ Lの1xPBSでそれぞれのウェルをリンスすることによって細胞を洗浄した。細胞を回収するために、1xPBSを吸引し、20mM Tr i s - H C l (pH7.5)、150mM Na C l、1mM E D T A、1mM E G T A、1% T r i t o n X - 100を含む30 $\mu$ Lのリシスバッファーをそれぞれのウェルに加えることによって細胞を溶解し、プレートを、500rpmで回転している振とう機上、4で30分間インキュベートした。細胞残渣を沈殿させるためにプレートを4000rpm、20分間、4で遠心分離し、検出工程を行うために上清を補足抗体をコーティングした96ウェルプレートに移した。

10

## 【0185】

- S N A P - 2 5 <sub>197</sub> 補足抗体溶液を調製するために、ハイブリドーマ細胞株2E2A6由来の腹水に含まれる - S N A P - 2 5 <sub>197</sub> マウスモノクローナル抗体(実施例XI)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。

## 【0186】

- S N A P - 2 5 検出抗体溶液を調製するために、- S N A P - 2 5 ウサギポリクローナル抗体S9684(Sigma, St. Louis, MO)を製造業者による説明書に従って(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)、ルテニウム(11)-トリス-ピピリジン-(4-メチルスルホン酸)NHSエステル標識試薬(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)に結合させた。MSD S U L F O - T A G (商標)ストック溶液を再構成した蒸留水30 $\mu$ Lを200 $\mu$ Lの2mg/mL - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体に加え、反応液を室温で2時間、暗所にてインキュベートすることにより、結合反応を行った。標識した抗体を標準的なスピンカラムプロトコルを用いて精製し、標準的な比色タンパク質アッセイを用いてタンパク質の濃度を決定した。1リットル当たりのモル濃度を決定するために、- S N A P - 2 5 抗体/MSD S U L F O - T A G (商標)結合体の吸光度を、分光光度計を用いて455nmで測定した。検出抗体溶液を使用まで4で保存した。使用しない一部を20で長期間保存した。

20

30

## 【0187】

- S N A P - 2 5 <sub>197</sub> 補足抗体を含む - S N A P - 2 5 固相担体を調製するために、およそ5 $\mu$ Lの適切な - S N A P - 2 5 <sub>197</sub> モノクローナル抗体溶液(1xPBS中に20 $\mu$ g/mL)を、96ウェルMSD High Bind プレートのそれぞれのウェルに添加し、溶液中の液体を蒸発させるために、生物学的に安全なキャビネット中で2~3時間風乾させた。ブロッキングしたプレートを密閉し、使用まで4で保存した。

## 【0188】

開裂したS N A P - 2 5 産物の存在をE C L サンドイッチE L I S Aを用いて検出するために、次に、2% A m e r s h a m ブロッキング試薬(G E L i f e S c i e n c e s, P i s c a t a w a y, N J)及び10% ヤギ血清(VWR, West Chester, PA)を含む150 $\mu$ Lのブロッキングバッファーを室温で2時間添加することにより、補足抗体が結合したウェルをブロッキングした。ブロッキングバッファーを吸引し、再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞由来の溶解物25 $\mu$ Lをそれぞれのウェルに加え、プレートを4で一晩インキュベートした。細胞溶解物を吸引し、200 $\mu$ L 1xPBS、0.1% T W E E N - 2 0 (登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンラウリン酸モノエステル)でそれぞれのウェルを3回リンスすることにより、プレートウェルを洗浄した。洗浄した後、1xPBS、0.1% T W E E N - 2 0 (登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンラウリン酸モノエステル)に溶解した2% A m e r s h a m ブロッキング試薬を含む25 $\mu$ Lの5 $\mu$ g/mL - S N

40

50

AP-25 検出抗体溶液をそれぞれのウェルに加え、密閉し、振とうさせながら、室温で1時間インキュベートした。 - SNAP-25 検出抗体をインキュベートした後、200  $\mu$ L 1xPBS、0.1%TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンラウリン酸モノエステル)でウェルを3回洗浄した。洗浄した後、150  $\mu$ Lの1xリードバッファー(Meso Scale Discovery、Gaithersburg、MD)をそれぞれのウェルに加え、SECTOR (商標) Imager 6000 Image Reader (Meso Scale Discovery、Gaithersburg、MD)を用いてプレートを測定した。生データをECL imagerを用いて回収した。

【0189】

結果は、親SiMa細胞株並びにクローン細胞株H10が、Noc/A再標的化エンドペプチダーゼの良い取り込みを示す(表4)。加えて、これらの結果は、多くの細胞株がDyn/A再標的化エンドペプチダーゼの取り込みを示したことを明らかにする(表4)。3つのクローン細胞株(1E11、AF4、及びDC4)はDyn/A再標的化エンドペプチダーゼのよい取り込みを示し; 11のクローン細胞株(1E3、2D2、2D6、3D8、5C10、5F3、BB10、BF8、CG8、CG10、及びDE7)は中程度のDyn/A再標的化エンドペプチダーゼの取り込みを示し; 並びに(3B8、2B9、CE6、YB8、4C8、2F5、AC9、CD6、DD10、YF5)は、最小のDyn/A再標的化エンドペプチダーゼの取り込みを示した。これらのうちいくつかの候補細胞株を、対応する再標的化エンドペプチダーゼを用いた完全用量反応において試験した。

【表4-1】

表4 再標的化Noc/A及びDyn/Aを用いた候補細胞株の単回投与スクリーニング		
細胞株	30nM Noc/A取り込み	80nM Dyn/A取り込み
AGN P33	+++	NT
A10	-	NT
D11	--	NT

10

20

30

【表 4 - 2】

表 4 再標的化Noc/A及びDyn/Aを用いた候補細胞株の単回投与スクリーニング		
細胞株	30nM Noc/A取り込み	80nM Dyn/A取り込み
H1	-	-
H10	+++	-
1D4	NT	-
2E4	NT	-
3D5	NT	-
3G10	NT	-
4D3	NT	-
BB3	NT	-
CC11	NT	-
DF5	NT	-
YB7	NT	-
BE3	NT	-
4B5	NT	-
2B9	NT	+
2F5	NT	+
3B8	NT	+
4C8	NT	+
AC9	NT	+
CD6	NT	+
CE6	NT	+
DD10	NT	+
YB8	NT	+
YF5	NT	+
1E3	NT	++
2D2	NT	++
2D6	NT	++
3D8	NT	++
5C10	NT	++
5F3	NT	++
BF8	NT	++
BB10	NT	++
CG8	NT	++
CG10	NT	++
DE7	NT	++
1E11	NT	+++
AF4	NT	+++
DC4	NT	+++

10

20

30

40

【表4 - 3】

表4 再標的化Noc/A及びDyn/Aを用いた候補細胞株の単回投与スクリーニング		
細胞株	30 nM Noc/A取り込み	80 nM Dyn/A取り込み
NT: 未試験		
-: 取り込み無し、+: 最低限の取り込み、++: 中程度の取り込み、+++: 良い取り込み		

## 【0190】

## 2. 候補細胞株の完全用量反応スクリーニング。

上記で同定した確立された細胞株を続いて、適切な再標的化エンドペプチダーゼの完全用量反応を用いて評価した。異なる細胞株由来の細胞を96ウェルプレートにプレATINGし、様々な濃度のNoc/A(0、0.14 nM、0.4 nM、1.23 nM、3.7 nM、11.1 nM、33.3 nM、及び100 nM)又はDyn/A(0.017 nM、0.05 nM、0.15 nM、0.45 nM、1.4 nM、4.1 nM、12 nM、37 nM、111 nM、333 nM、及び1000 nM)に24時間曝露した。再標的化エンドペプチダーゼを含む培地をその後除去し、新しい完全培地で置換した。SNAP-25を開裂させるために、プレートをさらに24時間、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下でインキュベートした。細胞をリシスバッファー中で溶解し(表5)、残渣を除去するためにプレートを遠心分離した。溶解物をウエスタンブロットアッセイ又はサンドイッチELISAのいずれかに用いた。

## 【0191】

ウエスタンブロット解析では、完全なSNAP-25及びSNAP-25開裂産物の両方の存在について、実施例Iに記載したように試料を解析した。

## 【0192】

サンドイッチELISA用には、2E2A6モノクローナル抗体でコーティングしたELISAプレートを、150 µLのブロッキングバッファー中、室温で2時間、ブロッキングした。ブロッキングバッファーを除去した後、25 µLの細胞溶解物をそれぞれのウェルに加え、プレートを4℃で2時間インキュベートした。PBS-Tでプレートを3回洗浄し、ウェルの底部の隅に、PBS-T中の2%ブロッキング試薬に5 µg/mLの濃度で溶解したSULFO-TAG NHS-エステル標識検出抗SNAP25 pAb抗体25 µLを加えた。プレートを密閉し、室温で1時間振とうさせ、その後PBS-Tを用いて3回洗浄した。洗浄が完了した後、1つのウェル当たり150 µLの1xリードバッファーを加え、試験した細胞株それぞれの感受性を決定するためにSI6000 Image readerを用いてプレートを測定し、それぞれの細胞株のEC<sub>50</sub>値を算出した。Noc/A再標的化エンドペプチダーゼにおける値を表5にまとめた。再標的化エンドペプチダーゼDyn/Aの完全用量反応は、PC12及びクローンAF4についてのみ行った。どちらの例におけるアッセイも上側の漸近線に達しなかったため、EC<sub>50</sub>は算出できなかった。AF4クローンにおけるシグナルが生成したより低い用量は、両方の細胞株において12 nMであった。

【表5】

細胞株	説明	由来	EC <sub>50</sub> Noc/A 取り込み	EC <sub>50</sub> Dyn/A 取り込み
AGN P33	ヒト神経芽腫	—	5-10 nM	NT
BE(2)-C	ヒト神経芽腫	ATCC CRL-2268	NT	NT
N18TG2	マウス神経芽腫	DSMZ ACC 103	NT	NT
N18	マウス神経芽腫	ECACC 88112301	>100 nM	NT
ND3	マウス神経芽腫と ラット初代新生児DRGの雑種	ECACC 92090901	NDA	NT
ND7/23	マウス神経芽腫と ラット初代DRGの雑種	ECACC 92090903	>100 nM	NT
ND8	マウス神経芽腫と ラット初代新生児DRGの雑種	ECACC 92090904	NDA	NT
ND15	マウス神経芽腫と ラット初代新生児DRGの雑種	ECACC 92090907	>100 nM	NT
Neuro-2a	マウス神経芽腫	ATCC CCL-131	30 nM	NT
NG108-15	マウス神経芽腫とラット神経膠腫の雑種	ECACC 88112302	NT	NT
PC12	ラット褐色細胞腫	ATCC CRL-1721	NT	>1000 nM
SH-SY5Y	ヒト神経芽腫	ATCC CRL-2266	NT	NT
SiMa	ヒト神経芽腫	DSMZ ACC 164	30 nM	NT
SiMa clone AF4	ヒト神経芽腫	—	NT	>300 nM
SiMa clone H1	ヒト神経芽腫	—	>100 nM	NT
SiMa clone H10	ヒト神経芽腫	—	20 nM	NT
SK-N-BE(2)-C	ヒト神経芽腫	ATCC CRL-2271	NT	NT
SK-N-DZ	ヒト神経芽腫	ATCC CRL-2149	0.5-2 nM	NT
SK-N-F1	ヒト神経芽腫	ATCC CRL-2142	>100 nM	NT
SK-N-SH	ヒト神経芽腫	ECACC 86012802	>100 nM	NT

NT：未試験  
NDA：この細胞株においては検出可能な量のSNAP-25は検出されなかった

10

20

## 【0193】

同様の方法を用い、その他の再標的化エンドペプチダーゼに対する関連する受容体を有する細胞を含むクローン細胞株をスクリーニングし、再標的化エンドペプチダーゼの取り込みを評価することができる。

## 【0194】

実施例 I I I 候補細胞株の再標的化エンドペプチダーゼの取り込みにおける生育条件の評価

以下の実施例は、確立された細胞株における再標的化エンドペプチダーゼの取り込みを最大にする培養条件、成長及び分化をどのように決定したかを説明する。

## 【0195】

1. 候補細胞株の再標的化エンドペプチダーゼの取り込みにおける細胞分化及び栄養素の効果。

細胞分化又は成長培地中の栄養素の存在が再標的化エンドペプチダーゼの取り込みを改善するかどうかを決定するために、Noc/Aの良好な取り込みを示した細胞株を、異なる培地組成物を用いて試験した。試験するSiMa P > 30細胞株のストック培養由来の好適な密度の細胞を、RPM 11640、1% ペニシリン - ストレプトマイシン、2 mM L - グルタミン、サプリメント B 27、及びN2を含む100 µLの無血清培地、又はRPM 11640、1% ペニシリン - ストレプトマイシン、2 mM L - グルタミン、サプリメント B 27、N2、及びNGF（神経成長因子、100 ng/mL）を含む100 µLの無血清培地を入れた96ウェル組織培養プレートのウェル中にプレATINGした。これらの細胞を、成長停止及び神経突起伸展などの標準的及び慣習的な形態学的な

30

40

50

基準によって評価されるように細胞が分化するまで、37 のインキュベーター中、5% 二酸化炭素存在下でインキュベートした（およそ1～2日間）。対照として、試験する細胞株のストック培養由来の好適な密度の細胞を、NGF（100 ng/mL）を加えた又は加えない100 μLの適切な成長培地（表1）を入れた96ウェル組織培養プレートのウェル中にプレATINGした。これら未分化対照細胞を、細胞が所望の密度に達するまで、37 のインキュベーター中、5%二酸化炭素存在下で生育させた（およそ18～24時間）。分化した及び未分化対照培養両方由来の培地をそれぞれのウェルから吸引し、0（未処理試料）又は様々な濃度いずれかのNoc/A（0.14、0.4、1.23、3.7、11.1、33.3、及び100 nM）を含む新しい培地で置換した。24時間処理後、細胞を洗浄し、生産されるSNAP25<sub>197</sub>の量を増加させるために、再標的化エンドペプチダーゼを含まない培地中で24時間インキュベートした。その後細胞を洗浄し、実施例IIに記載したようなECLサンドイッチELISAアッセイ用に回収した。

#### 【0196】

SK-N-DZ細胞株においては、栄養素の効果もまた試験した。SK-N-DZ細胞を、1つのウェル当たり25,000細胞になるように、8つの異なるSM培地（表6）を用いて、72時間、ポリ-D-リジンコーティング96ウェルプレートにプレATINGした。0、0.3 nM、3 nM、及び30 nM用量のNoc/Aを加えた同じ8つの培地中で細胞を処理した。24時間処理後、細胞を洗浄し、生産されるSNAP-25<sub>197</sub>開裂産物の量を増加させるために、再標的化エンドペプチダーゼを含まない培地中で24時間インキュベートした。その後細胞を洗浄し、実施例Iに記載したようなウエスタンブロットアッセイように回収した。

#### 【0197】

分化は、SiMa > P30細胞株のNoc/A取り込みにおいては効果がなかったが、SK-N-DZ細胞株における取り込みを改善したようだった。基本培地はSK-N-DZ細胞株におけるNoc/Aの取り込みに有意な効果を示し、栄養素N2及びB27を含むRPMI1640が最も良い組み合わせであった。NGFの存在は、試験した2つの細胞株における取り込みを改善しないようだった。

#### 【表6】

未分化	分化	EC <sub>50</sub> Noc/A取り込み	
		AGN P33	SK-N-DZ
DMEM, 10% FBS	—	NT	> 30 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27	—	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, NGF	—	NT	3 nM
DMEM, 10% FBS, N2, B27, RA	—	NT	>30 nM
RPMI1640, 10% FBS	—	NT	10 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27	—	7.2 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, NGF	—	9.1 nM	1 nM
RPMI1640, 10% FBS, N2, B27, RA	—	NT	10 nM
—	RPMI1640, N2, B27	10.2 nM	1 nM
—	RPMI1640, N2, B27, NGF	9.8 nM	0.6 nM

NGF：神経成長因子； RA：レチノイン酸  
NT：未試験

#### 【0198】

同様の方法を用い、その他の再標的化エンドペプチダーゼに対する関連する受容体を有する細胞を含むクローン細胞株の成長及び分化条件を評価することができる。

#### 【0199】

実施例 I V 外生の再標的化エンドペプチダーゼ受容体を発現する確立された細胞株の作成

以下の実施例は、再標的化エンドペプチダーゼに対する外生の受容体を発現する確立された細胞株をどのように作出したかを説明する。

【 0 2 0 0 】

1. 候補細胞株を構成する細胞への標的受容体のトランスフェクション。

再標的化エンドペプチダーゼ Noc / A は、オピオイド受容体様 - 1 ( ORL - 1 ) の天然のリガンドであるノシセプチン標的ドメインを含む。ORL - 1 のオープンリーディングフレームを含む発現コンストラクトを得るために、Gene Copoeia ( Gene Copoeia, Germantown, MD ) から、発現コンストラクトである pReceiver - M02 / ORL - 1 を得た。

【 0 2 0 1 】

一方、標準的な方法 ( BlueHeron (登録商標) Biotechnology, Bothell, WA ) を用いて、ORL - 1 アミノ酸配列 (例えば、配列番号 25 又は配列番号 26 のアミノ酸配列) に基づくポリヌクレオチド分子を合成することができる。

20 ~ 50 塩基の長さのオリゴヌクレオチドは、標準的なホスホラミダイト合成によって合成される。これらのオリゴヌクレオチドは、完全長ポリヌクレオチド分子を構成するために、共にライゲーションされる二本鎖デュプレックス中にハイブリダイゼーションされる。このポリヌクレオチド分子は、pUCBHB1 / ORL - 1 を作出するために、標準的な分子生物学的手法を用いて pUCBHB1 ベクターの Sma I 部位にクローニングされる。

Big Dye Terminator (商標) Chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 及び ABI 3100 シークエンサー (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いたシークエンシングにより、合成したポリヌクレオチド分子を確認する。必要に応じて、大腸菌株における発現を改善するために、ORL - 1 アミノ酸配列 (例えば、配列番号 25 又は配列番号 26 のアミノ酸配列) に基づいて、発現を最適化したポリヌクレオチド分子を合成することができる。ORL - 1 をコードしているポリヌクレオチド分子を、1) 大腸菌株の天然型ポリヌクレオチド分子に典型的に存在する同義語コドンを含むように；2) 大腸菌株で見られる天然型ポリヌクレオチド分子の平均 G + C 含量と、より密接に一致する G + C 含量を含むように；3) ポリヌクレオチド分子に見られるポリモノヌクレオチド領域が減少するように；及び / 又は 4) ポリヌクレオチド分子中に見られる内部の制御部位又は構成部位を除去するように、改変することができる。例えば、Lance E. Steward et al., Optimizing expression of Active Botulinum Toxin Type A (米国特許出願公開第 2008 / 0057575 号) (2008 年 3 月 6 日)；及び Lance E. Steward et al., Optimizing expression of Active Botulinum Toxin Type E、(米国特許出願公開第 2008 / 0138893 号) (2008 年 6 月 12 日) を参照のこと。配列の最適化が完了すると、20 ~ 50 塩基の長さのオリゴヌクレオチドは標準的なホスホラミダイト合成によって合成される。これらのオリゴヌクレオチドは、完全長ポリヌクレオチド分子を構成させるために、共にライゲーションされる二本鎖デュプレックス中にハイブリダイゼーションされる。pUCBHB1 / ORL - 1 を作出するため、標準的な分子生物学的手法を用いてこのポリヌクレオチド分子を pUCBHB1 ベクターの Sma I 部位にクローニングする。DNA シークエンシングにより、合成したポリヌクレオチド分子を確認する。必要に応じて、例えば、酵母株、昆虫細胞株又は哺乳動物の細胞株などの異なる生物における発現の最適化を行うことができる。例えば、Steward (米国特許出願公開第 2008 / 0057575 号)、上記、(2008)；及び Steward (米国特許出願公開第 2008 / 0138893 号)、上記、(2008) を参照のこと。ORL - 1 をコードしているポリヌクレオチド分子の例としては、配列番号 61 及び配列番号 62 が挙げられる。

20

30

40

50

60

70

80

90

100

## 【0202】

ORL-1をコードしている発現コンストラクトを構築するため、pUCBHB1/ORL-1コンストラクトを、1)ORL-1のオープンリーディングフレームをコードしているポリヌクレオチド分子を切断し;および2)このポリヌクレオチド分子をpcDNA3ベクター(Invitrogen、Inc.、Carlsbad、CA)に操作可能に連結することを可能にする、制限エンドヌクレアーゼを用いて消化する。この挿入断片をT4 DNA ligase技術を用いてpcDNA3ベクターにサブクローニングし、さらにpcDNA3/ORL-1を得るために適切な制限エンドヌクレアーゼを用いて消化する。エレクトロポレーション法により、ライゲーション混合液をエレクトロコンピテントE. coli BL21(DE3)細胞(Edge Biosystems、Gaithersburg、MD)に形質転換し、細胞を50 µg/mLのアmpiシリンを含む1.5% Luria-Bertani寒天プレート(pH7.0)上にプレーティングし、37 インキュベーター中に静置して一晚生育させる。発現コンストラクトを含むバクテリアは、アmpiシリン抵抗性のコロニーとして同定される。候補コンストラクトは、アルカリ溶菌プラスミドミニプレレーション法によって単離され、挿入断片の存在及び方向を決定するために制限エンドヌクレアーゼ消化マッピングによって解析される。このクローニング方法により、ORL-1をコードしているポリヌクレオチド分子を含むpcDNA3発現コンストラクトが得られる。

10

## 【0203】

再標的化エンドペプチダーゼDyn/Aは、 $\mu$ -オピオイド受容体(KOR)の天然のリガンドであるダイノルフィン標的ドメインを含む。ORL-1のオープンリーディングフレームを含む発現コンストラクトを得るために、Gene Copoeia(Gene Copoeia、Germantown、MD)を用いて発現コンストラクトであるpReceiver-M02/KOR-1を得た。一方、KORをコードしている発現コンストラクトを合成し、pcDNA3.1/KOR発現コンストラクトを作出するために用いた、上述した方法と類似の方法を用いてサブクローニングすることができる。KORアミノ酸配列の例としては配列番号29及び配列番号30が;KORをコードしているポリヌクレオチド分子の例としては配列番号65及び配列番号66が挙げられる。

20

## 【0204】

例えば、pcDNA3.1/DOR又はpcDNA3.1/MOR、pcDNA3.1/ガラニン受容体1、pcDNA3.1/ガラニン受容体2、又はpcDNA3.1/ガラニン受容体3などの、その他の再標的化エンドペプチダーゼ受容体をコードしている発現コンストラクトを作出するために類似のクローニング方法を用いることができる。DORアミノ酸配列の例としては配列番号27及び配列番号28が;MORアミノ酸配列の例としては配列番号31が、ガラニン受容体1アミノ酸配列の例としては配列番号136、配列番号137、及び配列番号138が;ガラニン受容体2アミノ酸配列の例としては配列番号139が;並びにガラニン受容体3アミノ酸配列の例としては配列番号140が挙げられる。DORをコードしているポリヌクレオチド分子の例としては配列番号63及び配列番号64が;MORをコードしているポリヌクレオチド分子の例としては配列番号67が;ガラニン受容体1をコードしているポリヌクレオチド分子の例としては配列番号141、配列番号142、及び配列番号143が;ガラニン受容体2をコードしているポリヌクレオチド分子の例としては配列番号144が;並びにガラニン受容体3をコードしているポリヌクレオチド分子の例としては配列番号145が挙げられる。

30

40

## 【0205】

再標的化エンドペプチダーゼ受容体をコードしている発現コンストラクトを導入するために、再標的化エンドペプチダーゼ受容体をコードしている発現コンストラクトを用いて細胞株をトランスフェクションした。オピオイド又はオピオイド様受容体を用いて細胞株をトランスフェクションするためには、候補細胞株由来の細胞をT<sub>175</sub>コラーゲンIVコーティングフラスコ中に1×10<sup>7</sup>個の細胞密度で播種し、細胞が所望の密度に達するまで、37 のインキュベーター中、5%二酸化炭素存在下で生育させた。室温で5分間

50

インキュベートした200 $\mu$ LのLipofectAmine 2000 (Invitrogen、Carlsbad、CA)を含む4mLのOPTI-MEM血清使用量低減培地を20 $\mu$ gのpReceiver-M02/ORL-1又は20 $\mu$ gのpReceiver-M02/KOR-1を含む4mLのOPTI-MEM血清使用量低減培地に加えることにより4.2mLのトランスフェクション溶液を調製した。このトランスフェクション溶液を室温でおよそ20分間インキュベートした。培地を8mLの新しい無血清、抗生物質を含まない培地で置換し、トランスフェクション溶液を細胞に加えた。その後細胞を37 $^{\circ}$ Cのインキュベーター中、5%二酸化炭素存在下でおよそ16~18時間インキュベートした。トランスフェクション培地を新しい成長培地で置換し、細胞を37 $^{\circ}$ Cインキュベーター中、5%二酸化炭素存在下でインキュベートした。24時間後、成長培地を培養培地中に1mg/mL濃度の抗生物質G418を含む新しい成長培地(選択培地)で置換し、細胞を7日間インキュベートした。全4週間にわたり、選択培地を毎週交換した(約90%細胞が死に、毎週の培地交換の際に除去した)。

10

## 【0206】

ORL-1受容体を用いてトランスフェクションした候補細胞株は、SiMa>P30、ND15、ND7、NG108-T15及びSK-N-DZ細胞株である。KOR-1受容体を用いてトランスフェクションした候補細胞株は、SiMa、SiMa>P30、ND15、ND7、NG108-T15及びSK-N-DZ細胞株である。トランスフェクションしたNG108-T15細胞は、G418による選別において生き残らなかった。

20

2. 安定にトランスフェクションした細胞株の、再標的化エンドペプチダーゼ分子を用いた単回投与及び用量反応スクリーニング。

## 【0207】

前セクションにおいてトランスフェクションし、選別した候補細胞株由来の細胞を、化合物を処理する前にN2及びB27サプリメント、並びにNGF(50~100ng/mL)を含むRPMI1640培地中で、1ウェル当たり $1 \times 10^5$ 細胞になるように96ウェルポリ-D-リジン又はコラーゲンIVコーティングプレートに、 $20 \pm 4$ 時間プレatingした。その後同じ培地中で、ORL-1受容体を安定してトランスフェクションされた細胞を30nMの再標的化エンドペプチダーゼNoc/Aで $24 \pm 2$ 時間処理した。SK-N-DZ細胞株は10nMの再標的化エンドペプチダーゼNoc/Aで処理した。120 $\mu$ Lのリシスバッファー中で細胞を溶解し、実施例Iに詳述したように行うウエスタンブロットアッセイ用に、20 $\mu$ Lの溶解物を2xSDSバッファーと混合した。ORL-1受容体を用いてトランスフェクションした場合、全ての細胞株における再標的化されたNoc/A化合物の取り込みが増加することが示された(表7)。

30

## 【表7】

細胞株	説明	30nMで開裂したSNAP-25 (%)	
		トランスフェクション無し	トランスフェクション有
AGN P33	ヒト神経芽腫	20%	40%
SK-N-DZ	ヒト神経芽腫	25% @ 10 nM	40% @ 10 nM
ND7	マウス神経芽腫とラットDRG細胞の雑種	10%	42%
ND15	マウス神経芽腫とラットDRG細胞の雑種	8%	20%
NG108-T15	マウス神経芽腫とラット神経膠腫の雑種	生存しなかった	生存しなかった

40

## 【0208】

前セクションにおいてトランスフェクションし、選別した候補細胞株由来の細胞を、化合物を処理する前に10% FBS及びN2及びB27サプリメントを含むRPMI1640培地中で、1ウェル当たり $1 \times 10^5$ 細胞になるように96ウェルポリ-D-リジン

50

又はコラーゲンIVコーティングプレートに、 $20 \pm 4$ 時間プレーティングした。KOR-1受容体を安定してトランスフェクションされた細胞を、同じ培地中で $24 \pm 2$ 時間、 $100 \text{ nM}$ の再標的化エンドペプチダーゼDy n / Aで処理した。 $120 \mu\text{L}$ のリシスバッファー中で細胞を溶解し、実施例Iに詳述したように行うウエスタンブロットアッセイ用に、 $20 \mu\text{L}$ の溶解物を $2 \times \text{SDS}$ バッファーと混合した。ヒトKOR-1受容体を用いてトランスフェクションした場合、全ての細胞株における再標的化されたDy n / A化合物の取り込みが増加することが示された。

#### 【0209】

3. 連続希釈による、高い感受性を示す安定してトランスフェクションされたクローン細胞株の選抜

以下の実施例は、再標的化エンドペプチダーゼの作用を受けやすい又は再標的化エンドペプチダーゼの取り込み能力を有する、安定してトランスフェクションされ、確立された細胞株由来のクローン細胞をどのように同定したかを説明する。

#### 【0210】

上記に記載した、選択した細胞由来の単一の細胞をクローニングするために、限界希釈細胞株クローニング方法を用いた。細胞をトリプシン処理し、数を計測し、 $100 \mu\text{L}$ 当たり $0.5 \sim 1$ 細胞になるように希釈し、1つのウェル当たり $100 \mu\text{L}$ を、5つのポリ-D-リジンコーティング96ウェルプレートに入れた選択培地上にプレーティングした。ウェルの底部にコロニーが形成されるまで、2週間以上細胞をインキュベートした。単一細胞由来の陽性のコロニーに印を付けた。顕微鏡カメラを用いてクローン由来の単一細胞の写真を撮影した。単一クローンを入れたウェルからの細胞をさらに1週間生育させ、クローニング開始から約4週間後に24ウェルプレートに移した。

#### 【0211】

クローンの選抜のための陽性クローンをスクリーニングするために用いた指標は、完全な及び開裂したSNAP-25の両方を認識する抗体を用いたウエスタンブロット解析によって測定した、Noc / A又はDy n / A処理後の最も多いSNAP-25開裂の量であった。試験に十分な細胞が得られた後、できる限りすぐに、ORL-1を過剰発現しているクローンを $10 \text{ nM}$ 及び $30 \text{ nM}$ の再標的化エンドペプチダーゼNoc / Aで一晩試験した(表8)。KOR-1を過剰発現しているクローンを $100 \text{ nM}$ の再標的化エンドペプチダーゼDy n / Aで一晩試験した(表9)。加えて、KOR-1を過剰発現しているクローンは、実施例Iに記載したようなダイノルフィン結合アッセイにおいて試験した。

10

20

30

【表 8 - 1】

表8 ORL-1でトランスフェクションした候補細胞株の、 再標的化Noc/Aを用いた単回投与スクリーニング				
細胞株	クローン番号	10nM Noc/A 取り込み	30nM Noc /A 取り込み	1nMでの二次スクリー ニング (開裂した%)
AGN P33	1	+	+	28%
AGN P33	2	++	+++	50%
AGN P33	3	-	+	NT
AGN P33	4	ND	ND	NT
AGN P33	5	-	+	31%
AGN P33	6	++	+++	60%
AGN P33	7	+	+	14%
AGN P33	8	+	+	NT
AGN P33	9	+	+	38%
AGN P33	10	+	++	29%
AGN P33	11	+	+	NT
AGN P33	12	+	+	27%
ND7	1C11	NT	++	NT
ND7	2F3	NT	-	NT
ND7	1D10	NT	-	NT
ND7	1F9	NT	-	NT
ND7	1G10	NT	-	NT
ND7	2D8	NT	-	NT
ND7	2E2	NT	-	NT
ND7	4B7	NT	+++	NT
ND7	3C11	NT	-	NT
ND7	3C3	NT	+	NT
ND7	3E8	NT	-	NT
ND7	3E11	NT	-	NT
ND7	2G3	NT	-	NT
ND7	4D5	NT	+	NT
ND7	4D8	NT	+	NT
ND7	4C8	NT	-	NT
ND7	4C9	NT	+++	NT

10

20

30

【表 8 - 2】

表8 ORL-1でトランスフェクションした候補細胞株の、 再標的化Noc/Aを用いた単回投与スクリーニング				
細胞株	クローン番号	10nM Noc/A 取り込み	30nM Noc /A 取り込み	1nMでの二次スクリー ニング (開裂した%)
ND7	4E8	NT	+	NT
ND7	2E6	NT	++	NT
ND7	4F4	NT	+++	NT
ND7	5D6	NT	-	NT
ND7	5G3	NT	-	NT
ND7	4D5	NT	++	NT
ND15	1C10	NT	+	NT
ND15	1F10	NT	++	NT
ND15	2D8	NT	++	NT
ND15	2E11	NT	-	NT
ND15	2F4	NT	++	NT
ND15	2F10	NT	++	NT
ND15	2F11	NT	-	NT
ND15	3C4	NT	+	NT
ND15	3C7	NT	++	NT
ND15	3E8	NT	+++	NT
ND15	4C8	NT	+	NT
ND15	4D8	NT	+	NT
SK-N-DZ	#2	-	-	NT
SK-N-DZ	#4	-	-	NT
SK-N-DZ	#5	+++	++	NT
SK-N-DZ	#6	NT	++	NT
SK-N-DZ	#7	+	NT	NT
SK-N-DZ	#8	-	NT	NT
SK-N-DZ	#9	+	NT	NT
SK-N-DZ	#10	-	NT	NT
SK-N-DZ	#11	+	+++	NT
SK-N-DZ	#12	-	NT	NT
SK-N-DZ	#14	++	NT	NT
SK-N-DZ	#16	-	NT	NT
SK-N-DZ	#17	+	+++	NT
SK-N-DZ	#19	+	+++	NT
SK-N-DZ	#20	-	NT	NT
SK-N-DZ	#23	NT	++	NT

10

20

30

40

【表 8 - 3】

細胞株	クローン番号	10nM Noc/A 取り込み	30nM Noc/A 取り込み	1nMでの二次スクリーニング (開裂した%)
SK-N-DZ	#25	-	NT	NT
SK-N-DZ	#26	-	++	NT
SK-N-DZ	#27	+	NT	NT
SK-N-DZ	#28	++	+	NT
SK-N-DZ	#30	++	NT	NT
SK-N-DZ	#31	-	NT	NT
SK-N-DZ	#32	++	++	NT
SK-N-DZ	#33	+	NT	NT
SK-N-DZ	#34	+++	ND	NT
SK-N-DZ	#35	+	++	NT
SK-N-DZ	#36	-	NT	NT
SK-N-DZ	#37	+++	++	NT
SK-N-DZ	#42	-	NT	NT
SK-N-DZ	#43	+	++	NT

ND: 検出せず、NT: 未試験  
-: 取り込み無し、+: 最低限の取り込み、++: 中程度の取り込み、+++ : 良い取り込み

10

20

【表 9 - 1】

細胞株	クローン番号	100nM Dyn/A 取り込み	100nM Dyn/A 結合	今後の試験への 選択
SiMa	2	-	-	無
SiMa	6	+	+	無
SiMa	8	+	+	無
SiMa	12	+++	++	有
SiMa	14	++	++	無
SiMa	20	+	++	無
SiMa	25	++	++	無
AGN P33	1	+++	+	有
AGN P33	3	++	+	無
AGN P33	5	++	+	有
AGN P33	6	++	+	無
AGN P33	7	+++	+	有
AGN P33	8	++	+	有
AGN P33	9	+++	+	有
AGN P33	10	+++	+	有

30

40

【表 9 - 2】

表9 KOR-1でトランスフェクションした候補細胞株の、 再標的化Dyn/Aを用いた単回投与スクリーニング				
細胞株	クローン番号	100nM Dyn/ A 取り込み	100nM Dy n/A 結合	今後の試験への 選択
AGN P33	11	++	+	無
AGN P33	12	+++	+	有
AGN P33	14	+	+	無
AGN P33	16	++	+	無
AGN P33	17	+++	+	有
AGN P33	21	+	++	無
ND7	A1	+	+	無
ND7	A2	-	-	無
ND7	A3	-	-	無
ND7	A4	-	-	無
ND7	A5	-	-	無
ND7	A6	-	-	無
ND7	A7	-	-	無
ND7	A8	-	-	無
ND7	A9	-	-	無
ND7	A10	-	-	無
ND7	A11	-	-	無
ND7	A12	+++	+++	有
ND7	B1	-	-	無
ND7	B2	-	-	無
ND7	B3	-	-	無
ND7	B4	-	-	無
ND7	B5	+	+	有
ND7	B6	-	-	無
ND7	B7	-	-	無
ND7	B8	-	-	無
ND7	B9	-	-	無
ND7	B10	-	-	無
ND7	B11	-	-	無
ND7	B12	-	-	無
ND7	C1	-	-	無
ND7	C2	-	-	無
ND7	C3	-	-	無
ND7	C4	-	-	無
ND7	C5	-	-	無
ND7	C6	+	+	無

10

20

30

40

【表 9 - 3】

表9 KOR-1でトランスフェクションした候補細胞株の、 再標的化Dyn/Aを用いた単回投与スクリーニング				
細胞株	クローン番号	100nM Dyn/ A 取り込み	100nM Dy n/A 結合	今後の試験への 選択
ND7	C7	-	-	無
ND7	C8	-	-	無
ND7	C9	-	-	無
ND7	C10	-	-	無
ND7	C11	-	-	無
ND7	C12	-	-	無
ND7	D1	-	-	無
ND7	D2	-	-	無
ND7	D3	-	-	無
ND7	D4	-	-	無
ND7	D5	-	-	無
ND7	D6	++	++	有
ND7	D7	++	++	有
ND7	D8	-	-	無
ND7	D9	-	-	無
ND7	D10	-	-	無
ND7	D11	-	-	無
ND7	D12	-	-	無
ND7	E1	-	-	無
ND7	E2	-	-	無
ND7	E3	-	-	無
ND7	E4	-	-	無
ND7	E5	-	-	無
ND7	E6	-	-	無
ND7	E7	-	-	無
ND7	E8	-	-	無
ND7	E9	-	-	無
ND7	E10	-	-	無
ND7	E11	-	-	無
ND7	E12	++	++	有
ND7	F1	-	-	無
ND7	F2	-	-	無

10

20

30

40

【表9 - 4】

表9 KOR-1でトランスフェクションした候補細胞株の、 再標的化Dyn/Aを用いた単回投与スクリーニング				
細胞株	クローン番号	100nM Dyn/ A 取り込み	100nM Dy n/A 結合	今後の試験への 選択
ND7	F3	-	-	無
ND7	F4	-	-	無
ND15	A1	-	-	無
ND15	A2	-	-	無
ND15	A3	+	-	無
ND15	A4	+	-	無
ND15	A5	-	-	無
ND15	A6	++	-	無
ND15	A7	++	-	無
ND15	A8	++	-	無
ND15	A9	+	-	無
ND15	A10	+	-	無
ND15	A11	-	-	無
ND15	A12	-	-	無
ND15	B1	-	-	無
ND15	B2	++	-	無
ND15	B3	-	-	無
ND15	B4	-	-	無
ND15	B5	+++	-	有
ND15	B6	+	-	無
ND15	B7	-	-	無
ND15	B8	-	-	無
ND15	B9	-	-	無
ND15	B10	-	-	無
ND15	B11	-	-	無
ND15	B12	-	-	無
ND15	C1	-	-	無
ND15	C2	+++	+	有
ND15	C3	-	-	無
ND15	C4	-	-	無
ND15	C5	+	NT	無
ND15	C6	+++	NT	有
SK-N-DZ	#11	NT	NT	無

ND：検出せず、NT：未試験  
 -：取り込み無し、+：最低限の取り込み、++：中程度の取り込み、+++：良い取り込み

## 【0212】

4. 再標的化エンドペプチダーゼを用いた、安定してトランスフェクションされたクローン細胞株の用量反応スクリーニング。

セクション3において再標的化エンドペプチダーゼNoc/Aの良好な取り込みを示した、安定してトランスフェクションされた候補クローン細胞株を、再標的化エンドペプチダーゼNoc/Aに対する感受性及び効果を決定するために完全用量反応実験において試験した。化合物を処理する前に、N2及びB27サプリメント、並びにNGF(50~100ng/mL)を含むRPMI1640培地中で、1ウェル当たり $1 \times 10^5$ 細胞にな

10

20

30

40

50

るように96ウェルポリ-D-リジン又はコラーゲンIVコーティングプレートに20±4時間プレATINGした。親AGN P33細胞株及びND7クローン細胞株由来の細胞を、同じ培地中で24時間、0、0.14 nM、0.4 nM、1.23 nM、3.7 nM、11.1 nM、33.3 nM、及び100 nMのNoc/Aで試験し、SNAP-25を開裂させるために、再標的化エンドペプチダーゼを含まない培地中でさらに24時間インキュベートした。親AGN P33細胞株由来の細胞はまた、同じ培地中で24時間、0、0.03 nM、0.08 nM、0.24 nM、0.74 nM、2.22 nM、6.67 nM、及び20 nMのNoc/Aを用いて試験し、SNAP-25を開裂させるために再標的化エンドペプチダーゼを含まない培地中でさらに24時間インキュベートした。培地を除去し、細胞を洗浄し、実施例IIに記載したように、ECLサンドイッチELISAアッセイ用に細胞を溶解した。ORL-1受容体を用いて試験したAGN P33親細胞株及び安定してトランスフェクションされたクローン細胞株のデータを表10にまとめた。クローン#2及び#6は、親細胞株よりも再標的化エンドペプチダーゼNoc/Aに対するより高い感受性及び効果を示した。さらに、新規のクローン細胞株の増加した感受性は、新規のクローン細胞株の感受性がより高いことを確認する用量反応において、より低い濃度の使用を可能にした。

【表10】

	親	クローン2	クローン6	クローン8
S/N比 0.03 nM/BK		41	26	1.8
S/N比 20 nM/BK		259	522	33.1
S/N比 0.14 nM/BK				
S/N比 100 nM/BK				
EC <sub>50</sub> (nM)	6.8±1.1	0.6±0.1	0.7±0.07	0.3±0.2

【0213】

ORL-1受容体を用いて試験したND7親細胞株及び安定してトランスフェクションされたクローン細胞株からのデータを表11にまとめた。試験した全てのクローンが、親細胞株ND7よりも再標的化エンドペプチダーゼNoc/Aに対する改善した感受性及び効果を示した。クローン4B7、1E6、及び1C11の感受性が最も高く、EC<sub>50</sub>値は10 pM未満であった。

【表11】

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

【0214】

異なる細胞バックグラウンドにおける、ORL-1受容体を過剰発現しているクローン細胞株の作出及び試験から得られた結果を表12にまとめた。

【表 1 2】

バックグラウンド細胞株	種	完全用量のNoc/Aで試験した安定な細胞株	EC <sub>50</sub> (nM)
AGN P33	ヒト神経芽腫	3	0.6-2.5
ND7	ラット神経芽腫とDRGの雑種	6	3.7-8
SK-N-DZ	ヒト神経芽腫	0 (その後の研究のために7つの安定なクローンを選択)	N/A

10

## 【 0 2 1 5】

実施例 V 親 SK - N - D Z 細胞株由来のクローン細胞株の作成。

以下の実施例は、再標的化エンドペプチダーゼのエキソサイトーシスの阻害に感受性である、又は再標的化エンドペプチダーゼの取り込み能力を有するクローン細胞をどのように確立された親細胞株から同定したかを説明する。

## 【 0 2 1 6】

1. クローン細胞株の単離。

SK - N - D Z 細胞株の解析を行っている間に、この確立された細胞株を構成する細胞には少なくとも5つの異なる細胞表現型が含まれることが明らかになった。これら表現型の異なる細胞型のうちのいずれか1つが、この細胞株の再標的化エンドペプチダーゼのエキソサイトーシスの阻害を受けやすい原因がどうかを決定するため、それぞれ表現型の異なる細胞型を単離する単一のコロニー得るための2種類の異なる限界希釈スクリーニングを行った。

20

## 【 0 2 1 7】

SK - N - D Z ストック由来の好適な密度の細胞を、T 1 7 5 コラーゲン I V コーティングフラスコに入れた DMEM、10% ウシ胎仔血清(熱不活性化)、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 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン中で生育させた。二回目の継代の後、細胞懸濁液を用意するために細胞をトリプシン処理した、細胞濃度を決定した。この細胞懸濁液から約  $4.0 \times 10^6$  個の細胞を50 mL のチューブに移し、10 mL シリンジを用い、18.5 ゲージの針を通して強制的に排出することを繰り返すことにより、細胞を単一の細胞になるまで分離した。次に、この分離単一細胞懸濁液からの細胞を15 mL の新しい成長培地を添加することによって  $0.2 \times 10^6$  細胞/mL の濃度まで希釈し、10 細胞/mL の濃度になるように、この希釈液 2.5 µL を50 mL の新しい成長培地に添加した。96 ウェルコラーゲン I V コーティングプレートのそれぞれのウェルにこの最終希釈ストックから100 µL の成長培地を添加し、この細胞を一定に保たれた37 °C のインキュベーター中、5% 二酸化炭素存在下で4週間生育させた。4 個の96 ウェルプレートを解析のために用意した。コロニーの成長を評価するために、定期的にプレートを顕微鏡的に解析した。4週間後、成育中の単一のコロニーを同定するためにそれぞれのウェルを顕微鏡的に解析し、同定されたそれぞれの成長中のコロニーについて、100 µL の新しい成長培地をそれぞれのウェルに添加し、細胞を一定に保たれた37 °C のインキュベーター中、5% 二酸化炭素存在下で2週間生育させた。さらに2週間生育させた後、成長中の単一のコロニーをトリプシンで処理し、さらに培養を続けるために新しい96 ウェルプレートに移した。目視検査によってコロニーが約1,000細胞まで生育したと判断した時点で細胞をトリプシンで処理し、それぞれの細胞懸濁液を24 ウェルコラーゲン I V コーティングプレートの新しいウェル中に移した。細胞を、必要に応じて2~3日ごとに新しい成長培地で満たしながら、37 °C のインキュベーター中、5% 二酸化炭素存在下で生育させた。培養が約60%以上のコンフルエンスに達するまで細胞を生育させ、その時点で細胞をトリプシンで処理し、24 ウェルプレート中の細胞のコンフルエンスに基づき、それぞれの細胞懸濁液を25 cm<sup>2</sup> のコラーゲン I V コーティングフラスコ中に移

30

40

50

した。細胞を、必要に応じて2～3日ごとに新しい成長培地で満たしながら、37のインキュベーター中、5%二酸化炭素存在下で生育させた。フラスコ中の細胞が70～80%コンフルエンスに達した時点でそれらを凍結させ、Noc/Aのエキソサイトーシスの阻害の受けやすさを決定するためにクローン細胞株を試験するまで、液体窒素中で保存した。両方のスクリーニングにおいて当初単離された384コロニーのうち、24のクローン細胞株を生存能力及び成長の特徴に基づいて選択し、続くスクリーニング過程のために拡大した。これらのうち、早く成長する12のを細胞株を同定した。

#### 【0218】

2. 再標的化エンドペプチダーゼを用いた、クローン細胞株由来細胞の再標的化エンドペプチダーゼ活性の受けやすさの一次スクリーニング。

10

クローン細胞株由来の細胞が再標的化エンドペプチダーゼNoc/A活性に感受性であるかどうかを決定するために、エンドペプチダーゼ活性を決定する免疫を用いた一次スクリーニングを行った。

#### 【0219】

13のSK-N-DZクローン(#3、#4、#5、#8、#9、#10、#13、#15、#16、#17、#18、#22、及び#23)並びにSK-N-DZ親細胞をEMEM、10%FBS、1xB27、及び1xN2を入れた96ウェルプレートにプレATINGし(1ウェル当たりの細胞数は不明)、一晩インキュベートした。細胞を1nMのNoc/Aで24時間試験した。細胞を100μLのリシスバッファー中で20分間溶解させ、4000rpmで20分間遠心分離した。15μLの2xSDS試料バッファーを50μLの細胞溶解物に加え、95で5分間加熱した。1レーン当たり10μLのタンパク質試料を12%NuPageゲルにローディングし、実施例Iに記載した通りにウエスタンブロットアッセイを行った。全SNAP-25及び開裂したSNAP-25の評価は、クローン#3、#8、#15、及び#22は親細胞と少なくとも同程度のNoc/Aを取り込むことを示した。細胞を増やした後に完全用量反応処理及びECLサンドイッチELISAアッセイを用いた解析を行った。

20

#### 【0220】

3. 再標的化エンドペプチダーゼ分子を用いたクローン細胞株の二次反応スクリーニング。

クローン細胞株由来の細胞が再標的化エンドペプチダーゼNoc/A活性に感受性であるかどうかを決定するために、エンドペプチダーゼ活性を決定する免疫を用いた方法による二次スクリーニングを行った。

30

#### 【0221】

クローニングしたこれらSK-N-DZ細胞株をさらに比較するために、ECLサンドイッチELISAアッセイを行った。5つのクローン(#3、#9、#15、#16、#22)及びSK-N-DZ親細胞を、RPMI1640、10%FBS、1xB27、及び1xN2培地(NGFを含まない)を入れた96ウェルポリ-D-リジンコーティングプレートに、1細胞株につき、1ウェル当たり25,000細胞を週末にかけてプレATINGした。細胞を0～20nM(0、0.03、0.08、0.24、0.74、2.22、6.67、20nM)の用量のNoc/Aで24時間処理した。実施例Iに記載したように、開裂したSNAP-25<sub>197</sub>をECL ELISAアッセイを用いて定量した。

40

#### 【0222】

表13は、5つのクローン細胞株及び親細胞株のEC<sub>50</sub>値及びシグナル対ノイズを示す。#3、#9、及び#15とした3つのクローンはより低いEC<sub>50</sub>値(<1nM)を表し、クローン#16及び#22は親細胞株(~2nM)と比較して同程度のEC<sub>50</sub>値を表した。しかしながら、開裂したSNAP25からのシグナル総量はクローン#3、#22、及び親細胞においてより高かった。残りの細胞株と比較して、クローン#9、#16、及び#15はより低いシグナル総量を示した。

【表 1 3】

	親	3	9	19	16	22
S/N比 0.03 nM/BK	2	3	2	2	2	3
S/N比 20 nM/BK	19	27	12	8	14	20
EC <sub>50</sub> (nM)	2.6 ± 1.5	0.8 ± 0.07	0.7 ± 0.04	0.6 ± 0.1	2.2 ± 0.8	1.9 ± 0.6

## 【 0 2 2 3】

SK-N-DZクローンへのNoc/A処理の条件を最適化し、クローン#3、#15、及び#22、及び親異種SK-N-DZ細胞株を比較するアッセイを行った。表14は比較試験の結果を示し、アッセイの最適化がこのアッセイにおけるシグナル対ノイズを大きく改善したことを示した。クローン#3及び#22が非常に良い感受性及び効果を有したため、これらをさらなるアッセイの作成のために選択した。

10

【表 1 4】

	親	3	15	22
S/N比 0.03 nM/BK	15	8	5	10
S/N比 20 nM/BK	107	89	33	60
EC <sub>50</sub> (nM)	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.09

20

## 【 0 2 2 4】

実施例 V 再標的化エンドペプチダーゼの取り込みに関する、クローン細胞株の解析及び比較

以下の実施例は、異種の細胞集団を含む確立された細胞株から、又は標的受容体のトランスフェクションと続く細胞株のクローニングから得られたクローン細胞株をどのように解析及び比較したかを説明する。

## 【 0 2 2 5】

再標的化エンドペプチダーゼの取り込みにおける特異性又は選択性を評価するために、標的ドメインを欠損した再標的化エンドペプチダーゼを用いた非特異的取り込みアッセイを行った。オピオイド再標的化エンドペプチダーゼについては、AGN P33クローン#6細胞株(ORL-1受容体をコードしている発現コンストラクトで安定して形質転換された細胞を含む)及びSK-N-DZクローン細胞株#3及び#22(内因性ORL-1受容体を発現する細胞を含む)由来の細胞を、N2及びB27サプリメント、及びNGF(50 ng/mL)を含むRPMI 1640無血清培地を入れた96ウェルポリ-D-リジンコーティングプレートに1ウェル当たり150,000細胞個になるように播種し、化合物で処理する前に37°Cの5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中で20 ± 4時間インキュベートした。細胞を、同じ培地中で0~20 nM又は0~40 nMまでの範囲の8種類の用量のNoc/A、0~400 nM又は0~40 nMまでの範囲の8種類の用量のLH<sub>N</sub>/Aで22時間処理した。サンドイッチELISAアッセイ用に培地を除去し、細胞を洗浄し、溶解し、残渣を除去するために遠心分離した。2E2A6モノクローナル抗体を用いてコーティングしたELISAプレートを、150 µLブロッキングバッファー中、室温で1時間ブロッキングした。ブロッキングバッファーを除去した後、30 µLの細胞溶解物をそれぞれのウェルに加え、プレートを4°Cで2時間インキュベートした。PBS-Tを用いてプレートを3回洗浄し、PBS-T中の2%ブロッキング試薬に溶解した5 µg/mL SULFO-TAG NHS-エステル標識検出-SNAP25ポリクローナル抗体30 µLをウェルの底部の隅に加えた。プレートを密閉し、室温で1時間振とうし、その後PBS-Tで3回洗浄した。洗浄が完了した後、1ウェル当たり150 µLの1xリードバッファーを加え、SI6000 Image readerを用いてプ

30

40

50

レート測定した。陰性対照である  $LH_N/A$  に対する  $No_c/A$  の取り込みを比較した結果を表 15 及び表 16 に示した。 $No_c/A$  の特異的な取り込みを示していることにより、これらの結果は、両方の細胞株において  $No_c/A$  及び  $LH_N/A$  の取り込みがよく分離したことを示す。

【表 15】

表 15 SK-N-DZ クローン # 3 の非特異的取り込み。4 回の独立した実験の要約。

nM	非特異的取り込み (%)	SEM (平均の標準誤差)
0	2	0.5
1	6	0.5
2	8	0.5
5	10	1
15	19	0.9
44	33	1.5
133	65	2.4
400	93	2.3

10

20

【表 16 - 1】

表 16 hORL-1 # 6 細胞の非特異的取り込み。3 回の独立した実験の要約。

nM	非特異的取り込み (%)	SEM (平均の標準誤差)
0	1	0.2
1	2	0.2
2	3	0.6
5	3	0.3
15	8	1.3
44	12	1.9
133	22	3.0
400	32	3.0

30

【0226】

3 つの細胞株の解析及び比較における結果を表 17 にまとめた。SK-N-DZ クローン細胞株 # 3 及び # 22 は、再標的化エンドペプチダーゼ  $No_c/A$  におけるロバストアッセイを作成するための初期 eDRG と同等の感受性、及び非常に良いシグナル対ノイズを有する。AGN P33 クローン細胞株 # 6 もまた、低い非特異的取り込み及び十分な感受性を有することから、非常に良い候補である。

40

【表 17】

表 17				
指標	SK-N-DZ クローン 3	SK-N-DZ クローン 22	AGN P33	eDRG
細胞株種	ヒトクローン	ヒトクローン	ヒトクローン	ラット初代
細胞受容体発現	内因性ヒトORL1	内因性ヒトORL1	トランスフェクションしたヒトORL1	内因性ラットORL1
動的範囲	0.03~20 nM用量反応	0.03~20 nM用量反応	0.04~40 nM用量反応	0.17~20 nM用量反応
感受性 (EC <sub>50</sub> )	EC <sub>50</sub> =0.75±0.1 (N=10)	EC <sub>50</sub> =0.8±0.2 (N=9)	EC <sub>50</sub> =2.4±0.2 (N=21)	EC <sub>50</sub> =0.8±0.15 (N=6)
ULOQ	20 nM	20 nM	20 nM	10~20 nM
S/N ULOQ/バックグラウンド	98±15 (N=10)	86±17 (N=9)	385±32 (N=19)	~300
S/N LLOQ/バックグラウンド	12±2 (N=11)	10±2 (N=9)	29±7 (N=18)	N/A
特異性対LHN/A	≥2ログ (N=4)	≥2ログ (N=4)	≥2ログ (N=3)	N/A
SNAP-25発現	内因性	内因性	内因性	内因性
ノシセプチンV arを用いた競合	完全に競合 (n=4)	完全に競合 (n=4)	部分的な競合 (n=4)	N/A
抗ノシセプチン抗体による阻害	完全に競合 (n=4)	完全に競合 (n=4)	完全に競合 (n=4)	N/A
抗868抗体による阻害	部分的な競合 (N=3)	部分的な競合 (N=3)	部分的な競合 (N=3)	N/A

10

20

30

## 【0227】

再標的化エンドペプチダーゼ取り込みの感受性を評価するために、リガンド飽和結合アッセイを行った。大部分のリガンドの相互作用を、それらの結合部位を用いて結合親和性の観点から解析することができる (NIHアッセイの手引き)。通常、親和性の高い結合は親和性の低い結合よりも、リガンドのその受容体結合部位への長い滞留時間を含む。リガンド (L) (薬剤など) とタンパク質 (P) との間の親和性、すなわち、リガンドがどの程度特定のタンパク質に強く結合するか、を記載するためには、解離定数が一般的に用いられる。平衡飽和結合実験は、様々な放射性リガンド濃度での、全及び非特異的結合 (NSB) を測定する。平衡解離定数又は放射性リガンドへの親和性である  $K_d$ 、及び受容体結合部位の最大数である  $B_{max}$  は、非線形回帰解析を用いた特異的結合 (全 - NSB) から算出することができる。特異的結合の  $K_d$  は、下記の式で示した、一部位結合双曲線非線形回帰解析 (すなわち Graph Pad Prism) を用いて算出することができる。式中、 $B_{max}$  は結合部位の最大数 (pmol/mg、又は pmol/細胞、又は部位/細胞)、及び  $K_d$  (nM、pM、など) は最大半量結合に達するために必要な放射性リガンドの濃度である。

40

## 【数 1】

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

## 【0228】

オピオイド再標的化エンドペプチダーゼについては、AGN P33クローン#6細胞株(ORL-1受容体をコードしている発現コンストラクトで安定して形質転換された細胞を含む)、SK-N-DZ親細胞株、及びSK-N-DZクローン細胞株#3、#15、及び#22(内因性ORL-1受容体を発現する細胞を含む)由来の細胞を、1xN2及び1xB27サプリメントを含むRPMI1640無血清培地を入れた48ウェルポリ-D-リジンコーティングプレートに1ウェル当たり200,000細胞になるように播種し、37の5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で一晩インキュベートした。培地を除去し、全結合を評価するために使用するウェルには細胞と150µLのトリス結合バッファーを加え、非特異的結合を評価するために使用するウェルには100µLのトリス結合バッファーを加えた。約50µLの4x最終濃度の放射性標識していないノシセプチン(SK-N-DZ細胞株には2.5µM、及びAGN P33クローン細胞株#6には1µM)を非特異的結合ウェルに加え、及び50µLの4x最終濃度の<sup>3</sup>H-ノシセプチン(SK-N-DZ細胞株には0nM、0.05nM、0.1nM、0.2nM、0.4nM、0.8nM、1.6nM、3.1nM、6.3nM、12.5nM、25nM、及び50nM、及びAGN P33クローン細胞株#6には0、0.01nM、0.02nM、0.039nM、0.078nM、0.156nM、0.313nM、0.625nM、1.25nM、2.5nM、5.0nM、及び10nM)を全結合ウェル及び非特異的結合ウェルの両方に、最終容量が200µLになるように加えた。37で30分間インキュベートした後、0.5mLの放射性標識していない洗浄バッファーでウェルを2回洗浄した。その後細胞を200µLの2N NaOH中で変性し、5mLのシンチレーション溶液を入れた20mLのシンチレーションバイアルに移した。生データを用いて用量反応グラフをプロットし、それぞれの試料のK<sub>d</sub>を算出した。得られた生データをSigmaPlot v10.0に移し、リガンド結合の数式カテゴリ以下の用量反応曲線を定義するために一部位飽和フィットを用いた。R<sup>2</sup>(相関係数)、B<sub>max</sub>、及びK<sub>d</sub>±SE(係数±標準誤差)の指標を含む画像レポートを生成した。SK-N-DZクローン細胞株#3、#15、及び#22、並びにAGN P33クローン細胞株#6細胞について行ったアッセイから、全結合、特異的結合、及び非特異的結合の画像を得た。SK-N-DZクローン細胞株#3及び#22は、濃度依存的、及び飽和可能な<sup>3</sup>H-ノシセプチンの結合を表した。同じ実験条件下において、SK-N-DZクローン細胞株#15は<sup>3</sup>H-ノシセプチンの用量依存的な反応を表したが、最も高い50nMにおいても飽和しなかった。内因性ORL-1を発現しているSK-N-DZ細胞株と比較して、AGN P33クローン細胞株#6由来の細胞は、低い非特異的結合を伴う、<sup>3</sup>H-ノシセプチンへの有意に高い親和性結合を示した(最大用量は10nM対SK-N-DZにおける50nM)。

## 【0229】

異なる3日間に、1細胞株当たり3回独立して行った結合実験のK<sub>d</sub>及びB<sub>max</sub>値を予測するために、SK-N-DZクローン細胞株#3、#22、#15及びAGN P33クローン細胞株#6の飽和結合曲線を用いた。これら4つの細胞株の順位は：AGN P33クローン細胞株#6(K<sub>d</sub>=1.86nM及びB<sub>max</sub>=2.9fmol/細胞)>SK-N-DZクローン細胞株#3(K<sub>d</sub>=14nM及びB<sub>max</sub>=0.6fmol/細胞)>SK-N-DZクローン細胞株#22(K<sub>d</sub>=17nM及びB<sub>max</sub>=0.6fmol/細胞)>SK-N-DZクローン細胞株#15(K<sub>d</sub>>50nM)である。SK-N-DZクローン細胞株#15の飽和用量反応を得るためには、必要とされるより高い用量範囲の<sup>3</sup>H-ノシセプチンを用いた。安定な細胞株である3つのSK-N-DZク

ローン細胞株、#3、#15、及び#22、並びにAGN P33クローン細胞株#6における特異的な原形質膜ノシセプチン-結合部位の解析におけるデータを表16にまとめる。データは以下のことを示した：1) AGN P33クローン細胞株#6における、非常に低い非特異的結合を伴う高い親和性部位 ( $K_d$ 、 $1.8 \text{ nM}$ 、及び  $B_{max}$ 、 $2.9 \text{ fmol/細胞}$ )；2) 内因性受容体を発現しているSK-N-DZ天然細胞においてノシセプチン-結合が生じる可能性がある；3) AGN P33クローン細胞株#6はSK-N-DZ細胞株よりも約10倍高いノシセプチンへの親和性を有した；4) 細胞を用いた効力アッセイにおいて見られるように、SK-N-DZクローン細胞株#3及び#22 ( $K_d$ 、 $14 \sim 17 \text{ nM}$ 、 $B_{max}$ 、 $0.6 \text{ fmol/細胞}$ )は1細胞あたりにSK-N-DZクローン細胞株#15よりも数多くの受容体部位を有した(同じ用量範囲では飽和しない)。

【表18】

細胞株	$K_d$ (nM $\pm$ SD)	$B_{max}$ (fmol/細胞)
SK-N-DZ #3	$14 \pm 1.6$	0.59
SK-N-DZ #15	>50	ND
SK-N-DZ #22	$16.7 \pm 1.1$	0.58
AGN P33 クローン細胞株#6	$1.86 \pm 0.1$	2.89

【0230】

再標的化エンドペプチダーゼの取り込みの感受性を評価するために、発現した再標的化エンドペプチダーゼ受容体の量を、RT-PCRを用いてmRNAレベルで評価した。細胞において発現した受容体の量は試験に用いる細胞株の解析において重要な観点であり、再標的化エンドペプチダーゼの感受性に関係する。発現した再標的化エンドペプチダーゼ受容体の量は、その他の可能性のある細胞株のスクリーニングにおける、及び標的受容体を発現しない細胞株を除去するための道具にもまたなる。受容体発現を測定する1つの方法は、リアルタイムPCR (RT-PCR)を用いて再標的化エンドペプチダーゼ受容体 mRNAの量を定量することである。

【0231】

オピオイド再標的化エンドペプチダーゼについては、無血清培地又は血清を含む培地のいずれかで生育させたトランスフェクションしていない親SiMa細胞株由来の細胞、AGN P33クローン細胞株#6由来の細胞、親SK-N-DZ細胞株由来の細胞、及びSK-N-DZクローン細胞株#3及び#22由来の細胞からRNAを単離した。mRNAをcDNAに変換し、ORL-1を増幅させ、下記のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、それぞれの細胞株中に存在する相対量を決定するためにリアルタイムを測定した。ORL-1用プライマー：フォワード5'-CACTCGGCTGGTGCTGGTG G-3' (配列番号148)及びリバース5'-AATGGCCACGGCAGTCTC GC-3' (配列番号149)。DNAを、反応液中に存在する二本鎖DNA (PCR産物)の量に比例して蛍光を発する、SYBR (登録商標) greenを用いて定量する。蛍光量対サイクル数をプロットングすることにより、それぞれの反応のロジスティック曲線が得られる。曲線の直線位相により早く達する反応中には、より多くのORL-1受容体cDNAが存在する。異物の混入がないかどうかを決定するために、酵素を加えていない対照RT反応を用いる。この反応中にはRT酵素が含まれないため、cDNAは生産されない。RNA鋳型を用いてもPCR産物が生産されないが、-RT反応においてPCR曲線が見られる場合、唯一の可能性はゲノムDNAの混入である。-RT反応において、PCRプロットが見られない場合、最小限のゲノムDNAの混入しかないことが確認できる(データは示さない)。表18に細胞株とそのCT値を示す。CTはPCRのサイク

ル数であり、設定した閾値以上のシグナルを生じるPCR反応と対応する。対応するCT値を見ることにより、細胞株中のORL-1受容体mRNAの量を別のものと比較することができる。CT値によると、無血清培地（平均CT：28.6対17.3）及び血清を含む培地（平均CT：26.1対16.5）において、AGN P33クローン細胞株#6由来の細胞は親SiMa細胞株由来の細胞よりも非常に多いORL-1 mRNAを含んだ。また、AGN P33クローン細胞株#6の6回目の継代対16回目の継代由来の細胞から得られたmRNAにおいては最小限の差がみられるようだった。また、親SK-N-DZ細胞株対クローン細胞株#3及び#22のCT値及びプロットにおいても最小限の差が見られた。この結果は血清を含む培地及び無血清培地中で生育させた細胞において真実であり、及びNoc/Aにおける細胞を用いた効力アッセイで見られたこれら細胞株の類似性を反映している。

【表19】

培地	細胞株	CT平均
血清を含まない培地	SiMa親 p26	28.6
	SiMa hORL-1クローン#6 p6	17.3
	SiMa hORL-1クローン#6 p16	17.3
完全培地	SiMa親 p26	26.1
	SiMa hORL-1クローン#6 p6	16.4
	SiMa hORL-1クローン#6 p16	16.6
血清を含まない培地	SK-N-DZ	26.3
	SK-N-DZ クローン#3	25.9
	SK-N-DZ クローン#22	26.6
完全培地	SK-N-DZ	26.2
	SK-N-DZ クローン#3	25.8
	SK-N-DZ クローン#22	26.4

【0232】

実施例VII BONT/A開裂部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基に自由な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 - SNAP-25モノクローナル抗体の作成

以下の実施例は、BONT/A開裂部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基に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ことができる - SNAP-25モノクローナル抗体をどのように作成したかを説明する。

【0233】

1. - SNAP-25モノクローナル抗体の生成。

BONT/A開裂部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基にカルボキシル末端を有するSNAP-25に選択的に結合することができるモノクローナル - SNAP-25抗体を作成するために、SNAP-25開裂産物抗原として13-残基のペプチドCDSNKTRIDEANQ<sub>c</sub>。o。H（配列番号38）を設計した。このペプチドは、柔軟なリンカー領域、並びにKLH及びカルボキシル化C末端グルタミン（配列番号38）を有するヒトSNAP-25（配列番号5）の及びアミノ酸186~197と結合するためのN末端システイン残基を含む。適切に選択した、エピトープ特異性の制御を提供する独特なペプチド配列に

対するモノクローナル抗体の生成は、近縁のアイソフォームのプール間のタンパク質の同定の亜集団の特定を可能にする。Blast検索により、このペプチドがSNAP-25のみに対して高い相同性を有し、かつ、神経細胞におけるその他のいずれのタンパク質ともほとんど交差反応しないことが明らかになった。疎水性親水性指標、タンパク質表面確率、可撓性のある領域、及び好ましい二次構造、並びに続く特定の配向及び選択したペプチド配列の表出を決定するためのコンピューターアルゴリズムを用いて、配列をまた、注意深く精査した。ペプチドを合成し、免疫原性を高めるために、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に結合させた。6匹のBalb/cマウスをこのペプチドを用いて免疫し、約8週間における3回の免疫化の後、試験のためにマウスから採血した。血液を4で60分間インキュベートすることによって凝固させた。細胞残渣を沈殿させるために、凝血塊を10,000×g、4で10分間遠心分離した。得られた血清試料を50μLずつに分け、使用まで-20で保存した。

10

## 【0234】

BONT/A開裂部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基にカルボキシル末端を有するSNAP-25に選択的に結合することができる-SNAP-25モノクローナル抗体を作成するために、その他のSNAP-25抗原をもとに、本明細書において開示したものと類似の方法を用いることができる。例えば、配列番号45のSNAP-25抗原を配列番号38のSNAP-25抗原の代わりにKLHに結合させることができる。別の例としては、配列番号38のSNAP-25抗原由来のヒトSNAP-25の186~197番目のアミノ酸を配列番号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、配列番号44で置換することができる。

20

## 【0235】

2. -SNAP-25モノクローナル抗体の存在のスクリーニング。

BONT/A開裂部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基に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-SNAP-25モノクローナル抗体の存在を決定するために、抽出したマウス血清を用いて、比較ELISA及び細胞を用いた開裂アッセイを行った。比較ELISA用に、配列番号48のBirA-His Tag(登録商標)-SNAP-25<sub>134-197</sub>、及び配列番号49のBirA-His Tag(登録商標)-SNAP-25<sub>134-206</sub>の、2つの融合タンパク質を構築した。BirA-His Tag(登録商標)-SNAP-25<sub>134-197</sub>は、配列番号5の134~197番目のアミノ酸を含むSNAP-25ペプチドにアミノ末端によって結合する、配列番号50の天然にビオチン化した16アミノ酸のBirAペプチドを含む。BirA-His Tag(登録商標)-SNAP-25<sub>134-206</sub>は、配列番号5の134~206番目のアミノ酸を含むSNAP-25ペプチドにアミノ末端によって結合する、配列番号50の天然にビオチン化した16アミノ酸のBirAペプチドを含む。10μg/mL濃度のBirA-His Tag(登録商標)-SNAP-25<sub>134-197</sub>及びBirA-His Tag(登録商標)-SNAP-25<sub>134-206</sub>のこれら2つの基質を1×PBS中に懸濁した。およそ100μLの適した基質溶液を添加し、プレートを室温で1時間インキュベートすることにより、BirA-His Tag(登録商標)-SNAP-25<sub>134-197</sub>及びBirA-His Tag(登録商標)-SNAP-25<sub>134-206</sub>を個別のプレート上にコーティングした。洗浄したプレートを、1:10~1:100に希釈した免疫した6匹のマウス(マウス1、マウス2、マウス3、マウス4、マウス5、及びマウス6)のうちの1匹由来の抗体を含む血清を含む1×TBSに含まれる0.5%BSA中で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したプレートを、200μLTBS、0.1%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンラウリン酸モノエステル)中で4回、それぞれの回につき5分間洗浄した。洗浄したプレートを、1:10,000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したヤギポリクローナル抗マウスIgG抗体(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)を二次抗体として

30

40

50

含む1×TBS中、37℃で1時間インキュベートした。二次抗体をプロービングしたプレートを、200μL TBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）中で4回洗浄した。標識したSNAP-25産物の発色の検出をImmuno Pure TMB substrate kit（Pierce Biotechnology、Rockford、IL）を用いた発色の検出によって可視化した。BirA-His Tag（登録商標）-SNAP-25<sub>134-197</sub>でコーティングしたプレートでは黄色の発色が見られ、BirA-His Tag（登録商標）-SNAP-25<sub>134-206</sub>をコーティングしたプレートでは見られなかったことは、SNAP-25抗体が主にSNAP-25<sub>197</sub>開裂産物を認識することを意味した。結果は、免疫化に用いられた6匹のマウスのうち、3匹のマウス（マウス2、マウス3、及びマウス4）がより高い力価を有し、かつ、BoNT/A開裂部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基にカルボキシル末端を有するSNAP-25抗原に対してより特異性が高いことを示した。

10

#### 【0236】

これらの結果をELISA軽鎖活性アッセイを用いて確認した。およそ100μLの以下の基質溶液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プレート（Pierce Biotechnology、Rockford、IL）を調製した。A~C列を12種類の異なる濃度のBirA-His Tag（登録商標）-SNAP-25<sub>134-197</sub>、100μLでコーティングした；D~H列を、10μg/mLのBirA-His Tag（登録商標）-SNAP-25<sub>134-206</sub>、100μLでコーティングした。基質溶液を吸引し、200μL TBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）でそれぞれのウェルを3回リンスすることにより、プレートを洗浄した。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、10μM ZnCl<sub>2</sub>、10mM ジチオトレイトール）中、37℃で20分間、BoNT/A希釈液を先に還元し、100μLの先に還元したBoNT/Aを基質コーティングプレート上に添加し、37℃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、200μL TBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）でそれぞれのプレートを3回リンスすることにより、BoNT/Aで処理したプレートを洗浄した。洗浄したプレートを、1:10~1:100に希釈した試験する抗体を含む血清を含む1×TBSに溶解した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したプレートを200μL TBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）中で4回、それぞれの回につき5分間洗浄した。洗浄したプレートを、1:10,000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させたヤギポリクローナル抗マウスIgG抗体（Pierce Biotechnology、Rockford、IL）を二次抗体として含む1×TBS中、37℃で1時間インキュベートした。二次抗体でプロービングしたプレートを、200μL TBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）中で4回洗浄した。標識したSNAP-25産物の発色の検出は、Immuno Pure TMB substrate kit（Pierce Biotechnology、Rockford、IL）を用いた発色の検出の可視化によって行った。免疫化した全てのマウス（マウス1、マウス2、マウス3、マウス4、マウス5、及びマウス6）由来の抗体を含む血清を用いることにより、SNAP-25<sub>197</sub>開裂産物の存在に対応する黄色の発色がBoNT/Aで処理した試料においては見られたが、未処理の対照においては見られなかった。従って、比較ELISA解析は免疫化に用いたマウスのうち、3匹のマウス（マウス2、マウス3、及びマウス4）がより高い力価を有し、かつ、BoNT/A開裂部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基にカルボキシル末端を有するSNAP-25抗原に対してより高い特異性を有することを示した。

20

30

40

50

## 【0237】

細胞を用いた開裂アッセイ用に、好適な密度のPC12細胞を、3 mLの適した血清培地(表1)を入れた60 mm<sup>2</sup>の組織培養プレート中にプレATINGした。細胞を、細胞が適当な密度に達するまで、37 °Cのインキュベーター中、5% 二酸化炭素存在下で生育させた。室温で5分間インキュベートした15 μLのLipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)を含む250 μLのOPTI-MEM血清使用量低減培地を、10 μgのpQBI-25/GFP-BoNT/A-LC発現コンストラクト(配列番号51)を含む250 μLのOPTI-MEM血清使用量低減培地に添加することにより、500 μLのトランスフェクション溶液を調製した。pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC発現コンストラクトは、そのプロモーターエレメントが、配列番号52のGFP-BoNT/A軽鎖をコードしているポリヌクレオチドに機能的に連結しているpQBI-25発現ベクター(Qbiogene Inc., Carlsbad, CA)を含む。このトランスフェクション混合液を室温でおよそ20分間インキュベートした。培地を新しい添加していない培地で置換し、500 μLのトランスフェクション溶液を細胞に添加した。細胞をその後、37 °Cのインキュベーター中、5% 二酸化炭素存在下でおよそ6~18時間インキュベートした。実施例I Iに記載したように、細胞を洗浄し、回収した。開裂したSNAP-25<sub>197</sub>産物の存在を検出するために、それぞれの回収した試料の一部を、1:1,000に希釈した抗体を含む血清を一次抗体として、及び1:20,000に希釈したマウス-IgG西洋ワサビペルオキシダーゼ(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)を二次抗体として使用した以外は実施例I Iに記載したようにウエスタンブロットによって解析した。3匹のマウス(マウス2、マウス3、及びマウス4)由来の抗体を含む血清を用いた場合、BoNT/Aで処理した試料においては、SNAP-25<sub>197</sub>開裂産物に対応する単一のバンドが検出されたが、未処理の対照においては検出されなかった。従って、細胞を用いた開裂アッセイは、免疫化に用いたマウスのうち、3匹のマウス(マウス2、マウス3、及びマウス4)がより高い力価を有し、かつ、BoNT/A開裂部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基にカルボキシル末端を有するSNAP-25抗原に対してより高い特性性を有することを示した。

## 【0238】

## 3. ハイブリドーマの作出。

BoNT/A開裂部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基に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-SNAP-25モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作出するために、最終的な「追加」免疫化の3日間後に、マウス2から脾臓を摘出し、標準的なハイブリドーマプロトコールを用いて、脾臓細胞を骨髄腫細胞P3-X63 Ag8.653と融合させた。これらの細胞を5つの96ウェルプレートにプレATINGし、HAT培地を用いて雑種を選別した。融合後8~14日間以内に、BirA-His Tag(登録商標)-SNAP-25<sub>134-197</sub>及びBirA-His Tag(登録商標)-SNAP-25<sub>134-206</sub>ペプチドでコーティングした2枚の個別のプレートを用いた比較ELISAにより、およそ480の親クローンの一次スクリーニングを行った。比較ELISAは、開裂したSNAP-25<sub>197</sub>に特異的な抗体を生産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を提供した。上から18のクローンを、上述した細胞を用いた開裂アッセイ及びLC/Aをトランスフェクションした細胞の免疫染色を用いたさらなるスクリーニングに用いた(表20)。

【表 2 0】

クローン	比較E L I Z A				細胞を用いたアッセイ	
	OD SNAP-25 <sub>197</sub>	OD SNAP-25 <sub>206</sub>	比 <sub>197/206</sub>	比 <sub>206/197</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
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	-	-

10

20

## 【 0 2 3 9】

クローン 1 D 3、1 G 1 0、2 E 2、3 C 1、3 C 3、及び 3 E 8 によって生産された馴化培地が SNAP - 2 5<sub>197</sub> 開裂産物と SNAP - 2 5<sub>206</sub> 開裂していない基質との比<sub>197/206</sub> が少なくとも 4 : 1 である、好ましい結合特異性を有する - S N A P - 2 5 抗体を含んだことから、クローン 1 D 3、1 G 1 0、2 E 2、3 C 1、3 C 3、及び 3 E 8 を限界希釈法によってさらにクローニングし、細胞を用いた開裂アッセイ及び G F P - L C / A を用いてトランスフェクションした P C 1 2 細胞の免疫染色によって S N A P - 2 5<sub>197</sub> 開裂産物を検出した。同様に、クローン 2 C 9、2 F 1 1、3 G 2、4 D 1 及び 4 G 6 によって生産される馴化培地が SNAP - 2 5<sub>206</sub> 開裂していない基質と SNAP - 2 5<sub>197</sub> 開裂産物との比<sub>197/206</sub> が少なくとも 1 . 5 : 1 の好ましい結合特異性を有する - S N A P - 2 5 抗体を含んだことから、クローン 2 C 9、2 F 1 1、3 G 2、4 D 1 及び 4 G 6 を限界希釈法によってさらにクローニングし、細胞を用いた開裂アッセイを用いて SNAP - 2 5<sub>206</sub> 開裂していない基質を検出した。比較 E L I S A、細胞を用いた開裂、及び、それらの親和性及び特異性を確認するための免疫染色を用いてこれら単一細胞由来のクローンを再度スクリーニングし、標準的な方法を用いて抗体のアイソタイプを分類した。クローン 1 D 3 B 8 ( I g M . k )、1 G 1 0 A 1 2 ( I g G 3 . k )、2 C 9 B 1 0 ( I g G 3 . k )、2 E 2 A 6 ( I g G 3 . k )、2 F 1 1 B 6 ( I g M . k )、3 C 1 A 5 ( I g G 2 a . k )、及び 3 C 3 E 2 ( I g G 2 a . k ) から腹水を生産した。クローン 3 E 8 はクローニングの過程の最中に抗体生産を停止したため、それ以上評価することができなかった。

30

40

## 【 0 2 4 0】

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

B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基に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 - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の結合特異性を評価するために、細胞を用いた活性アッセイ、免疫細胞化学及び免疫沈降による S N A P - 2 5 開裂産物の検出において、クローン 1 D 3 B 8、1 G 1 0 A 1 2、2 C 9 B 1 0、2 E 2 A 6、2 F 1 1 B 6、3 C 1 A 5、及び 3 C 3 E 2 由来の腹水を用いた。

## 【 0 2 4 1】

細胞を用いた活性アッセイについては、ウエスタンブロット解析により、 - S N A P

50

- 25 抗体を含む腹水の、開裂していない SNAP - 25<sub>206</sub> 基質及び開裂した SNAP - 25<sub>197</sub> 産物を検出する能力を解析することによって結合特異性を決定した。好適な密度の PC12 細胞を、3 mL の適した血清 培地を入れた 60 mm<sup>2</sup> 組織培養プレート中にプレティングし、細胞が適当な密度に達するまで 37 °C のインキュベーター中、5 % 二酸化炭素存在下で生育させ、pQBI - 25 / GFP - BoNT / A - LC 発現コンストラクト (トランスフェクションしていない細胞) を含まないトランスフェクション溶液又は pQBI - 25 / GFP - BoNT / A - LC 発現コンストラクト (トランスフェクションした細胞) を含むトランスフェクション溶液のいずれかを用いて上述した通りにトランスフェクションした。実施例 I に記載したように細胞を洗浄し、回収した。開裂していない SNAP - 25<sub>206</sub> 基質及び開裂した SNAP - 25<sub>197</sub> 産物両方の存在を検出するために、それぞれの回収した試料の一部を、1 : 100 に希釈した SNAP - 25 モノクローナル抗体を含む腹水を一次抗体として、及び 1 : 20,000 に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼに結合した マウス IgG (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) を二次抗体として使用した以外は実施例 I に記載したようにウエスタンブロットによって解析した。加えて、3 種類の市販されているマウス SNAP - 25 モノクローナル抗体を試験した。製造業者によると開裂していない SNAP - 25<sub>206</sub> 基質及び開裂した SNAP - 25<sub>197</sub> 産物の両方を検出する、SNAP - 25 抗体である SMI - 81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD) を、製造業者の推奨に従って 15,000 倍希釈で使用した。製造業者によると開裂していない SNAP - 25<sub>206</sub> 基質及び開裂した SNAP - 25<sub>197</sub> 産物の両方を検出する SNAP - 25 抗体である MC - 6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV) を、製造業者の推奨に従って 1 : 100 希釈で使用した。製造業者によると開裂した SNAP - 25<sub>197</sub> 産物のみを検出する SNAP - 25 抗体である MC - 6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV) を、製造業者の推奨に従って 1 : 100 希釈で使用した。

#### 【0242】

表 21 は、SNAP - 25<sub>197</sub> 開裂産物のみを検出した SNAP - 25 抗体を含む腹水を示す。細胞を用いた開裂アッセイは、クローン 1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5、及び 3C3E2 から生産された腹水が SNAP - 25<sub>206</sub> 開裂していない基質と比較した場合に、この開裂産物を選択的に認識することを可能にする、SNAP - 25<sub>197</sub> 開裂産物への高い結合特異性を有する SNAP - 25 モノクローナル抗体を合成することを示した。市販の抗体である SMI - 81 は SNAP - 25<sub>206</sub> 開裂していない基質を検出したが、SNAP - 25<sub>197</sub> 開裂産物をわずかにしか認識しなかった (表 21)。驚くことに、市販の抗体である MC - 6050 は SNAP - 25<sub>206</sub> 開裂していない基質のみしか検出せず、SNAP - 25<sub>197</sub> 開裂産物を認識しなかった (表 21)。さらに驚くことに、市販の抗体である MC - 6050 は SNAP - 25<sub>206</sub> 開裂していない基質のみしか認識せず、この抗体が SNAP - 25<sub>197</sub> 開裂産物を選択的に検出するという製造業者による広告にも関わらず、SNAP - 25<sub>197</sub> 開裂産物を認識しなかった (表 21)。従って、この解析は、1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5、及び 3C3E2 は SNAP - 25<sub>197</sub> 開裂産物への好適な選択性を示すが、1G10A12 及び 2F11B6 はそうではないことを示す。加えて、市販の抗体である SMI - 81、MC - 6050 及び MC - 6053 の全てが SNAP - 25<sub>197</sub> 開裂産物の選択的な検出に失敗したことから、本明細書で開示した免疫を用いた方法には適さない。

#### 【0243】

免疫細胞化学解析については、SNAP - 25 抗体を含む腹水の、開裂していない SNAP - 25<sub>206</sub> 基質及び開裂した SNAP - 25<sub>197</sub> 産物を検出する能力を免疫染色によって解析することにより、結合特異性を決定した。例えば、Ester Fe

10

20

30

40

50

r nandez - 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) を参照のこと。好適な密度の PC12 細胞をプレATINGし、生育させ、pQBI - 25 / GFP - BoNT / A - LC 発現コンストラクトを含まないトランスフェクション溶液 (トランスフェクションしていない細胞) 又は pQBI - 25 / GFP - BoNT / A - LC 発現コンストラクトを含むトランスフェクション溶液 (トランスフェクションした細胞) のいずれかを用いて、上述したようにトランスフェクションした。1 x PBS 中で細胞を洗浄し、5 mL の PAF 中、室温で 30 分間固定した。固定した細胞をリン酸緩衝生理食塩水中で洗浄し、5 mL の 1 x PBS に溶解した 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ニルエーテル) 中でインキュベートし、1 x PBS で洗浄し、5 mL のメタノール中、-20 で 6 分間透過処理を行った。透過処理を行った細胞を 5 mL の 100 mM グリシン中、室温で 30 分間ブロッキングし、1 x PBS 中で洗浄し、1 x PBS に溶解した 5 mL の 0.5% BSA 中、室温で 30 分間ブロッキングした。ブロッキングした細胞を 1 x PBS 中で洗浄し、1 : 10 に希釈した試験するクローンハイブリドーマ細胞株由来の腹水を含む 1 x PBS に溶解した 0.5% BSA 中、室温で 2 時間インキュベートした。一次抗体でプローピングした細胞を 1 x PBS 中で 3 回、それぞれの回につき 5 分間洗浄した。洗浄した細胞を 1 : 200 希釈した ALEXA (登録商標) FLUOR 568 に結合したヤギポリクローナル抗マウス免疫グロブリン、重鎖及び軽鎖 (IgG, H + L) 抗体 (Invitrogen Inc. , Carlsbad, CA) を二次抗体として含む 1 x PBS 中、室温で 2 時間インキュベートした。二次抗体でプローピングした細胞を 1 x PBS 中で 3 回、それぞれの回につき 5 分間洗浄した。VECTASHIELD (登録商標) 封入培地 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) にマウントし、カバーガラスを乗せることにより、顕微鏡実験用に洗浄した細胞を調製した。適したレーザーの設定を用いた Leica 共焦点顕微鏡により、シグナル検出画像を得た。表 21 は、SNAP - 25<sub>197</sub> - 開裂産物を特異的に検出した - SNAP - 25 抗体を含む腹水を示す。免疫細胞化学解析は、クローン 1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5、及び 3C3E2 由来の腹水は、SNAP - 25<sub>206</sub> 開裂していない基質と比較した場合に、この開裂産物を主に認識することを可能にする、SNAP - 25<sub>197</sub> 開裂産物に対して高い結合特異性を有する - SNAP - 25 モノクローナル抗体を合成することを示した。

#### 【0244】

免疫沈降解析については、精製された - SNAP - 25 モノクローナル抗体であるプロテイン A (HiTrap (商標) プロテイン A HP Columns, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ) の、開裂していない SNAP - 25<sub>206</sub> 基質及び開裂した SNAP - 25 - <sub>197</sub> 産物を沈殿させる能力を解析することにより、結合特異性を決定した。例えば、Chapter 8 Storing and Purifying Antibodies, pp. 309 - 311, Harlow & Lane、前記、1998a を参照のこと。好適な密度の PC12 細胞をプレATINGし、生育させ、pQBI - 25 / GFP 発現コンストラクトを含むトランスフェクション溶液 (対照細胞 ; 配列番号 53) 又は pQBI - 25 / GFP - BoNT / A - LC 発現コンストラクトを含むトランスフェクション溶液 (実験細胞) のいずれかを用いて、上述したようにトランスフェクションした。pQBI - 25 / GFP 発現コンストラクトは、そのプロモーターエレメントが配列番号 54 の GFP をコードしているポリヌクレオチドに機能的に連結している発現ベクターを含む。一晚インキュベートした後、成長培地を吸引し、200 µL の 1 x PBS を用いてそれぞれのウェルをリンスすることによって細胞を洗浄した。細胞を回収するために、PBS を吸引し、50 mM HEPES、150 mM NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EGDT、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

10

20

30

40

50

ルフェニルエーテル)及び1×COMPLETE(商標)プロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN)を含む免疫沈降リシスバッファを添加し、4 で一時間インキュベートすることによって細胞を溶解した。細胞残渣を除去するために、溶解した細胞を3,000×g、4 で10分間遠心分離し、上清を清潔なチューブに移し、タンパク質濃度がおよそ1mg/mLになるように希釈した。およそ5µgの精製したモノクローナル抗体を0.5mLの希釈した上清に添加し、4 で2時間インキュベートした。一次抗体をインキュベートした後、およそ50µLの固定化プロテインG(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)を希釈した上清に添加し、4 で1時間インキュベートした。0.5mLの免疫沈降リシスバッファを添加し、タンパク質Gを沈殿させるために300×g、4 で1分間遠心分離し、上清を移すことにより、インキュベートした上清を3回、それぞれの回につき30分間洗浄した。洗浄した後、沈殿物を30µLの1×SDSローディングバッファ中に再懸濁し、試料を95 まで5分間加熱した。開裂していないSNAP-25<sub>206</sub>基質及び開裂したSNAP-25<sub>197</sub>産物の両方の存在を検出するために、それぞれの回収した試料の一部を、1:1,000に希釈した - SNAP-25ポリクローナル抗体血清(実施例Vを参照)を一次抗体として用い、1:20,000に希釈したウサギ - IgG西洋ワサビペルオキシダーゼ(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)を二次抗体として用いた以外は実施例Iに記載したように、ウエスタンブロットによって解析した。表21は免疫沈降解析によってSNAP-25<sub>197</sub>-開裂産物を特異的に沈降させた - SNAP-25抗体を含む腹水を示す。免疫沈降解析は、クローン2E2A6及び3C1A5由来の腹水が、SNAP-25<sub>206</sub>開裂していない基質と比較した場合にこの開裂産物を主に認識することを可能にする、SNAP-25<sub>197</sub>開裂産物への高い結合特異性を有する - SNAP-25モノクローナル抗体を合成することを示した。

【表21】

クローン	細胞を用いたアッセイ		免疫組織化学		免疫沈降	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
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

【0245】

5. -SNAP-25モノクローナル抗体の結合親和性の評価。

SNAP-25<sub>197</sub>開裂産物又はSNAP-25<sub>206</sub>開裂していない基質のいずれかに対して高い結合特異性を示す -SNAP-25モノクローナル抗体の結合親和性を決定するために、結合親和性アッセイを、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)を用いたBIACORE 3000装置上で行った。解析は、10mM HEPES(pH7.4)、150mM 塩化ナトリウム、3mM EDTA、0.005%(v/v)界面活性剤P20を含むHBS-E P緩衝液を用い、25 、流速10µL/分で行った。標準的なアミンカップリングを用い、CM5センサーチップの表面に配列番号5のアミノ酸134~197(SNAP-25<sub>134-197</sub>)又は配列番号5のアミノ酸134~206(SNAP-25<sub>134-206</sub>)を含むSNAP-25ペプチドを共有結合させた。簡潔に説

明すると、 $0.2 \text{ M}$  1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド及び $0.05 \text{ M}$  N-ヒドロキシコハク酸イミドの混合液を7分間注入することによってCM5チップを活性化し；その後SNAP-25ペプチドを、20分かけて流速 $10 \mu\text{L}/\text{分}$ で $10 \text{ mM}$  酢酸ナトリウム ( $\text{pH} 4.0$ ) 中に注入し；そして $1 \text{ M}$  エタノールアミン塩酸塩、 $\text{pH} 8.5$ を7分間注入することにより反応していないコハク酸イミドエステルをブロックした。チップ上の固定化量のSNAP-25<sub>134-197</sub>又はSNAP-25<sub>134-206</sub>は、反応単位で $100 \sim 150$ の上昇(約 $0.10 \sim 0.15 \text{ ng}/\text{mm}^2$ )を反映した。結合時間を10分、解離時間を20分として、クローン1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5、及び3C3E2から生産した腹水又は精製したモノクローナル抗体を含む抗体試料、並びに市販されているSNAP-25抗体のいずれかをCM5チップの表面に流した。 $10 \text{ mM}$  グリシン-HCl ( $\text{pH} 2.5$ )を流速 $15 \mu\text{L}/\text{分}$ で1分間注入することにより、解析間で表面を再生した。センサーグラム曲線を、BIAevaluation 3.0ソフトウェアを用いて1:1の動的結合モデルにフィッティングさせた。

10

#### 【0246】

結果は、2E2A6及び3C1A5の両方が、SNAP-25開裂していない基質よりも開裂したSNAP-25<sub>197</sub>産物に高い特異性を有することを示す(表22)。MC-6050及びMC-6053の結合親和性と比較した場合、これら市販の抗体と比べ、1D3B6はおよそ10倍高いSNAP-25開裂産物に対する平衡解離定数を有した(表22)。興味深いことに、これら市販の抗体と比べて、2E2A6はわずかに低いSNAP-25開裂産物に対する平衡解離定数のみを有した( $0.405 \text{ nM}$ 対 $0.497$ 及び $0.508$ )(表22)。これら市販のSNAP-25抗体はいずれもSNAP-25開裂産物を選択的に認識せず(表21)、それら選択性の達成に部分的には問題のある、 $0.5 \text{ nM}$ よりも低い平衡解離定数を示した。同様に、MC-6050及びMC-6053の結合親和性と比較した場合、2E2A6は少なくとも約1倍遅いオフレート/解離定数( $6.74 \times 10^{-5}$ 対 $8.82 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 及び $1.18 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )(表22)を有した。このことはさらに、SNAP-25開裂産物に対する選択的な結合を達成するには部分的に問題のある、約 $8.82 \times 10^{-4}$ よりも低いオフレート/解離定数を示すことを示唆する。この結果は、 $5.78 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ のオフレート/解離定数を有した1D3B8の結果と一致する(表22)。

20

30

【表 2 2】

SPR 指標	1D3B8		2E2A6	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>a</sup>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>b</sup>
Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1.06 × 10 <sup>6</sup>	—	1.70 × 10 <sup>6</sup> (1.66 × 10 <sup>5</sup> )	— (—)
Kd (s <sup>-1</sup> )	5.78 × 10 <sup>-5</sup>	—	1.53 × 10 <sup>-4</sup> (6.74 × 10 <sup>-5</sup> )	— (—)
KD (nM)	0.050	—	0.090 (0.405)	— (—)
SPR 指標	3C1A5		2C9B10	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>c</sup>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>d</sup>
Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2.17 × 10 <sup>5</sup>	—	1.15 × 10 <sup>4</sup>	—
Kd (s <sup>-1</sup> )	2.88 × 10 <sup>-4</sup>	—	3.11 × 10 <sup>-4</sup>	—
KD (nM)	1.33	—	27.1	—
SPR 指標	MC-6050		MC-6053	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1.78 × 10 <sup>6</sup>	3.06 × 10 <sup>2</sup>	2.32 × 10 <sup>6</sup>	1.06 × 10 <sup>2</sup>
Kd (s <sup>-1</sup> )	8.82 × 10 <sup>-4</sup>	6.07 × 10 <sup>-3</sup>	1.18 × 10 <sup>-3</sup>	2.56 × 10 <sup>-5</sup>
KD (nM)	0.497	19,800	0.508	240

<sup>a</sup> 10分間結合させた後、 $\alpha$ -SNAP-25モノクローナル抗体1D3B8をCM5センサーチップの表面を通過させた場合、125nMまでは結合が見られなかった。

<sup>b</sup> 10分間結合させた後、 $\alpha$ -SNAP-25モノクローナル抗体2E2A6をCM5センサーチップの表面を通過させた場合、10 $\mu$ Mまでは結合が見られなかった。

<sup>c</sup> 10分間結合させた後、 $\alpha$ -SNAP-25モノクローナル抗体3C1A5をCM5センサーチップの表面を通過させた場合、100nMまでは結合が見られなかった。

<sup>d</sup> 10分間結合させた後、 $\alpha$ -SNAP-25モノクローナル抗体2C9B10をCM5センサーチップの表面を通過させた場合、100nMまでは結合が見られなかった。

10

20

## 【0247】

6つの異なる抗体を比較するために、BIA evaluation 4.1ソフトウェアからのプログラムを用いて、それぞれのオンレート(k<sub>a</sub>)及びオフレート(k<sub>d</sub>)を標準化した。オンレートの比較用に、まず最初に再生部分及び注入によるスパイク状のノイズを除去することによってデータを個々にトリミングし、その後0~100スケールに標準化した。オフレートの比較については、注入のストップ/トップポイントまでデータを標準化した。この解析は、2C9B10がその他の抗体よりもかなり遅いオンレートを有し(図7A)、MC-6053がその他の抗体よりもかなり早いオフレート(解離)を有したことを示した(図7B)。MC-6053の早いオフレートは、洗浄の工程においてこの抗体が基質抗原への結合を維持することが難しいため、この抗体が本明細書において開示した方法においてはうまく機能しないことを示す。

30

## 【0248】

6. 単離した  $\alpha$ -SNAP-25モノクローナル抗体のエピトープのシーケンシング

40

BONT/A開裂部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基に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した  $\alpha$ -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及び3C3E2由来の  $\alpha$ -SNAP-25モノクローナル抗体の可変重(V<sub>H</sub>)及び可変軽(V<sub>L</sub>)鎖をコードしているポリヌクレオチド分子のシーケンシングを行った。標準的なプロトコルを用いてそれぞれのハイブリドーマからmRNAを抽出、精製し、オリゴdT抗センスプライマー又は遺伝子特異的(マウスIgG1 CH及びカッパCL)抗センスプライマーのいずれかを用いてcDNAへと逆転写した。抗体のアイソタイプを決定するために、cDNA生産後、マウス及びヒト定常ドメイン特異的ブラ

50

イマーを用いてPCRによってcDNAを増幅した。cDNAからの可変ドメインを増幅するために、 $V_H$ 及び $V_L$ 縮重プライマーを用いた。5' RACE用に、ホモポリマーdCTPテイルをcDNAの3'末端に付加した。その後、オリゴdGセンスプライマー及び遺伝子特異的(CH/KC)抗センスプライマーを用いて重鎖及び軽鎖を増幅した。シグナルペプチド、可変ドメイン及び定常ドメインの配列に含まれるPCR産物は抗センスプライマー次第であった。小断片を除去するためにPCR産物をゲルを用いて精製しそしてシーケンシング用に平滑又はTAベクターにクローニングした。それぞれの鎖につき、5つの個別のクローンをシーケンシンし、 $V_H$ 鎖及び $V_L$ 鎖及びコンセンサス配列のアライメントを作成した。 $V_H$ 及び $V_L$ アミノ酸配列を決定する方法は、引用することによりそのそれぞれの全文が本明細書に組み入れられる、例えば、Roger A. Sa  
bbadini, et al., Novel Bioactive Lipid D  
erivatives and Methods of Making and Usi  
ng Same, 米国特許第2007/0281320号; 及びPeter Amers  
dorfer, et al., Molecular Characterizati  
on of Murine Humoral Immune Response to  
Botulinum Neurotoxin Type A Binding Doma  
in as Assessed by Using Phage Antibody L  
ibraries, 65(9) Infect. Immun. 3743-3752  
, に記載される。加えて、抗体の可変重( $V_H$ )鎖及び可変軽( $V_L$ )鎖をシーケンシ  
ング、及びCDR領域を同定する、市販のサービスもまた使用できる。例えば、Fusi  
on Antibodies Ltd., Northern Irelandを参照のこ  
と。一例として、3C1A5  $V_L$ 領域を、アフィニティ精製した抗体を高分解能2DE  
電気泳動により分離し、その後タンパク質をタンパク消化した後に高分解能nanoLC  
-MSMSを用いたペプチド断片化フィンガープリント解析にかけることによってアミノ  
酸配列を決定した。

#### 【0249】

本明細書において開示したハイブリドーマから生産した -SNAP-25モノクロー  
ナル抗体の $V_H$ 鎖及び $V_L$ 鎖を含むポリヌクレオチド配列は以下の通りである：1D3B  
8  $V_H$  (配列番号71)、2C9B10  $V_H$  (配列番号73)、2E2A6  $V_H$  (配列番号75)、3C1A5  
 $V_H$  (配列番号77)、3C3E2  $V_H$  変異体1 (配列番号79)、3C3E2  $V_H$  変異体2 (配列番号81)、3C3E2  
 $V_H$  変異体3 (配列番号132)、1D3B8  $V_L$  (配列番号83)、2C9B10  $V_L$  (配列番号  
85)、2E2A6  $V_L$  (配列番号87)、3C1A5  $V_L$  (配列番号89)、及び  
3C3E2  $V_L$  (配列番号91)。本明細書において開示したハイブリドーマから生産  
した -SNAP-25モノクローナル抗体の $V_H$ 鎖及び $V_L$ 鎖を含むアミノ酸配列は以  
下の通りである：1D3B8  $V_H$  (配列番号72)、2C9B10  $V_H$  (配列番号7  
4)、2E2A6  $V_H$  (配列番号76)、3C1A5  $V_H$  (配列番号78)、3C3  
E2  $V_H$  変異体1 (配列番号80)、3C3E2  $V_H$  変異体2 (配列番号82); 3  
C3E2  $V_H$  変異体2 (配列番号133)、1D3B8  $V_L$  (配列番号84)、2C  
9B10  $V_L$  (配列番号86)、2E2A6  $V_L$  (配列番号88)、3C1A5  $V$   
 $V_L$  (配列番号90)、及び3C3E2  $V_L$  (配列番号92)。ハイブリドーマ1D3B  
8、2C9B10、2E2A6、3C1A5、及び3C3E2から生産した -SNAP  
-25モノクローナル抗体の $V_H$ 及び $V_L$  CDRドメインを含むアミノ酸配列を表23  
に示す。

10

20

30

40

【表 2 3】

表23 $\alpha$ -SNAP-25モノクローナル抗体のV <sub>H</sub> 及びV <sub>L</sub> ドメインのCDR配列			
CDR	配列	クローン番号	配列番号
V <sub>H</sub> CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5	93
V <sub>H</sub> CDR 1	TFTNYVIH	3C3E2	94
V <sub>H</sub> CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95
V <sub>H</sub> CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V <sub>H</sub> CDR 2	YLFPGNGNFYNEKFKG	2C9B10 3C1A5	97
V <sub>H</sub> CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C3E2	98
V <sub>H</sub> CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V <sub>H</sub> CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5	100
V <sub>H</sub> CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
V <sub>H</sub> CDR 3	ARMDY	3C3E2var1	102
V <sub>H</sub> CDR 3	ARMGY	3C3E2var2	134
V <sub>H</sub> CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C3E2var3	135
V <sub>L</sub> CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
V <sub>L</sub> CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
V <sub>L</sub> CDR 1	KSSQSLLYTNGKTYLT	2E2A6	105
V <sub>L</sub> CDR 1	KSSQSLNTNGKTYLT	3C1A5	106
V <sub>L</sub> CDR 1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
V <sub>L</sub> CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
V <sub>L</sub> CDR 2	NAKSLAE	2C9B10	109
V <sub>L</sub> CDR 2	LVSELD	2E2A6	110
V <sub>L</sub> CDR 2	LVSCLDS	3C1A5	111
V <sub>L</sub> CDR 2	YASQSI	3C3E2	112
V <sub>L</sub> CDR 3	FQGSHPPT	1D3B8	113
V <sub>L</sub> CDR 3	QHHYGTPYT	2C9B10	114
V <sub>L</sub> CDR 3	LQSAHPPT	2E2A6	115
V <sub>L</sub> CDR 3	LQSSHFPPT	3C1A5	116
V <sub>L</sub> CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

## 【 0 2 5 0 】

本明細書において開示したハイブリドーマから生産した  $\alpha$ -SNAP-25モノクローナル抗体のV<sub>H</sub> CDRドメイン変異体を含むアミノ酸配列の非限定的な例としては、1D3B8のV<sub>H</sub> CDR1変異体、配列番号118；2C9B10、2E2A6及び3C1A5 V<sub>H</sub>のV<sub>H</sub> CDR1変異体、配列番号119；3C1A5 V<sub>H</sub>及び3C3E2変異体3のV<sub>H</sub> CDR1変異体、配列番号120；1D3B8及び2E2A6のV<sub>H</sub> CDR2変異体、配列番号121；2C9B10及び3C1A5 V<sub>H</sub>のV<sub>H</sub> CDR2変異体、配列番号122；3C1A5 V<sub>H</sub>及び3C3E2変異体3のV<sub>H</sub> CDR2変異体、配列番号123；1D3B8及び2C9B10のV<sub>H</sub> CDR3変異体MDY；2E2A6及び3C1A5 V<sub>H</sub>のV<sub>H</sub> CDR3変異体MGY；及び3C1A5 V<sub>H</sub>及び3C3E2変異体3のV<sub>H</sub> CDR3変異体、配列番号124が挙げられる。本明細書において開示したハイブリドーマから生産した  $\alpha$ -SNAP-25モノクローナル抗体のV<sub>L</sub> CDRドメイン変異体を含むアミノ酸配列の非限定的な例としては、1D3B8のV<sub>L</sub> CDR1変異体、配列番号125；2C9B10のV<sub>L</sub> CDR1変異体、配列番号126；2E2A6のV<sub>L</sub> CDR1変異体、配列番号127；3C1A5のV<sub>L</sub> CDR1変異体、配列番号128；3C3E2のV<sub>L</sub> CDR1変異体、配列番号129；1D3B8のV<sub>L</sub> CDR2変異体KVS；2C9B10のV<sub>L</sub> CDR2変異体NAK；2E2A6のV<sub>L</sub> CDR2変異体LVS；3C1A5のV<sub>L</sub> CDR2変異体YAT；及び3C3E2のV<sub>L</sub> CDR2変異体YASが挙げられる。

## 【 0 2 5 1 】

## 実施例 V I I I

B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基に自由な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 - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の作成。

以下の実施例は、B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基に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 - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体をどのように作成したかを説明する。

## 【 0 2 5 2 】

S N A P - 2 5 開裂産物の B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基にカルボキシル末端を含むエピトープに結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を作成するために、S N A P - 2 5 開裂産物抗原として 1 0 残基のペプチド C G G G R I D E A N Q ( 配列番号 4 6 ) を設計した。このペプチドは、K L H に結合する N 末端システイン残基、ヒト S N A P - 2 5 の 1 9 1 ~ 1 9 7 番目のアミノ酸 ( 配列番号 5 ) に連結した G - s p a c e r f l e x i b l e s p a c e r ( G G G ) 及びカルボキシル化 C 末端グルタミンを含む。B l a s t 検索により、このペプチドが S N A P - 2 5 のみに対して高い相同性を有し、神経細胞におけるその他のタンパク質とはほぼ交差反応しないことが明らかになった。疎水性親水性指標、タンパク質表面確率、可撓性のある領域、及び好ましい二次構造、それに続く特定の配向、並びに選択したペプチド配列の表出を決定するために、コンピューターアルゴリズムを用いて、配列を注意深く精査した。免疫原性を高めるために、ペプチドを合成し、キーホールリンペットヘモシアニン ( K L H ) に結合させた。動物を免疫する前に、細胞溶解物中に存在するタンパク質に対する免疫活性を有さない動物を同定するため、ウエスタンブロットにおいて候補細胞株由来の細胞溶解物に対してナイーブなウサギを最初にスクリーニングした。このペプチドを用いて、最初にスクリーニングを行った 2 匹のウサギを免疫し、約 8 週間中 3 回の免疫化の後に、試験のためにウサギから採血した。血液を凝固させるために、4 で 6 0 分間インキュベートした。細胞残渣を沈殿させるために、凝血塊を 1 0 , 0 0 0 x g、4 で 1 0 分間遠心分離した。得られた血清試料を 5 0 μ L ずつにわけ、使用まで - 2 0 で保存した。

## 【 0 2 5 3 】

S N A P - 2 5 開裂産物の B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基にカルボキシル末端を含むエピトープに結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を作成するために、本明細書において開示したその他の S N A P - 2 5 抗原に基づく同様の方法を用いる。例えば、配列番号 4 7 の S N A P - 2 5 抗原を、配列番号 4 6 の S N A P - 2 5 抗原の代わりに K L H に結合させることができる。別の例として、配列番号 3 8 の S N A P - 2 5 抗原由来のヒト S N A P - 2 5 の 1 9 1 ~ 1 9 7 番目のアミノ酸を、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 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、又は配列番号 4 4 で置換することができる。

## 【 0 2 5 4 】

2 . - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の存在のスクリーニング。

B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基に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 - 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 I I I に記載したように、抽出したウサギ血清を用いた比較 E L I S A 及び細胞を用いた開裂アッセイを行った。両方のウサギから得られた血清は、B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基に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 - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を含んだ。- S N A P - 2 5 ウサギポリクローナル抗体を N T P 2 2 及び N T P 2 3 と表した。

## 【 0 2 5 5 】

3 . - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の精製。

B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基にカルボキシル末端を有する S N A P -

10

20

30

40

50

25 抗原に選択的に結合することができる - S N A P - 25 ポリクローナル抗体を精製するために、ウサギ血清から得られた N T P 2 2 及び N T P 2 3 抗体を配列番号 4 6 の S N A P - 25 抗原を含むアフィニティ精製した。

【 0 2 5 6 】

4 . - S N A P - 25 ポリクローナル抗体の結合特異性の評価。

B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基にカルボキシル末端を有する S N A P - 25 抗原に選択的に結合することができる - S N A P - 25 ポリクローナル抗体の結合特異性を評価するために、精製した N T P 2 2 及び N T P 2 3 - S N A P - 25 ポリクローナル抗体を、実施例 I I I に記載したような開裂産物を検出するための細胞を用いた活性アッセイ、免疫細胞化学及び免疫沈降に用いた。細胞を用いた開裂アッセイ、免疫細胞化学解析及び免疫沈降解析の全ては、N T P 2 2 及び N T P 2 3 - S N A P - 25 ポリクローナル抗体は開裂していない S N A P - 25 と交差反応しないことを示した。従って、N T P 2 2 及び N T P 2 3 両方は、S N A P - 25<sub>206</sub> 開裂していない基質と比較してこの開裂産物を主に認識することを可能にする、S N A P - 25<sub>197</sub> 開裂産物への高い結合特異性を有する。抗原に対する親和性は、実施例 I I I に記載したように、S P R を用いて B i A c o r e で決定することもできる。

10

【 0 2 5 7 】

実施例 I X サンドイッチ E L I S A のための要素及び条件の調整

以下の実施例は、B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基にカルボキシル末端を有する S N A P - 25 に特異的な - S N A P - 25 モノクローナル抗体を用いた S N A P - 25 開裂産物の検出による、再標的化エンドペプチダーゼ活性の免疫を用いた検出法に有用なサンドイッチ E L I S A の実施に必要な要素及び条件をどのように同定し、調製したかを説明する。

20

【 0 2 5 8 】

1 . 再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞からの細胞溶解物の調製

解析のための再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞溶解物を得るために、Neuro-2a のストック培養由来の好適な密度の細胞を最小必須培地、2 mM G l u t a M A X ( 商標 ) I w i t h E a r l e ' s s a l t s 、 1 x B 2 7 サプリメント、1 x 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 を含む 50 mL の無血清培地を入れた T 1 7 5 フラスコに播種した。これらの細胞を、成長停止及び神経突起伸展などの標準的及び慣習的な形態学的な基準によって評価されるように細胞が分化するまで、37 のインキュベーター中、5% 二酸化炭素存在下でインキュベートした(およそ 2 ~ 3 日間)。対照として、Neuro-2a のストック培養由来の好適な密度の細胞を、50 mL の適切な成長培地(表 1)を入れた T 1 7 5 フラスコに播種した。これら未分化対照細胞を、50% コンフルエンスに達するまで、37 のインキュベーター中、5% 二酸化炭素存在下で生育させた(およそ 18 時間)。分化した及び未分化対照培養両方からの培地をそれぞれのウェルから吸引し、0 (未処理試料)又は 10 nM いずれかの再標的化エンドペプチダーゼを含む新しい培地で置換した。一晩インキュベートした後、細胞を洗浄し、新たに調製した T r i t o n X - 1 0 0 リシスバッファー(50 mM H E P E S 、 1 5 0 mM N a C l 、 1 . 5 mM M g C l<sub>2</sub> 、 1 mM E G T A 、 1% T r i t o n X - 1 0 0 ) 中、4 で 30 分間一定に振とうさせて溶解することにより、細胞を回収した。残渣を除去するために、卓上遠心分離機をもちいて溶解した細胞を 4000 rpm で、4 で 20 分間遠心分離した。細胞溶解物のタンパク質濃度をブラッドフォードアッセイによって測定した。

30

40

【 0 2 5 9 】

2 . サンドイッチ E L I S A のための要素の調製及び同定。

適切な補足抗体 - 検出抗体対を同定するために、11 の異なる - S N A P - 25 補足抗体及び 7 の異なる - S N A P - 25 検出抗体を含む(表 1 2)、26 種類の異なる補足及び検出抗体対の組み合わせについて、E C L サンドイッチ E L I S A 解析を行った。使用した - S N A P - 25 抗体は、本明細書において開示した 2 E 2 A 6 及び 3 C 1 A

50

5 - SNAP - 25 マウスモノクローナル抗体、本明細書において開示した SMI - 81、MC - 6050、及び MC - 6053 - SNAP - 25 マウスモノクローナル抗体、本明細書において開示した NTP23 - SNAP - 25 ウサギポリクローナル抗体、S9684 - SNAP - 25 ウサギポリクローナル抗体 (Sigma、St. Louis、MO)、H - 50 - SNAP - 25 ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology、Inc.、Santa Cruz、CA)、C - 18 - SNAP - 25 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology、Inc.、Santa Cruz、CA)、N - 19 - SNAP - 25 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology、Inc.、Santa Cruz、CA)、並びに SP12 - SNAP - 25 マウスポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology、Inc.、Santa Cruz、CA) である。

10

#### 【0260】

補足抗体溶液を調製するために、標準的なプロテインA精製プロトコルを用いて、ハイブリドーマ細胞株 2E2A6 及び 3C1A5 由来の腹水に含まれる - SNAP - 25 モノクローナル抗体、並びに - SNAP - 25 MC - 6050 及び MC - 6053 モノクローナル抗体を精製した。その他の全ての - SNAP - 25 抗体は、精製された抗体を購入した。

#### 【0261】

検出抗体溶液を調製するために、製造業者による説明書に従って (Meso Scale Discovery、Gaithersburg、MD)、適切な - SNAP - 25 抗体をルテニウム (11) - トリス - ビピリジン - (4 - メチルスルホン酸) NHS エステル標識試薬 (Meso Scale Discovery、Gaithersburg、MD) に結合させた。MSD SULFO - TAG (商標) ストック溶液を再構成した 30  $\mu$ L の蒸留水を 200  $\mu$ L の 2 mg/mL の - SNAP - 25 ポリクローナル抗体に加え、反応液を室温で 2 時間、暗所にてインキュベートすることにより、結合反応を行った。標識した抗体を標準的なスピンカラムプロトコルを用いて精製し、タンパク質濃度を標準的な比色タンパク質アッセイによって決定した。1 リットル当たりのモル濃度を決定するために、- SNAP - 25 抗体 / MSD SULFO - TAG (商標) 結合体の吸光度を、分光光度計を用いて 455 nm で測定した。検出抗体溶液を使用まで 4

20

30

#### 【0262】

SNAP - 25 開裂産物に特異的な補足抗体を含む固相担体を調製するために、およそ 5  $\mu$ L の適切な - SNAP - 25 モノクローナル抗体溶液 (1 x PBS 中に 20  $\mu$ g/mL) を、96 ウェル MSD High Bind プレートのそれぞれのウェルに添加し、溶液中の液体を蒸発させるために、生物学的に安全なキャビネット中で 2 ~ 3 時間風乾させた。次に補足抗体が結合したウェルを、2% Amer sham ブロッキング試薬 (GE Life Sciences、Piscataway、NJ) 及び 10% ヤギ血清 (VWR、West Chester、PA) を含む 150  $\mu$ L のブロッキングバッファを加え、室温で 2 時間ブロッキングした。ブロッキングしたプレートを密閉し、使用まで 4

40

#### 【0263】

開裂した SNAP - 25 産物の存在を ECL サンドイッチ ELISA を用いて検出するために、保存したプレートのウェルからブロッキングバッファを吸引し、上述したように再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞由来の溶解物 25  $\mu$ L をそれぞれのウェルに加え、プレートを 4 で一晩インキュベートした。細胞溶解物を吸引し、200  $\mu$ L 1 x PBS、0.1% TWEEN - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンラウリン酸モノエステル) でそれぞれのウェルを 3 回リンスすることにより、プレートのウェルを洗浄した。洗浄した後、1 x PBS、0.1% TWEEN - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンラウリン酸モノエステル) に溶解した

50

2% Amershamブロッキング試薬を含む25 $\mu$ Lの5 $\mu$ g/mLの検出抗体溶液をそれぞれのウェルに加え、プレートを密閉し、振とうさせながら、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、200 $\mu$ L 1xPBS、0.1%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンラウリン酸モノエステル)でウェルを3回洗浄した。洗浄した後、150 $\mu$ Lの1xリードバッファ( Meso Scale Discovery、Gaithersburg、MD)をそれぞれのウェルに加え、SECTOR(商標)Imager 6000 Image Reader(Meso Scale Discovery、Gaithersburg、MD)を用いてプレートを測定した。それぞれの抗体対について10nM用量から得られたシグナルを、それぞれの抗体対の0nM用量から得られたシグナルで割ることにより、比を算出した(表24)。これらの結果は、試験した異なる26種類の抗体対の組み合わせのうち、対1(2E2A6マウスmAb及びS9684ウサギpAb)、対4(3C1A5マウスmAb及びS9684ウサギpAb)、及び対18(S9684ウサギpAb及び2E2A6マウスmAb)の3つの抗体対のみが、試験したより高い用量に対して10:1を超えるシグナル対ノイズ比を有したことを示した。さらなるアッセイの作成のために、抗体対1を選択した。

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 1】

表 2 4 α-SNAP-5 抗体の組み合わせのスクリーニング					
抗体対番号	補足抗体	検出抗体	SNAP-25 開裂産物の検出	SNAP-25 未開裂基質の検出	シグナル／ノイズ比 (10 nM / 0 nM)
1	2 E 2 A 6 マウス mAb	S 9 6 8 4 ウサギ pAb	有	無	26.6 : 1
2	2 E 2 A 6 マウス mAb	N-19 ヤギ pAb	有	無	7.3 : 1
3	2 E 2 A 6 マウス mAb	H-50 ウサギ pAb	有	無	0.9 : 1
4	3 C 1 A 5 マウス mAb	S 9 6 8 4 ウサギ pAb	有	無	12.1 : 1
5	3 C 1 A 5 マウス mAb	N-19 ヤギ pAb	有	無	0.9 : 1
6	3 C 1 A 5 マウス mAb	H-50 ウサギ pAb	有	無	1.9 : 1
7	C-18 ヤギ pAb	S 9 6 8 4 ウサギ pAb	無	無	0.8 : 1
8	C-18 ヤギ pAb	N-19 ヤギ pAb	無	無	0.9 : 1
9	C-18 ヤギ pAb	H-50 ウサギ pAb	無	無	0.9 : 1
10	H-50 ウサギ pAb	2 E 2 A 6 マウス mAb	有	無	0.9 : 1
11	H-50 ウサギ pAb	C-18 ヤギ pAb	無	無	1.0 : 1
12	N-19 ヤギ pAb	2 E 2 A 6 マウス mAb	有	無	0.9 : 1
13	N-19 ヤギ pAb	C-18 ヤギ pAb	無	無	1.1 : 1

10

20

30

40

【表 2 4 - 2】

1 4	N T P 2 3 ウ サギ p A b	N - 1 9 ヤ ギ p A b	有	無	1 . 2 : 1
1 5	N T P 2 3 ウ サギ p A b	C - 1 8 ヤ ギ p A b	無	無	1 . 1 : 1
1 6	N T P 2 3 ウ サギ p A b	S P 1 2 マ ウス p A b	有	無	1 . 3 : 1
1 7	N T P 2 3 ウ サギ p A b	H - 5 0 ウ サギ p A b	有	無	1 . 1 : 1
1 8	S 9 6 8 4 ウ サギ p A b	2 E 2 A 6 マウス m A b	有	無	2 1 . 3 : 1
1 9	S 9 6 8 4 ウ サギ p A b	C - 1 8 ヤ ギ p A b	無	無	0 . 7 : 1
2 0	S 9 6 8 4 ウ サギ p A b	S M I - 8 1 マウス m A b	有	有	1 . 2 : 1
2 1	S M I - 8 1 マウス m A b	S 9 6 8 4 ウサギ p A b	有	有	1 . 1 : 1
2 2	S M I - 8 1 マウス m A b	N - 1 9 ヤ ギ p A b	有	有	1 . 0 : 1
2 3	S M I - 8 1 マウス m A b	C - 1 8 ヤ ギ p A b	無	無	0 . 8 : 1
2 4	S P 1 2 マウ ス p A b	C - 1 8 ヤ ギ p A b	無	無	1 . 0 : 1
2 5	M C - 6 0 5 0 マウス m A b	S 9 6 8 4 ウサギ p A b	有	有	5 . 0 : 1
2 6	M C - 6 0 5 3 マウス m A b	S 9 6 8 4 ウサギ p A b	有	有	7 . 1 : 1

10

20

30

## 【 0 2 6 4 】

実施例 X E C L サンドイッチ E L I S A を用いた、B o N T / A 軽鎖酵素活性を有する再標的化エンドペプチダーゼの免疫を用いた検出方法

以下の実施例は、E C L サンドイッチ E L I S A によって、B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基にカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 開裂産物に特異的な - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を利用した S N A P - 2 5 開裂産物の検出による、免疫を用いた再標的化エンドペプチダーゼ活性の検出方法を説明する。

## 【 0 2 6 5 】

B o N T / A 軽鎖酵素活性を有する再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞からの溶解物を調製するために、確立された細胞株由来の好適な密度の細胞を、100 μL の適切な培地を入れた 9 6 ウェル組織培養プレートのウェル中にプレATINGした。これらの細胞を、37 °C のインキュベーター中、5 % 二酸化炭素存在下で約 2 4 時間インキュベートした。細胞の培地をそれぞれのウェルから吸引し、0 (未処理試料) 又は、その再標的化エンドペプチダーゼに対する用量反応実験から決定した用量のうちの 1 つのいずれかを含む新しい培地で置換した。2 4 時間インキュベートした後、細胞を洗浄し、回収した。

40

## 【 0 2 6 6 】

- S N A P - 2 5 補足抗体溶液を調製するために、標準的なプロテイン A 精製プロトコルを用いてハイブリドーマ細胞株 2 E 2 A 6 由来の腹水に含まれる - S N A P - 2

50

5モノクローナル抗体を精製した。 - SNAP - 25 検出抗体溶液を調製するために、製造業者による説明書に従って (Meso Scale Discovery、Gaithersburg、MD)、 - SNAP - 25 ウサギポリクローナル抗体 S9684 (Sigma、St. Louis、MO) をルテニウム (11) - トリス - ビピリジン - (4 - メチルスルホン酸) NHS エステル 標識試薬 (Meso Scale Discovery、Gaithersburg、MD) に結合させた。結合反応、標識した - SNAP - 25 抗体の精製、濃度の決定及び保存は、実施例 V I に記載したように行った。

【0267】

S N A P - 2 5 開裂産物に特異的な補足抗体を含む固相担体を調製するために、およそ 5  $\mu$  L の適切な - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体 2 E 2 A 6 溶液 (1  $\times$  P B S 中に 20  $\mu$  g / m L ) を、96 ウェル M S D H i g h B i n d プレートのそれぞれのウェルに添加し、溶液中の液体を蒸発させるために、生物学的に安全なキャビネット中で 2 ~ 3 時間風乾させた。次に補足抗体が結合したウェルをブロッキングし、再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出するために、直接使用した。

【0268】

開裂した S N A P - 2 5 産物の存在を E C L サンドイッチ E L I S A を用いて検出するために、保存したプレートのウェルからブロッキングバッファーを吸引し、再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞由来の溶解物 25  $\mu$  L をそれぞれのウェルに加え、プレートを 4 で一晩インキュベートした。細胞溶解物を吸引し、200  $\mu$  L 1  $\times$  P B S、0.1% T W E E N - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンラウリン酸モノエステル) でそれぞれのウェルを 3 回リンスすることにより、プレートウェルを洗浄した。洗浄した後、1  $\times$  P B S、0.1% T W E E N - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンラウリン酸モノエステル) に溶解した 2% A m e r s h a m ブロッキング試薬を含む 25  $\mu$  L の 5  $\mu$  g / m L の検出抗体溶液をそれぞれのウェルに加え、プレートを密閉し、密閉したプレートを振とうさせながら、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、200  $\mu$  L 1  $\times$  P B S、0.1% T W E E N - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンラウリン酸モノエステル) でウェルを 3 回洗浄した。洗浄した後、150  $\mu$  L の 1  $\times$  リードバッファー (Meso Scale Discovery、Gaithersburg、MD) をそれぞれのウェルに加え、S E C T O R (商標) I m a g e r 6000 I m a g e R e a d e r (Meso Scale Discovery、Gaithersburg、MD) を用いてプレートを測定した。回収したデータを解析し、実施例 V I に記載したように E C<sub>50</sub> を算出した。オピオイド再標的化エンドペプチダーゼについて、これらの結果は、下側の漸近線へのシグナル対ノイズ比が約 15 : 1 ~ 約 20 : 1 であり、かつ、上側の漸近線へのシグナル対ノイズ比が約 180 : 1 ~ 約 300 : 1 である、平均して 1.0 n M の N o c / A (約 0.3 n M ~ 約 2.0 n M の範囲) の E C<sub>50</sub> が検出されたことを示した。

【0269】

実施例 X I C L サンドイッチ E L I S A を用いた、免疫を用いた再標的化エンドペプチダーゼ活性の検出方法

以下の実施例は、C L サンドイッチ E L I S A より、B o N T / A 開裂部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基にカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 に特異的な - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を用いて S N A P - 2 5 開裂産物の検出することによる、免疫を用いた再標的化エンドペプチダーゼ活性の検出方法を説明する。

【0270】

再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞からの溶解物及び - S N A P - 2 5 補足抗体溶液は、実施例 V I I に記載したように調製される。

【0271】

- S N A P - 2 5 検出抗体溶液を調製するために、製造業者による説明書に従って (Pierce Biotechnology、Inc.、Rockford、IL)、

10

20

30

40

50

- S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体 S 9 6 8 4 ( S i g m a、 S t . L o u i s、 M O ) を西洋ワサビペルオキシダーゼ ( H R P ) に結合させる。5 0 0  $\mu$  L の 1 m g / m L

- S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を、凍結乾燥して活性化させたペルオキシダーゼ入れたバイアルに加え、成分を混合し、その後 1 0  $\mu$  L のシアノ水素化ホウ素ナトリウムを加えることによって結合反応を行う。この反応混合液をドラフト内、室温で 1 時間、インキュベートする。反応をクエンチした後、標準的なスピнкаラムプロトコールを用いて標識した抗体を精製し、標準的な比色タンパク質アッセイによってタンパク質濃度を決定する。1 リットル当たりのモル濃度を決定するために、- S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体 / H R P 結合体の吸光度を、分光光度計を用いて 4 5 5 n m で測定する。- S N A P - 2 5 検出抗体溶液を使用まで 4 で保存する。

10

#### 【 0 2 7 2 】

S N A P - 2 5 開裂産物に特異的な - S N A P - 2 5 補足抗体を含む固相担体を調製するために、およそ 1 0 0  $\mu$  L の - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体 2 E 2 A 6 溶液 ( 1  $\times$  P B S 中に 1 m g / m L ) を、9 6 ウェル Greiner white プレートのそれぞれのウェルに添加し、4 で一晩インキュベートし、その後いくらかでも過剰な抗体溶液を捨てる。次に補足抗体が結合したウェルを、2 % Amersham ブロッキング試薬 ( GE Life Sciences、Piscataway、NJ ) 及び 1 0 % ヤギ血清 ( VWR、West Chester、PA ) を含む 1 5 0  $\mu$  L のブロッキングバッファーを加え、室温で 1 時間ブロッキングする。ブロッキングバッファーを捨て、ペーパータオル上で、反転させ、余分な液体をはじいて除去することでプレートを拭いて乾燥させる。補足抗体が結合したウェルをその後ブロッキングし、直接再標的化エンドペプチダーゼ活性の検出に用いる。

20

#### 【 0 2 7 3 】

開裂した S N A P - 2 5 産物の存在を C L サンドイッチ E L I S A を用いて検出するために、再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞由来の溶解物 5 0  $\mu$  L をそれぞれのウェルに加え、プレートを密閉し、密閉したプレートを 5 0 0 r p m で回転させながら、4 で 2 ~ 4 時間から一晩インキュベートする。細胞溶解物を吸引し、2 0 0  $\mu$  L 1  $\times$  P B S、0 . 0 5 % T W E E N - 2 0 ( 登録商標 ) ( ポリオキシエチレン ( 2 0 ) ソルビタンラウリン酸モノエステル ) でそれぞれのウェルを 3 回リンスすることにより、プレートウェルを洗う。洗浄した後、1  $\times$  P B S、0 . 1 % T W E E N - 2 0 ( 登録商標 ) ( ポリオキシエチレン ( 2 0 ) ソルビタンラウリン酸モノエステル ) に溶解した 2 % Amersham ブロッキング試薬を含む 1 0 0  $\mu$  L の 1 m g / m L - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体 / H R P 検出抗体溶液をそれぞれのウェルに加え、プレートを密閉し、密閉したプレートを 6 5 0 r p m で回転させながら、室温で 1 時間インキュベートする。検出抗体をインキュベートした後、2 0 0  $\mu$  L 1  $\times$  P B S、0 . 0 5 % T W E E N - 2 0 ( 登録商標 ) ( ポリオキシエチレン ( 2 0 ) ソルビタンラウリン酸モノエステル ) でウェルを 3 回洗う。洗浄した後、1 0 0  $\mu$  L の Super Signal E L I S A Pico 1 : 1 mixture ( Pierce Biotechnology、Inc .、Rockford、IL ) をそれぞれのウェルに加え、照度計 ( Molecular Devices、Sunnyvale、CA ) を用いて 3 9 5 n m で、プレートを測定する。回収したデータを、実施例 V I に記載したように解析し、E C <sub>50</sub> を算出する。

30

40

#### 【 0 2 7 4 】

実施例 X I I 複合体 E C L サンドイッチ E L I S A を用いた、免疫を用いた再標的化エンドペプチダーゼ活性の検出方法

以下の実施例は、S N A P - 2 5 開裂産物に特異的な - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体及び異なるタンパク質に対する二次抗体対を用いて S N A P - 2 5 開裂産物を検出することによる、免疫を用いた再標的化エンドペプチダーゼ活性の検出方法を説明する。

#### 【 0 2 7 5 】

再標的化エンドペプチダーゼ効力アッセイは、多重 E C L サンドイッチ E L I S A を用

50

いて行うことができる。それらのアッセイは、関連特許出願であり、引用することによりその全文が本明細書に組み入れられる、Ester Fernandez - Salas、et al.、Immuno - Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays、米国特許出願第12 / 403, 531号に記載され、本明細書において開示した細胞株及び再標的化エンドペプチダーゼ並びに対応する細胞株を使用して、この方法を用いることができる。

【0276】

実施例XIII 多重ECLサンドイッチELISAを用いた、免疫を用いた再標的化エンドペプチダーゼ活性の検出方法

以下の実施例は、SNAP - 25開裂産物に特異的な - SNAP - 25モノクローナル抗体及び異なるタンパク質に対する二次抗体対を用いてSNAP - 25開裂産物を検出することによる、複合体免疫を用いた再標的化エンドペプチダーゼ活性の検出方法を説明する。

【0277】

再標的化エンドペプチダーゼ効力アッセイは、多重ECLサンドイッチELISAを用いて行うことができる。それらのアッセイは、関連特許出願であり、引用することによりその全文が本明細書に組み入れられる、Ester Fernandez - Salas、et al.、Immuno - Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays、米国特許出願第12 / 403, 531号に記載され、本明細書において開示した細胞株及び再標的化エンドペプチダーゼ並びに対応する細胞株を使用して、この方法を用いることができる。

【0278】

実施例XIV ナノモル量の再標的化エンドペプチダーゼを検出するための、免疫を用いた方法

以下の実施例は、ナノモル量の再標的化エンドペプチダーゼ活性の免疫を用いた検出方法をどのように行ったかを説明する。

【0279】

1. ECLサンドイッチELISAによる、免疫を用いた再標的化エンドペプチダーゼの検出方法。

再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞由来の溶解物を調製するために、アッセイにおいて安定な、確立された細胞株由来のおよそ50,000~150,000の細胞を、100µLの適切な培地（実施例I及びII参照）を入れた96ウェル組織培養ポリ-D-リジンプレートのウェル中にプレーティングした。これらの細胞を37のインキュベーター中、5%二酸化炭素存在下で24時間インキュベートした。細胞由来の培地をそれぞれのウェルから吸引し、0（未処理試料）及び、この方法におけるそれぞれの再標的化エンドペプチダーゼにおいて記載された適切な用量反応のいずれかの再標的化エンドペプチダーゼを含む新しい培地で置換した。24時間インキュベートした後、細胞を洗浄し、回収し、又は回収の前に再標的化エンドペプチダーゼを加えずにさらに2日間インキュベートした。細胞を回収するために、培地を吸引し、1xPBSで洗浄し、50mM HEPES、150mM NaCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EGTA、1% Triton X - 100を含む30µLのリシスバッファーをそれぞれのウェルに加えることで細胞を溶解し、プレートを500rpmで回転している振とう機上、4で30分間インキュベートした。細胞残渣を沈殿させるためにプレートを4000rpmで20分間4で遠心分離し、検出工程を行うために、上清を補足抗体をコーティングした96ウェルプレートに移した。

【0280】

- SNAP - 25補足抗体溶液、 - SNAP - 25検出抗体溶液、及びSNAP - 25開裂産物に特異的な補足抗体を含む固相担体を実施例VIIに記載したように調製した。

【0281】

10

20

30

40

50

ECLサンドイッチELISA解析によって開裂したSNAP-25産物の存在を検出するために、保存していたプレートからブロッキングバッファーを吸引し、再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞由来の溶解物25-30 $\mu$ Lをそれぞれのウェルに加え、プレートを4で2時間、又は24時間インキュベートした。細胞溶解物を吸引し、200 $\mu$ L 1xPBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）でそれぞれのウェルを3回リンスすることにより、プレートウェルを洗浄した。洗浄した後、1xPBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）に溶解した2% Amershamブロッキング試薬を含む25 $\mu$ Lの5 $\mu$ g/mL -SNAP-25検出抗体溶液をそれぞれのウェルに加え、プレートを密閉しそして密閉した  
10  
プレートを振とうさせながら、室温で1時間インキュベートした。-SNAP-25検出抗体をインキュベートした後、200 $\mu$ L 1xPBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）でウェルを3回洗浄した。洗浄した後、プレートを処理し、回収したデータを、実施例VIに記載したように解析し、EC<sub>50</sub>を算出した。これらの結果は、SK-N-DZクローン細胞株#3細胞を用いた場合には、上側の漸近線へのシグナル対ノイズ比が約20:1~約300:1である、平均して1.0nM（約0.3nM~約2.0nMの範囲）のNoc/AのEC<sub>50</sub>が検出されたことを示した。さらに、AGN P33クローン細胞株#6細胞を用いた場合には、上側の漸近線へのシグナル対ノイズ比が約20:1~約500:1  
20  
である、平均して3.7nM（約2.0nM~約5.5nMの範囲）のNoc/AのEC<sub>50</sub>が検出された。ダイノルフィンAリガンドを含む再標的化エンドペプチダーゼに特異的なSK12細胞については、SK12細胞を用いて、上側の漸近線へのシグナル対ノイズ比が約10:1~約20:1である、平均8.4nM（約4.5nM~約10.0nMの範囲）のDyn/AのEC<sub>50</sub>が検出された。加えて、Neuro-2aクローン細胞株#7細胞を用いた場合には、上側の漸近線へのシグナル対ノイズ比が約20:1~約200:1である、平均8.8nM（約5.0nM~約15.5nMの範囲）のTVEMP-ガラニンのEC<sub>50</sub>が検出された。この方法は、実施例IXに記載したような複合体を用いる方法においてもまた行うことができる。

#### 【0282】

2. ECLサンドイッチELISAを用いた、免疫を用いた再標的化エンドペプチダーゼの検出方法 30

再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞からの溶解物及び -SNAP-25補足抗体溶液は、実施例VIIに記載したように調製される。 -SNAP-25検出抗体溶液及びSNAP-25開裂産物に特異的な補足抗体を含む固相担体は、実施例VIIIIに記載したように調製される。

#### 【0283】

ECLサンドイッチELISA解析を用いて開裂したSNAP-25産物の存在を検出するために、再標的化エンドペプチダーゼで処理した細胞由来の溶解物100 $\mu$ Lをそれぞれのウェルに加え、プレートを密閉し、密閉したプレートを500rpmで回転している振とう機上、4で2時間、又は24時間インキュベートする。細胞溶解物を吸引し、  
40  
200 $\mu$ L 1xPBS、0.05% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）でそれぞれのウェルを3回リンスすることにより、プレートウェルを洗う。洗浄した後、1xPBS、0.1% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）に溶解した2% Amershamブロッキング試薬を含む100 $\mu$ Lの1mg/mL -SNAP-25ポリクローナル抗体/HRP検出抗体溶液をそれぞれのウェルに加え、プレートを密閉し、密閉したプレートを650rpmで回転している振とう機上、室温で1時間インキュベートする。検出抗体をインキュベートした後、200 $\mu$ L 1xPBS、0.05% TWEEN-20（登録商標）（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンラウリン酸モノエステル）でウェルを3回洗う。洗浄した後、100 $\mu$ LのSuper 50

Signal ELISA Pico 1:1 mixture (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) をそれぞれのウェルに加え、照度計 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いて 395 nm で、プレート測定する。回収したデータを、実施例 VI に記載したように解析し、 $EC_{50}$  を算出する。この方法は、実施例 IX に記載したような複合体を用いる方法においてもまた行うことができる。

【0284】

実施例 XV 中和 再標的化エンドペプチダーゼ抗体を検出するための、免疫を用いた方法

以下の実施例は、中和 - Noc / A 抗体の存在を検出することができる免疫を用いた方法を、どのように実施したかを説明する。

10

【0285】

Noc / A をここまで、しばしば慢性である、疼痛状態の治療のために評価してきた。Noc / A をによる治療を繰り返して長期間行うことにより患者においては、免疫抵抗を引き起こす、再標的化エンドペプチダーゼへの中和 - Noc / A 抗体が発現する可能性がある。中和 - Noc / A 抗体は、標的リガンド及び / 又は再標的化エンドペプチダーゼの転位ドメイン ( $H_N$ ) に結合することにより、神経細胞及びその他の標的細胞への再標的化エンドペプチダーゼの取り込みを停止することによって再標的化エンドペプチダーゼ活性を阻害する。患者の血液中における中和 - Noc / A 抗体の存在を決定する確立されたアッセイはない。再標的化エンドペプチダーゼで治療した患者における中和抗体を検出するための細胞を用いたアッセイが作成されたとしても、それはより高価で時間のかかるものとなるだろう。

20

【0286】

中和 - Noc / A 抗体の存在又は欠如を検出するためには、本明細書において開示した、再標的化エンドペプチダーゼ活性を検出する免疫を用いた方法を用いることができる。様々な濃度の Noc / A で処理した後の SNAP - 25 開裂産物の存在量を決定するための一つの方法はウエスタブロット検出法の使用であり、その他の方法は ECL サンドイッチ ELISA 検出法を用いることである。

【0287】

中和 - Noc / A 抗体を含む試料を調製するために、Noc / A を用いて免疫したサルの血液から血清を単離し、抗体をアフィニティ精製した。Noc / A 分子に存在する標的リガンドであるノシセプチン変異体ペプチドを用いてウサギをまた免疫し、その血清を回収し、抗体をアフィニティ精製した (抗ノシセプチンポリクローナル抗体)。

30

【0288】

Noc / A を含む試料で処理した細胞由来の溶解物を調製するために、SK - N - DZ クローン細胞株 # 3 細胞及び AGN P 33 クローン細胞株 # 6 細胞をポリ - D - リジン 96 ウェルプレートに 16 ~ 18 時間播種した。1 nM の Noc / A を含む RPMI SFM (N2、B27、及び NGF サプリメントを含む) で抗ノシセプチン pAb を 0 ~ 3  $\mu\text{g} / \text{mL}$  の濃度に希釈し、混合液を室温で 1 時間、プレインキュベートした。その後溶液を細胞に加え、ECL ELISA アッセイを行う前に 24 時間インキュベートした。両方の細胞株において、1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  のこの抗ノシセプチン変異体抗体は、1 nM の Noc / A 取り込みを完全に遮断した (> 90% 阻害)。これら細胞株について、抗 Noc / A サルポリクローナル抗体もまたアッセイした。細胞を N2、B27、及び NGF を含む RPMI 成長培地を入れた 96 ウェル ポリ - D - リジンプレート中、1 ウェル当たり 100,000 個の細胞を 24 時間プレーティングした。1 nM Noc / A を含む培地中に、抗 Noc / A ポリクローナル抗体を 0 ~ 20  $\mu\text{g} / \text{mL}$  の濃度で希釈し、混合液を室温で 1 時間プレインキュベートした。その後混合液を細胞に加え、ECL ELISA アッセイを行う前に 24 時間インキュベートした。より高濃度、6 ~ 20  $\mu\text{g} / \text{mL}$  の抗 Noc / A pAb において、SK - N - DZ 細胞株では最大で 60% の阻害が見られ、AGN P 33 クローン細胞株 # 6 細胞株では約 30% 阻害が見られた。このことは、抗 No

40

50

c / A ポリクローナル抗体が結合部位に特異的でないこと、及び、試験した濃度においては部分的な遮断のみを生じる、分子のその他の部分に結合するその他の抗体を含むことによると考えられる。完全な遮断を達成するためには、より高い濃度が必要である可能性がある。

【0289】

開裂した SNAP - 25 産物の存在をウエスタンブロット解析によって検出するためには、培地をそれぞれのウェルから吸引し、50  $\mu$ L の SDS - PAGE ローディングバッファーに細胞を懸濁し、95 °C まで5分間加熱する。それぞれの回収した試料の一部を、回収した試料を12% 26 ウェル Criterion ゲル (Bio - Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて SDS - PAGE により分離すること及びウサギポリクローナル SNAP - 25<sub>197</sub> 抗体血清を一次抗体として使用すること (実施例 V 参照) 以外は実施例 I に記載したようにウエスタンブロットで解析する。結果は、ウエスタンブロットにおいて SNAP - 25 開裂産物を検出可能なバンドを生じる、再標的化エンドペプチダーゼの最低濃度を明らかにする。

10

【0290】

開裂した SNAP - 25 産物を ECL サンドイッチ ELISA によって検出するためには、培地をそれぞれのウェルから除去し、実施例 VI に記載したように細胞を溶解した。実施例 VII に記載したように SNAP - 25 補足抗体溶液、 SNAP - 25 検出抗体溶液、及び SNAP - 25 固相担体を調製した。上清を SNAP - 25 固相担体に移し、実施例 VI に記載したように ECL サンドイッチ ELISA アッセイを行った。EC<sub>50</sub> はその最大である 1 / 2 に対する再標的化エンドペプチダーゼ活性を阻害するために必要な血清の希釈であり、及び最大シグナル (シグナル<sub>最大</sub>) に対する最小シグナル (シグナル<sub>最小</sub>) の比は抗体の最高希釈を用いて得られた SNAP - 25 開裂産物シグナルを抗体の最小希釈を用いて得られたシグナルで割ることによって得られること以外は実施例 VI に記載したように、回収したデータを解析し、EC<sub>50</sub> を算出した。

20

【0291】

結果は、サル血清における中和 Noc / A 抗体の存在及びウサギ由来の ノシセプチン変異体抗体の存在が検出できたことを示す。免疫した動物由来のアフィニティ精製した抗体中でインキュベートした Noc / A 分子の活性は、抗体希釈が減少につれて低下した。Dyn / A 及び TVEMP - ガラニン化合物について、試験するそれぞれの化合物に特異的な細胞株を用いて同じアッセイを行う。

30

【0292】

実施例 XV ガラニン再標的化エンドペプチダーゼへの細胞を用いたアッセイの作成  
以下の実施例は、細胞を用いた効力アッセイの作成に必要なとされる、再標的化エンドペプチダーゼの取り込み能力を有する確立された細胞株をどのように同定したかを説明する。

【0293】

1. 候補細胞株のストック培養の成長。

細胞株を生育させるために、試験する細胞株由来の好適な密度の細胞を、30 mL の好適な成長培地 (表 25 参照) を入れた 162 cm<sup>2</sup> 組織培養フラスコ中にプレティングし、細胞が所望の密度に達するまで、37 °C インキュベーター中、5% 又は 10% 二酸化炭素存在下で生育させた。

40

【表 25】

表 25 全細胞株及びそれらそれぞれの培地の要約			
細胞型；説明；由来	完全培地 (CM) 全て Invitrogen から購入した (別段の指定がない限り)	血清使用量低減培地 (SFM) 全て Invitrogen から購入した (別段の指定がない限り)	
SiMa (ヒト神経芽腫細胞株、DSMZ # ACC 164、Braunschweig、ドイツ) SiMa H1 (SiMa 細胞由来のクローン細胞株)	RPMI 1640 (90%) ウシ胎仔血清 (FBS、10%) NEAA (0.1 mM) HEPES (10 mM) ピルビン酸ナトリウム (1 mM) ペニシリン (100 U/mL) ストレプトマイシン (100 µg/mL)	RPMI 1640 (90%) NEAA (0.1 mM) HEPES (10 mM) ピルビン酸ナトリウム (1 mM) ペニシリン (100 U/mL) ストレプトマイシン (100 µg/mL) N2 サプリメント (1 x) B27 サプリメント (1 x)	10
Neuro-2a (マウス神経芽腫：ATCC # CCI 131、Manassas、VA)	Earle's MEM (90%) ウシ胎仔血清 (FBS、10%) NEAA (0.1 mM) HEPES (10 mM) ピルビン酸ナトリウム (1 mM) ペニシリン (100 U/mL) ストレプトマイシン (100 µg/mL)	EMEM (90%) NEAA (0.1 mM) HEPES (10 mM) ピルビン酸ナトリウム (1 mM) ペニシリン (100 U/mL) ストレプトマイシン (100 µg/mL)	20
PC12 ラット褐色細胞腫 (ATCC # CRL-1721)	RPMI 1640 (90%) 透析 FBS (5%) ウマ血清 (10%) HEPES (10 mM) ピルビン酸ナトリウム (1 mM) D-グルコース (0.5%、シグマ) ペニシリン (100 U/mL) ストレプトマイシン (100 µg/mL) N2 サプリメント (1 x)	分化培地： RPMI 1640 (90%) HEPES (10 mM) ピルビン酸ナトリウム (1 mM) D-グルコース (0.5%、シグマ) ペニシリン (100 U/mL) ストレプトマイシン (100 µg/mL) N2 サプリメント (1 x) ウシ血清アルブミン (0.2% w/v) NGF (50 ng/mL、Promega)	30
P19 マウス胚性癌腫 (ATCC # CRL-1825)	アルファ MEM (90%) ウシ血清 (7.5%) FBS (2.5%) ペニシリン (100 U/mL) ストレプトマイシン (100 µg/mL)	アルファ MEM (90%) FBS (2.5%) ペニシリン (100 U/mL) ストレプトマイシン (100 µg/mL)	40
NEAA：非必須アミノ酸、MEM：最小必須培地、DMEM：ダルベッコMEM、EMEM：Earle's MEM。 PC-12 細胞は分化培地では分化したが SFM では分化しなかったことに注意されたい。			

## 【0294】

2. ガラニン TVEMP - ガラニン化合物感受性における市販の細胞株のスクリーニング

対応する化合物で処理した後のSNAP25の開裂を測定することにより、TVEMP-ガラニン化合物に対するそれらの感受性について、市販の細胞株をスクリーニングした。様々なTVEMP-ガラニン化合物をスクリーニング及び試験に用いた。PC-12、Neuro-2a、SiMa、及びP19細胞を無血清培地中に3日間、又はCM中に1日プレATINGした。これらの分化した及びナープ細胞を、0及び75 nM濃度のTVEMP-ガラニン バッチAで18時間処理した。TVEMP-ガラニン バッチAは、開裂したSNAP25の存在が上昇したことによって見られるように、PC-12及びNeuro-2a細胞の両方において活性を示し、及び分化した条件におけるNeuro-2a細胞がナープ細胞よりもガラニンリガンドを有するTVEMP化合物に対してより感受性であることを示した。細胞活性の順位は、PC-12が最も高い活性を有し、続いてNeuro-2a、最後がSiMa細胞であることを示す。取り込みがこれらガラニン再標的化化合物に特異的かどうかを決定することが必要であり、さらに細胞をガラニンリガンドを含まない化合物を用いて試験することが重要であった。Noc/Aはノシセプチン変異体リガンドを含む再標的化化合物であり、及びLH<sub>N</sub>/A(陰性対照)は結合ドメインを欠損した化合物である。LH<sub>N</sub>/Aの取り込みは非特異的であり、及び細胞株が再標的化化合物の取り込みに対して特異性を有する場合、TVEMP-ガラニン化合物よりも有意に低い活性を有するはずである。既に、Noc/AがSiMa細胞において特異的な取り込みを有することが示されていたため、試験細胞株に対する基線として用いた。適した細胞株はLH<sub>N</sub>/A及びNoc/A化合物の低い取り込みを示し、かつ、TVEMP-ガラニン化合物の高い取り込みを示すものである。この実験から得られた結果を表26に示す。

10

20

30

40

【表 26】

		TVEMP-ガラニン バッチ A	TVEMP-ガラニン バッチ B	LH <sub>N</sub> /A	No c/A
濃度 (mg/mL)		0.168	0.175	1.63	1.00
EC <sub>50</sub> 値 (nM)	PC-12、ナイーブ	73.4 ± 10.7	105.6 ± 16.0	> 200	72.9 ± 26.9
	SiMa、ナイーブ	138.6 ± 43.9	133.8 ± 24.2	> 300	48.3 ± 18.1
	Neuro-2a、ナイーブ	122.4 ± 15.7	116 ± 17.5	> 200	> 150
	SiMa、分化一晩後	> 400	> 150	> 400	16.1 ± 11.9
	Neuro-2a、分化4日後		34.5 ± 7.5	39.7 ± 5.6	105.9 ± 44.3
	SiMa、分化4日後	101.8 ± 20.5	65.3 ± 7.8	> 150	88.7 ± 23.3
様々な細胞株及び成長/分化条件においてTVEMP-ガラニン バッチA及びB、並びにLH <sub>N</sub> /A及びNo c/A対照を試験した。要約チャートは試験したそれぞれの化合物の詳細及びEC <sub>50</sub> 値を示している。					

10

20

## 【0295】

結果は、TVEMP-ガラニン バッチA及びTVEMP-ガラニン バッチBは試験した細胞株における陰性対照と同等の、又は1~2倍のみ高い活性のプロット、並びにEC<sub>50</sub>値を有したことを示す。このデータは、ナイーブ細胞が十分に感受性ではないこと、及びこれらの細胞をガラニン受容体タンパク質GalR1又はGalR2受容体をコードしているプラスミドでトランスフェクションする必要があることを意味する。

30

## 【0296】

3. GalRを用いたPC-12、Neuro-2a、及びSiMa細胞の安定なトランスフェクション。

トランスフェクションの1日前、6ウェル コラーゲンIV コーティングプレート(カタログ番号54554:BD Biosciences)(SiMa、PC-12)又は6ウェル コスタープレート(カタログ番号3516:Corning)(Neuro-2a)のいずれかに、0.5 × 10<sup>6</sup>細胞/ウェルの密度で細胞を播種した。トランスフェクションは、12 µLのLipofectamine(商標)2000(カタログ番号52758、Invitrogen)を250 µL Opti-MEM(登録商標)I血清使用量低減培地(カタログ番号3195、Invitrogen)中に希釈し、その後室温で5分インキュベートすることにより行った。4 µgのGalRプラスミドDNAを250 µL Opti-MEM(登録商標)I血清使用量低減培地中の0.4 µg pAd Vantage(商標)ベクター(1 mg/mL、カタログ番号E1711、Promega)と5分間混合した。5分間インキュベートした後、希釈したLipofectamine(商標)2000と希釈したプラスミドDNAを混合し、複合体を形成させるためにさらに20分間室温でインキュベートした。その間に、OPTI-MEM(登録商標)で細胞を洗浄し、0.5 mLのOPTI-MEM(登録商標)をそれぞれのウェルに加えた。20分間インキュベートした後、複合体を含む0.5 mLの希釈したLipofectamine(商標)2000と希釈したプラスミドDNAを、0.5 mLのOP

40

50

TI-MEM (登録商標)を入れたウェルに注意深く加えた。プレートを37℃で5時間インキュベートし、その後、1 mLの完全培地を加えた。翌日、培地を成長培地で48時間置換した。4日目、細胞をトランスフェクションから回収した後、成長培地を0.5 mg/mL (1:100希釈)のジェネティシン(登録商標)(カタログ番号10131: Invitrogen)を含む新しい成長培地で置換し、さらに3日間インキュベートした。トランスフェクションの7日後、細胞を成長培地及びジェネティシン(0.5 mg/mL、1:100希釈)を入れた75 cmコラーゲンIVフラスコ(カタログ番号35423: BD Biosciences)に移した。この形質転換においては、およそ90%の細胞が死に、培地交換に際して除去された。21日目まで、2日おきにジェネティシン(0.5 mg/mL、1:100希釈)を含む成長培地を交換した。

10

## 【0297】

ガラニンTVEMP化合物を取り込むことができる安定な細胞の選別のための指標は、モノクローナル2E2A6コーティングプレートを補足用に及びポリクローナルSNAP25 (Sigma、カタログ番号S9684)スルホタグ(sulfotagged)抗体を検出用に用いたECLサンドイッチELISAにおいて、TVEMP-ガラニンで処理した場合に最高のパーセンテージのSNAP25開裂を生じるクローンをスクリーニングすることである。表27中のEC<sub>50</sub>値は、TVEMP-ガラニン バッチDは、GalR1及びGalR2でトランスフェクションしたSiMa及びNeuro-2a細胞においては陰性対照と比較して少なくとも10倍高い取り込みを、トランスフェクションしたPC-12細胞においては2~4倍のみ高い取り込みを示すことを表す。トランスフェクションしたPC-12細胞がSiMa及びNeuro-2a細胞よりも低い感受性及び特異性を有するようだったため、それらをクローニングしないだろう。また、TVEMP-ガラニン化合物中のガラニン1~16merのリガンドがGalR2よりも高い親和性でGalR1受容体に結合するため、GalR1でトランスフェクションした細胞のみがクローニングされる。図は、TVEMP-ガラニンバッチC及びDがNeuro-2a GalR1において、LH<sub>N</sub>/A及び再標的化されたノシセプチン化合物TVEMP-ノシセプチンの両方よりも9~10倍高い取り込みを表すことをもまた示す。

20

## 【表27】

表27 GalR1又はGalR2受容体でトランスフェクションした、安定してトランスフェクションされた非クローンSiMa、Neuro-2a及びPC12集団における試験					
		TVEMP-ガラニン C	TVEMP-ガラニン D	LH <sub>N</sub> /A	ノシセプチン
濃度 (mg/mL)		1.260	0.303	1.46	1.00
EC <sub>50</sub> 値 (nM)	SiMa GalR1		36.2 ± 8.6	>300	
	SiMa GalR2		26.6 ± 6.7	>300	
	PC-12 GalR1		64.1 ± 19.5	202.7	
	PC-12 GalR2		>150	>300	
	Neuro-2a GalR1	32.2 ± 3.3	40.8 ± 6.0	>300	>300
	Neuro-2a GalR2	35.2 ± 3.1	46.0 ± 6.1	>300	>300

30

40

## 【0298】

選別された非クローン集団は、それらが異なるレベルの受容体を発現している細胞の混合物を含み、かつ、これらの集団が経時的に変化する可能性があるために習慣的に用いるには適さない細胞集団である。単一の細胞由来の安定な細胞株を得るために、希釈性クローニング方法を開始した。21日目に、トランスフェクションした細胞おトリプシン処理し、ニードルを用いて分離し、計測した。残りのトランスフェクションした細胞株は今後の使用のために凍結した。ジェネティシン(0.5 mg/mL、1:100希釈)を含む成長培地中に10細胞/mLになるまで細胞を連続して希釈した。1細胞/ウェルの密度になるように、100 µL/ウェルで、2 x 96ウェルコラーゲンIVコーティングプレ

50

ート (SiMa、PC-12) 又は 2 × 96 ウェルコスタプレート (Neuro-2a) のいずれかをプレATINGした。プレートをインキュベーター中に戻し、コロニーを形成させるために 2 週間放置した。2 週間後 (35 日目)、ウェルの底部に形成された単一のコロニーの存在について、ウェルを注意深く確認した (複数のコロニーについてウェル全体を注意深く確認した)。ウェルに単一の細胞集団があると同定した場合には、唯一の細胞集団が存在していることを確認するためにそのウェル全体を注意深く精査した。その単一集団の写真を撮影した。複数の集団があるという疑問がある場合には、そのウェルを選択しなかった。36 日目に、選択したクローンを TrypLE を用いて分離し、トリプシン反応を停止させるために ジェネティシン (0.5 mg/mL、1:100 希釈) を含む 0.5 mL の完全培地を加えた。この全量を 6 ウェルプレートに移し、ジェネティシン (0.5 mg/mL、1:100 希釈) を含む 3.0 mL の追加の完全培地を用いてさらに希釈した。クローンを 90% コンフルエンスまで生育させ、その後再度トリプシン処理し、ジェネティシン (0.5 mg/mL、1:100 希釈) を含む 10.0 mL の完全培地を入れた 75 cm コラーゲン IV 又は コスターフラスコに移した。細胞が再度 90% コンフルエンスに達した時点で、細胞を保存のために 3 本のクライオバイアルに充填するため、又は ガラニン再標的化合物における ELISA アッセイにおけるスクリーニングのためのいずれかに用いた。

#### 【0299】

独立した試験を行う 2 つのオペレーターを用いてこれらクローンを試験するためには、参照化合物である TVEMP-ガラニン バッチ C を用いた。SiMa Gal R1 クロニーはゆっくりと成長したため、この時点では試験に用いることができなかった。幸運にも、Neuro-2a クロニーはより早く成長し、すぐに十分な量に達した 12 クロニーのうち 8 つを試験に用いることができた。これら Neuro-2a Gal R1 クロニー細胞を完全用量範囲の TVEMP-ガラニン化合物 (0 ~ 300 nM) を用いて試験し、これらクローニーのうち 9 つにおける結果を以下に示した。残りの 4 クロニーは非常にゆっくりと成長したため、試験しなかった。評価基準として用いるために、選択した非クローン親細胞をクローンと共にプレATINGした。TVEMP-ガラニン化合物を用いて試験した場合の、それぞれの 8 クロニーの活性並びに選択したがクローニングしなかった Neuro-2a Gal R1 細胞の活性を表 28 に示す。試験した 8 つのクローニーのうち、クローン # 4、7 及び 12 のみが満足できる EC<sub>50</sub> 値を有する TVEMP-ガラニン化合物の良い取り込みを示した。Neuro-2a Gal R1 クロニー # 1、3 及び 10 は TVEMP-ガラニン化合物を取り込まず、クローン # 5、11 及び 13 並びに非クローン集団は非常に高い EC<sub>50</sub> 値を生じたため、これら細胞を用いたさらなる試験は行わなかった。

#### 【表 28】

プレート	細胞型	EC <sub>50</sub> ± 標準誤差 (nM)	
		オペレーター 1	オペレーター 2
1	N2A 非クローン	82.1±9.6	92.0±10.8
1	N2A GALR1 クロニー # 1	>300	>300
1	N2A GALR1 クロニー # 3	>300	>300
1	N2A GALR1 クロニー # 4	39.7±3.4	39.4±6.6
2	N2A 非クローン	211.2±167.7	116.0±26.8
2	N2A GALR1 クロニー # 5	202.6±82.9	113.0±18.1
2	N2A GALR1 クロニー # 7	23.1±3.3	15.5±1.8
2	N2A GALR1 クロニー # 10	>300	>300
3	N2A GALR1 クロニー # 7	20.3 ± 1.6	38.0±6.3
3	N2A GALR1 クロニー # 11	270.0±243	247.0±101
3	N2A GALR1 クロニー # 12	43.2±5.2	57.5±14.3
3	N2A GALR1 クロニー # 13	144.1±143	184.7±15.6

#### 【0300】

#### 4. クローン細胞株におけるGalR1発現の解析

クローンのスクリーニングは、クローン#4、7、及び12のみが非クローン細胞よりも感受性であることを示した。実施例Vに記載したRT-PCR条件及び表29に記載したプライマーを用いたRT-PCRによる解析のために、これら3クローン、並びにトランスフェクションしていない親及び安定してトランスフェクションした非クローンNeuro-2a細胞からメッセンジャーRNA(mRNA)を抽出した。

【表29】

名前	配列	配列番号
GALR1 <sub>フォワード</sub>	5' 'CCCCATCATGTCATCCACCT 3'	150
GALR1 <sub>リバース</sub>	5' ATGGGGTTTCACCGAGGAGTT 3'	151
GALR2 <sub>フォワード</sub>	5' CATCGTGGCGGTGCTTTT 3'	152
GALR2 <sub>リバース</sub>	5' AGCGGGAAGCGACCAAAC 3'	153

10

【0301】

表30の結果は、トランスフェクションした非クローン細胞及びクローンは親細胞よりも非常に多量のGALR1 mRNAを有することを示す。TVEMP-ガラニン細胞スクリーニングにおいては、クローン#7がTVEMP-ガラニンに対して最も感受性であることが示された。表30によると、クローン#7はまた最も多量のGALR1 mRNAを有することが示される。Neuro-2a GalR1 クローン7(Neuro-2a#7)のCT値は最低であり、続いてクローン4、次がクローン12であった。試験した非クローンはこの時点ではクローン12に近似したCTを提供したが、しかしながら、これらの細胞は多様な濃度のGalR1受容体を含む絶えず変化している細胞集団を含むため、今後の研究のための良い集団とは考えられなかった。低いEC<sub>50</sub>値を有する3つのクローンのうち、Neuro-2aクローン GalR1クローン#12(Neuro-2a#12)が最も早く成長し、続いてNeuro-2aクローン#7、最後がNeuro-2aクローン#4であった。その遅い成長速度に加え、Neuro-2aクローン#7の感受性がクローン#4よりもかなり高かったため、その後はNeuro-2aクローン#4を試験しなかった。

20

30

【表30】

細胞株	親	非クローン	クローン4	クローン7	クローン12
平均CT	32.0	21.7	20.8	19.3	21.6
mRNA変化の倍率	1.0	1269.5	2418.7	6793.8	1332.6

40

【0302】

#### 5. Neuro-2aクローン#7及び#12のTVEMP-ガラニン化合物への感受性及び特異性の比較

2つのクローンうちの最も感受性及び特異性の高いものを同定し、最も優れたクローンからデータを確信をもって収集する目的で、2つのクローンの比較試験を行った。表31は、TVEMP-ガラニンパッチC及びLH<sub>N</sub>/Aで処理した場合のこれら2つのクローン感受性及び選択性の結果をそれぞれ示す。両方のクローンが高いシグナル対ノイズ比を

50

示す。Neuro-2aクローン#7は5.5nMのEC<sub>50</sub>を有し、一方でNeuro-2aクローン#12のEC<sub>50</sub>は68.4nMである。Neuro-2aクローン#12は0~300nMの用量範囲で試験する必要がある、Neuro-2aクローン#7は用いた最高濃度でのプラトーを誘導するために0~30nMの用量範囲で試験することができる。両方のクローンがLH<sub>N</sub>/AとTVEMP-ガラニンバッチCとの間の良好な分離を示し、Neuro-2aクローン#12は高濃度ではいくらかの非特異的取り込み示したが、Neuro-2aクローン#7は示さなかった。表にした結果に見られるように、Neuro-2a#7細胞を用いた試験における範囲はNeuro-2a#12細胞についてもより10倍低く、Neuro-2a#7においては用いる化合物がNeuro-2a#12の10分の1未満となる。比較としてLH<sub>N</sub>/Aを用いた場合には、Neuro-2a#7はNeuro-2aクローン#12よりも8倍を超えて選択的である。シグナル対ノイズ比は両方のクローンにおいて100を超え、しかしながら、細胞を用いた効力アッセイの作成には比が10であれば十分であった。Neuro-2a#7クローンのEC<sub>50</sub>は5.5nMであり、EC<sub>50</sub>が68.4nMであるNeuro-2a#12よりも約12倍低い。試験を行うためのより低い用量範囲、LH<sub>N</sub>/Aへの24倍の選択性、高いシグナル対ノイズ比、低いEC<sub>50</sub>を生じる優れた感受性、及びそれぞれの試験において必要とされるタンパク質量が少ないこと全てが、Neuro-2aクローン#7がTVEMP-ガラニン化合物に対する効力比の決定において用いられる、細胞を用いた効力アッセイを進めるためのクローンであることを意味する。

【表31】

	Neuro-2a #7	Neuro-2a #12
範囲	0~30nM	0~300nM
選択性	24倍	3倍
シグナル対ノイズ比	190	547
最大TVEMP-Galシグナルに対する最大LH <sub>N</sub> /Aシグナルのパーセンテージ	4.3%	37.6%
EC <sub>50</sub>	5.5nM	68.4nM
必要とされるタンパク質	~1μg	~10μg
Neuro-2a#7及び#12をCM中でTVEMP-ガラニン バッチC及びLH <sub>N</sub> /Aで16時間処理した。ECL-ELIZAを用いて活性を検出した。		

【0303】

実施例XVI ダイノルフィンA再標的化エンドペプチダーゼの取り込みのためのKOR-1受容体を過剰発現しているクローン細胞株の作出

以下の実施例は、標的受容体を用いたトランスフェクション及び続く細胞株のクローニングから得られた確立された細胞株由来の複数クローン細胞株をどのように解析及び比較したかを説明する。この特定の実施例は、実施例III、表9において最初に記載されたhKOR-1を用いてトランスフェクションしたクローン細胞株の同定及び解析について言及する。

【0304】

4つのAGN P33-KORクローン(クローン番号8、9、10、及び12、実施例IIIの表9)を選択し、完全用量反応が0~150nMのDyn/Aを用いて試験した。同時に、2つのSiMa-KORクローン(クローン番号12、及び16、実施例IIIの表9)を選択し、完全用量反応が0~150nMのDyn/Aで試験した。この実験においては、AGN P33-KORクローン8、9、及び12は非常に低い取り込みを生じたためにこれを捨て；AGN P33-KORクローン10は良い取り込みを示し、30.3nMのEC<sub>50</sub>が得られた。試験した2つのSiMa-KORクローンは良い

取り込みを示し、及びクローン16については26.6 nMのEC<sub>50</sub>が得られ、クローン12については11.8 nMのEC<sub>50</sub>が得られた。これら3つのクローンを次に、標的リガンドを欠損した陰性対照であるLHN/A及びNoc/A対照に対する標的Dyn/A化合物の取り込みを比較することにより、感受性及び選択性について試験した。0~150 nMの完全用量反応を用いた3つのクローン及び親SiMa細胞の比較を表32にまとめた。

【表32】

細胞株	EC <sub>50</sub> Dyn/A (nM)	EC <sub>50</sub> LHN/A (nM)	EC <sub>50</sub> Noc/A (nM)
SiMa 親	> 100	> 100	5.4
AGN P33-KORクローン10	9.7	> 150	9.4
SiMa-KORクローン16	10.6	> 100	1.6
SiMa-KORクローン12	4.65	>150	19.7

10

## 【0305】

KOR-1を用いてトランスフェクションし、Dyn/Aで処理したクローンにおいては、Dyn/A取り込みが顕著に上昇したが、親SiMa細胞は化合物の最小の取り込みを示した（陰性対照LHN/Aと同等の取り込み）。親SiMa細胞を含む全ての細胞株中にいくらかのNoc/Aが存在した。この再標的化合物に対するアッセイの作成に際して、Noc/Aの取り込みがSiMa細胞において観察されたことから、これは当然のことである。さらに、Noc/A取り込みは、この再標的化エンドペプチダーゼに対して特異的に生成したAGNP33細胞株において最も良かった。Noc/A取り込みとDyn/A化合物取り込みとの間の差はクローンSiMa-KORクローン12（SK12）細胞においてより大きかった。全てのグラフにおいて、結合ドメインが欠損すると、これら細胞株における特異的な取り込みが失われることを示す陰性対照、LHN/A、の活性が最小であり、Dyn/A化合物の取り込みが高度に特異的であることを示すSK12細胞において最低であった。これらの結果から、さらなる最適化及び解析のためにSK12クローンを選択した。

20

30

## 【0306】

ロバストで特異的、かつ、感受性のアッセイを作成するために、SK12細胞を用いて最適化研究を行った。プレーティング培地及びプレーティング密度、処理培地、及び処理時間を含む複数の指標についてアッセイした。最適化に際して得られたデータの要約を表33に示した。

【表 3 3】

表 3 3			細胞/ウェル				
使用した培地		処理時間	25000	50000	75000	100000	150000
プレーティング	処理						
完全	完全	6 hr + o/n	51.3	76	13.4	9.2	n/a
完全	完全	16 hr	21.3	19.0	4.96	4.64	n/a
完全	完全	16 hr	n/a	n/a	n/a	2.1	15.3
無血清	無血清	16 hr	n/a	n/a	n/a	9.0	12.1
完全	無血清	16 hr	n/a	10.3	5.4	8.97	8.38
完全	完全	16 hr	n/a	7.7	4.86	13.72	11.26
無血清	無血清	16 hr	n/a	11.2	8.5	8.4	9.2

10

## 【 0 3 0 7 】

表 B は、1 ウェル当たり 100,000 細胞を CM 中にプレーティングし、CM 中において化合物で処理した細胞は、1 つの実験から次の実験にかけて、EC<sub>50</sub> 値においてより大きい変動を示したが (4.6 ; 1.2 及び 13.72 nM)、1 ウェル当たり 100,000 細胞を SFM 中にプレーティングし、SFM 中で希釈した化合物で処理した細胞は最も良い曲線と一致する EC<sub>50</sub> 値 (9.0 及び 8.4 nM) を示した。今後細胞は、1 ウェル当たり 100,000 細胞で SFM 中にプレーティングされ、また SFM 中で化合物を用いて処理されるだろう。

20

## 【 0 3 0 8 】

1 ウェル当たり 100,000 細胞の SFM 中の SK12 を入れた PDL プレートに 24 時間プレーティングし、その後 SFM 中で 16 時間処理することにより、8.4 + / - 1.1 nM の最低の EC<sub>50</sub> 値及び 12 のシグナル対ノイズ比を得た。これら両方の値は、CBPA におけるこの細胞の今後の使用について満足のいくものであった。

30

## 【 0 3 0 9 】

飽和結合アッセイを用いた SK12 細胞の解析

本明細書で用いた飽和結合アッセイについては実施例 V で詳細に記載した。結合を評価するために、KOR-1 アンタゴニスト <sup>3</sup>H-ジプレノルフィンを用いて飽和結合研究を行った。全、特異的、及び非特異的結合を複数の実験で測定した。受容体と <sup>3</sup>H-ジプレノルフィンの飽和結合曲線を 2 つの独立した実験化から生成した。分子の受容体に対する結合の約 25% の結合が非特異的、及び 75% が特異的のようである。分子の受容体に対する親和性は 6.5 nM で十分である。Bmax は、SK12 細胞においては、1 細胞当たり 23 fmol の KOR-1 受容体があることを示す。

40

## 【 0 3 1 0 】

別段の指定のない限り、明細書及び請求項で用いられた構成要素の量、分子量、反応条件などの特性などを表す全ての数は、「約」という用語により、全ての例において調節されることを理解されたい。従って、反対に指定のない限り、明細書及び添付の請求項において示した数値パラメータは、本発明によって得ることが目的とされる所望の性質に依存して多様になり得る近似値である。少なくとも、請求項の範囲の等価物の原則の適用を限定する意図でなく、それぞれの数値パラメータは、少なくとも報告された有効数字の数を考慮して、かつ、一般的な丸め技術を適用することによって解釈されるべきである。本発明の広い範囲において示している数値の範囲及びパラメータが近似値であるにもかかわらず、特定の実施例において示した数値は、できるだけ正確に報告した。しかしながら、いずれの数値も、それぞれの試験した測定においてみられる標準誤差からどうしても生じる

50

、特定の誤差を本質的に含む。

【0311】

別段の指定のない限り、本明細書においては、本発明を説明する文脈で（特に以下の請求項における文脈で）用いられる「a」、「an」、「the」という用語及び類似の指示対象は単数及び複数の両方を含むように解釈され、又は文脈からそうでないことが明白である。本明細書における値の範囲の詳細は単に、その範囲内にあるそれぞれ別個の値を個別に言及する、簡潔な方法を提供する目的のためである。本明細書において別段の指定のない限り、それぞれの個別の値は、本明細書において個別に記載された通りに本明細書に組み込まれる。本明細書において別段の指定のない限り、本明細書において記載した全ての方法は任意の好適な方法によって実施することができ、又はそうでないことが文脈から明白である。本明細書において提供した、いずれの及び全ての実施例、又は例示的な言葉（例えば、「など」）の使用は単に、本発明をより明確にする目的のためだけのものであり、請求項に記載しない限り、本発明の範囲を限定するものではない。本発明の実施において必須の、請求項に記載していないいずれの要素を示す言葉は、本明細書においては記載されていないと解釈されたい。

10

【0312】

本明細書で開示した発明の別の要素、又は実施形態の分類は、限定としては解釈されない。それぞれの群のメンバーは個別に、又はその群のその他のメンバー若しくは本明細書に見られるその他の要素との任意の組み合わせにおいて記載され、及び請求され得る。便宜上及び/又は特許権の理由から、ある群の1つ以上のメンバーが、群に含まれる又は群から除かれてもよい。そのような任意の包含又は除去が生じた場合には、本明細書はその群を変更した群に含まれると見なし、そのため、添付の請求項において用いた全てのマーカッシュ群について記載した詳細を満たす。

20

【0313】

発明者らに既知の本発明の実施における最適な方法を含む、本発明の特定の実施形態を本明細書において記載した。当然のことながら、前述の明細書を読むことにより、これら記載した実施形態の変異型が当業者には明らかになるだろう。熟練した技術者は、それら変異型を適した形態として用いることを発明者らは予期し、本明細書に記載した方法以外の方法で本発明が実施されることを発明者らは意図する。従って、本発明は、適用法によって許可される通り、添付の請求項に記載した対象物の全ての変更及び等価物を含む。さらに、本明細書において別段の指定のない限り又は文脈からそうでないことが明らかでない限り、全ての可能な変異型における上述した要素のいずれの組み合わせもまた、本発明に包含される。

30

【0314】

本明細書において開示した特定の実施形態は、「からなる」又は「本質的にからなる」という言葉を使用する請求項においてはさらに限定され得る。請求項において用いられた場合、分野として又は補正に加えられたとしても、「からなる」という移行句は、その請求項において指定されていないいずれの要素、工程、又は成分を除外する。「本質的にからなる」という移行句は、指定した材料又は工程、並びに基本的な及び新規の特徴に物質的に影響を及ぼさない材料又は工程に、発明の範囲をに制限する。請求項に記載された本発明の実施形態は、本質的に又は明確に記載され、本明細書において使用可能である。

40

【0315】

さらに、本明細書を通じて、参考文献として数多くの特許及び発行された印刷物を引用した。上記で引用したそれぞれの参考文献及び発行された印刷物は、個別のその全文が引用することにより本明細書に組み入れられる。

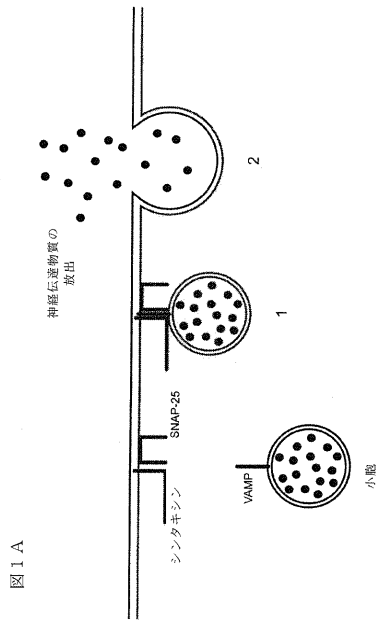
【0316】

終わりに、本明細書で開示した本発明の実施形態は、本発明の原理を説明するものであることを理解されたい。用いられる可能性のあるその他の変更もまた、本発明の範囲に含まれる。従って、非限定的な一例として、本発明の別の形態が、本明細書の教えに従って用いられる可能性がある。従って、本発明は、示し及び記載したように正確には限定され

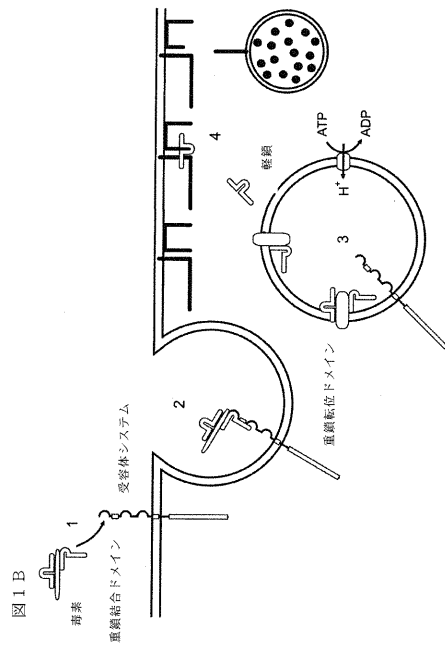
50

ない。

【図1A】

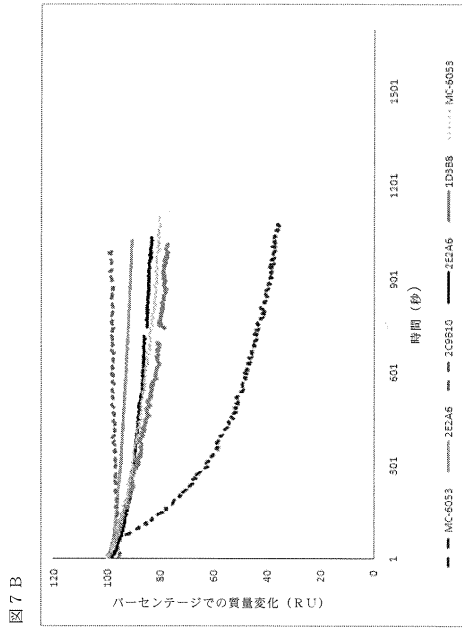


【図1B】





【 図 7 B 】



【 配列表 】

0005826635000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100119013  
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777  
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100156982  
弁理士 秋澤 慈
- (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、プリスルコーン 3 7 番
- (72)発明者 ホン・チュ  
アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州サンディエゴ、パシフィック・ショアーズ・ウェイ 1  
1 4 0 8 番
- (72)発明者 ダイアン・ディ・ホッジズ  
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 エスター・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

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特表平 1 1 - 5 0 4 0 0 6 ( J P , A )  
特表平 1 0 - 5 0 4 8 0 1 ( J P , A )  
特表 2 0 0 5 - 5 1 7 6 2 7 ( J P , A )  
特表 2 0 0 7 - 5 2 6 7 7 0 ( J P , A )  
特表 2 0 0 8 - 5 0 9 6 6 7 ( J P , A )  
特表 2 0 0 7 - 5 2 0 2 1 1 ( J P , A )  
国際公開第 2 0 0 9 / 1 1 4 7 4 8 ( W O , A 1 )

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	免疫系统调节内肽酶活性测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP5826635B2</a>	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	JP2011554260	申请日	2010-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	阿勒根公司		
申请(专利权)人(译)	Aragan公司		
当前申请(专利权)人(译)	Aragan公司		
[标]发明人	ジョアンワン ホンチュ ダイアンディホッジズ エスターフェルナンデスサラス		
发明人	ジョアン・ワン ホン・チュ ダイアン・ディ・ホッジズ エスター・フェルナンデス・サラス		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 C12Q1/37		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/34 C07K2317/92 C12N9/50 C12Q1/37 C12Y304/24069 G01N33/5014 G01N33/5035 G01N2333/33 C07K2317/56 G01N33/53 G01N33/573 G01N2333/47 G01N2333/952 G01N2333/96425 C12N9/52		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/02 C12Q1/37		
代理人(译)	山崎 一夫		
优先权	61/160217 2009-03-13 US		
其他公开文献	JP2012520470A5 JP2012520470A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本说明书公开了SNAP-25免疫应答诱导组合物，制备α-SNAP-25抗体的方法，所述抗体选择性结合包含在BoNT / A切割位点易断键的PI残基处具有羧基末端的SNAP-25的表位。±SNAP-25抗体，其选择性结合包含在BoNT / A切割位点易断裂键的P1残基处具有羧基末端的SNAP-25的表位，检测重新靶向的内肽酶活性的方法，以及检测中和的方法± - 靶向内肽酶抗体。

(21) 出願番号	特願2011-554260 (P2011-554260)	(73) 特許権者	591018268
(86) (22) 出願日	平成22年3月12日 (2010. 3. 12)		
(65) 公表番号	特表2012-520470 (P2012-520470A)		アラガン、インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成24年9月6日 (2012. 9. 6)		ALLERGAN, INCORPORATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/027244		アメリカ合衆国92612カリフォルニア
(87) 国際公開番号	W02010/105236		州アーヴィン、デュボン・ドライブ252
(87) 国際公開日	平成22年9月16日 (2010. 9. 16)		5番
審査請求日	平成25年3月11日 (2013. 3. 11)	(74) 代理人	100092093
(31) 優先権主張番号	61/160, 217		弁理士 辻居 幸一
(32) 優先日	平成21年3月13日 (2009. 3. 13)	(74) 代理人	100082005
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 稲田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治