Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-126241- -00000-0000
Fecha: 2010-10-11 17:06:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 .FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 305

Delegatura de Propieda
División de Nuevas C

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-126241

54. **TÍTULO** ANÁLISIS BASADOS EN INMUNOLOGIA DE LA TOXINA BOTULÍNICA – SEROTIPO A

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** ALLERGAN, INC

DOMICILIO IRVINE, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** JERÓNIMO CASTILLO BONILLA

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

(FORMA P-10)

14-10-2010

PETITORIO

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-126241- -00000-0000
Fecha: 2010-10-11 17:06:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 305

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE :

[X] Patente de Invención, [ ] Patente de Modelo de Utilidad,

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: ALLERGAN, INC

Dirección: 2525 Dupont Drive, T2-TH, Irvine, California 92612, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: estadounidense

Lugar de Constitución: Delaware

Teléfono: Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. [ ] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual ____

Número ____

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: JERÓNIMO CASTILLO BONILLA

Dirección: Calle 93A Nº 14-17, Oficina 311 Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: 2 363493 Fax: 2 182351

E-mail: info@pcastillopineda.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. [X] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual ____

Número 79462057 T P 104167

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: Ester FERNANDEZ-SALAS (Folio 2)

Dirección: 1710 Rocky Road, Fullerton, California 92831, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio estadounidense

(5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/037046 Fecha Marzo 13,2009

Publicación Internacional No. WO 2009/114748 A1 Fecha Septiembre 17,2009

(6) Título (54) ANALISIS BASADOS EN INMUNOLOGIA DE LA TOXINA BOTULINICA SEROTIPO A (Folio 309)

(7) Clasificación Internacional (51) C07K 16/12, G01N 33/569

(8) Prioridad

SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Marzo 14,2008	61/036.723

(9) Comprobante de pago No. ____ Fecha ____

10

ANEXOS

- [X] Comprobante de pago de la tasa de representación de la solicitud.
- [X] Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [X] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documentos de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [X] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De se el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De se el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

12 Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: JERÓNIMO CASTILLO BONILLA

FIRMA:

C.C. 79462057 T.P. 104167

Instrucciones para la presentación del os anexos, ver reverso de esta pagina.

(Continuación Inventores)

Nombre : Joanne WANG.,
Dirección : 37 Bristlecone, Irvine, California 96260, United States of America.
Nacionalidad : estadounidense

Nombre : Patton E. GARAY,
Dirección : 5503 E. Pegeantry Street, Long Beach, California 90808, United States of America.
Nacionalidad : estadounidense

Nombre : Lina J. WONG
Dirección : 6 Ingleside, Irvine, California 92620 United States of America.
Nacionalidad : estadounidense

Nombre : Dianne D. HODGES.
Dirección : 14351 Pinewood Road, Tustin, California 92780, United States of America.
Nacionalidad : estadounidense

Nombre : Key Roger AOKI
Dirección :2 Ginger Lily Court, Coto de Caza, California 92679, United States of America.
Nacionalidad : estadounidense

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

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

FOR PATENTS AND TRADE MARKS IN
COLOMBIA

Poder General **General Power of Attorney**

1 Applicant's name (1)

ALLERGAN, INC.

-1

2 Applicant's address domiciliado en (2) domiciled in (2)

2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612 USA

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

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

3 Date
4 Applicant's signature

Dado y firmado en (3).....
.....
.....

Given and signed in (3).....
Irvine, California
...April 12,...2005.....

4)Signature (s)

Rosa Mercedes Romero Pinto
Notaria Treinta
DEL CIRCULO DE BOGOTA
COLOMBIA
2010
DOCUMENTO
PRESENTACION

Martin A. Voet
Assistant Secretary

OFICINAS DE ABOGADOS

PEDRO CASTILLO PINEDA & ASOCIADOS

Bogota, Colombia / Sur América

NOTA IMPORTANTE

Al registrar este PODER GENERAL en la Oficina de Patentes, no se necesita presentar poderes especiales con cada solicitud de marca registrada.

PARA PATENTES MARCAS REGISTRADAS EN

COLOMBIA

Poder General



1. Nombre del Solicitante (1): ALLERGAN, INC.

2. Dirección del solicitante (2): 2525 Dupont Drive Irvine, CA 92612 USA

Nombra al Dr. JERONIMO CASTILLO BONILLA y/o Dra. XIMENA BONILLA PEREIRA, y/o Dr. ALVARO CASTILLO GRAU, Calle 93A No. 14-17 Oficina 311 en Bogota, Colombia, como sus representantes con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades Colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en primera o segunda instancia, la obtención de Patentes de Invención, Registro de Marcas, de Modelos y de Dibujos Industriales, de Nombres Comerciales y Enseñas, Lemas Comerciales y Denominaciones de Origen, lo mismo que traspasos, extensiones, renovaciones, cambios de nombre, registro de licencias de explotación y registro de licencias de uso referentes a tales actuaciones, cancelación de Registros de marca, a cuyo efecto les faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar la aplicación de medidas



cautelares; solicitar la nulidad de Patentes de Invención, modelos de utilidad, diseños industriales, así como la de registros de marcas ante la autoridad nacional competente; aceptar en nuestro nombre y representación la Cesión de derechos de invención y de patente de invención que se nos haga por cualquier persona, abonar todos los impuestos, cuotas y pagos determinados por la ley, recibir todos los documentos y valores dando el descargo respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos, desistir y tomar en fin todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses y en caso de presentarse oposiciones y/o observaciones para que intervengan como demandantes o como demandados, con todas las demás facultades necesarias, así como iniciar y tramitar procesos jurisdiccionales relativos a competencia desleal. Este poder comprende además las facultades de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar sustituciones, conciliar, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado en (3) Irvine, California – Abril 12 de 2005.

(Firmado)

Martin A. Voet

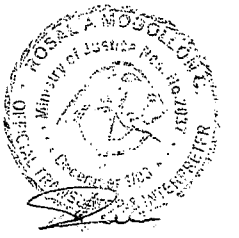
Secretario Encargado



NOTA DEL TRADUCTOR

YO, ROSALÍA MOGOLLÓN C., TRADUCTORA E INTÉRPRETE OFICIAL PARA LOS IDIOMAS ESPAÑOL – INGLÉS – ESPAÑOL, AUTORIZADA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA MEDIANTE RESOLUCIÓN # 2037 DE DICIEMBRE 1 DE 2003 CONFIRMO, POR MEDIO DE LA PRESENTE, QUE LA ANTERIOR TRADUCCIÓN CORRESPONDE CABALMENTE AL ORIGINAL ESCRITO EN INGLÉS.

MI DIRECCIÓN: CRA 15 # 99 - 13 OFICINA 306 TEL: 2188209–2766303 BOGOTÁ – COLOMBIA



State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

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

ROSA MERCEDES ROMERO PINTO NOTARIA 30 DEL CIRCULO DE BOGOTA COLOMBIA
11 OCT 2010
ESTE DOCUMENTO ES COPIA DEL ORIGINAL QUE FUE PRESENTADA PARA ESTA DILIGENCIA DE AUTENTICACIÓN

10. *Signature*

BRUCE McPHERSON
Secretary of State

BY

NP-24 A (REV. 2-05)

OSP 05 88438

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of Orange } ss.

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

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

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

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

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

WITNESS my hand and official seal.

Tamara J. Hallen
Signature of Notary Public

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

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

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

Signer(s) Other Than Named Above: none

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: Martin A. Voet

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

Signer Is Representing: Allergan, Inc.

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

Rosa Mercedes Romero Pinto Notaria Treinta DEL CIRCULO DE BOGOTA COLOMBIA
11 OCT 2010
ESTE DOCUMENTO ES COPIA DEL ORIGINAL QUE FUE PRESENTADA PARA ESTA DILIGENCIA DE AUTENTICACION

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

Estado de California

Secretaría de Estado

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: **Estados Unidos de América**

EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. Ha sido firmado por: **TAMARA J. HALLEN**

3. Actuando en calidad de: **NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA**

4. Lleva el sello/estampilla de: **TAMARA J. HALLEN, Notario Público**

Certificado

3. En: **Sacramento, California**

4. El: **21 de Abril de 2005**

5. Por: **Secretario Encargado del Estado, Estado de California**

6. No.: **236021**

7. Sello /Estampilla

10. Firma : *(Firmado)*

BRUCE McPHERSON

Secretario de Estado

Rosa Mercedes Romero Pinto Notaria 30 Notaria Treinta DEL CIRCULO DE BOGOTA COLOMBIA 11 OCT 2010 ESTE DOCUMENTO ES COPIA DEL ORIGINAL QUE FUE PRESENTADA PARA ESTA DILIGENCIA DE AUTENTICACION

NOTA DEL TRADUCTOR

YO, ROSALÍA MOGOLLÓN C., TRADUCTORA E INTÉRPRETE OFICIAL PARA LOS IDIOMAS ESPAÑOL – INGLÉS – ESPAÑOL, AUTORIZADA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA MEDIANTE RESOLUCIÓN # 2037 DE DICIEMBRE 1 DE 2003 CONFIRMO, POR MEDIO DE LA PRESENTE, QUE LA ANTERIOR TRADUCCIÓN CORRESPONDE CABALMENTE AL ORIGINAL ESCRITO EN INGLÉS.

MI DIRECCIÓN: CRA 15 # 99 - 13 OFICINA 306 TEL: 2188209–2766303 BOGOTÁ – COLOMBIA

ROSALÍA MOGOLLÓN C. Ministry of Justice Res. No. 2037 December 1/03 OFFICIAL TRANSLATOR & INTERPRETER

RECONOCIMIENTO PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES OTORGADO EN CALIFORNIA

Estado de California } S.S.

Condado **Orange**

A los 12 de Abril de 2005 ante mi Tamara J. Hallen, Notaria Pública compareció Martin A. Voet

☒ A quien conozco personalmente y sé que es la persona cuyo nombre aparece suscrito en el instrumento adjunto y reconoció ante mi haber otorgado dicho instrumento en virtud de su capacidad legal. Mediante su firma autorizó el presente instrumento en nombre propio o en nombre de la entidad en cuya representación está actuando.

EN TESTIMONIO DE LO ANTERIOR firmo y coloco mi sello oficial.

(Firma)

NOTARIO PÚBLICO

Rosa Mercedes Romero Pinto Notaria 30
Notaria Treinta
DEL CIRCULO DE BOGOTÁ
COLOMBIA
11 OCT 2010
ESTE DOCUMENTO
ES COPIA DEL ORIGINAL
QUE FUE PRESENTADA PARA ESTA
DILIGENCIA DE AUTENTICACIÓN

OPCIONAL

Aunque la información que aparece a continuación no es exigida por la ley, puede ser valiosa para las personas que se basen es este documento y puede ayudar para que no sea utilizado o anexado de manera fraudulenta a un documento distinto.

Descripción de Documento Adjunto

Nombre y tipo de documento: Poder general – Colombia

Fecha del documento: 12 de Abril de 2005 No. de hojas: 1

Signatario distinto al mencionado anteriormente: Ninguno

ROSALIA MORENO
Ministry of Justice Reg. No. 2037
December 1/05
OFFICIAL TRANSLATOR & INTERPRETER

Capacidad legal del signatario

Nombre del signatario: Martin A. Voet

☐ Funcionario corporativo – cargo: Secretario encargado

el signatario representa a: Allergan, Inc.

TAMARA J. HALLEN

Licencia # 1414872

Notario Público – California

Condado de Orange

Mi licencia vence el 29 de mayo de 2007





dro Castillo Pineda Lies

AFFIDAVIT

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

Signed this 19th day of July, 2006.

ALLERGAN, INC

By: (Signature)
Name

Martin A. Voet, Assistant Secretary

Note: Notarized and Legalized up by Apostille

Rosa Mercedes Romero Pinto Notaria Treinta DEL CIRCULO DE BOGOTA COLOMBIA
11 OCT 2010
ESTE DOCUMENTO ES COPIA DEL ORIGINAL PRESENTADA PARA ESTA DILIGENCIA DE AUTENTICACIÓN

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

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

Rosa Mercedes Romero Pinto
Notaria Treinta
DEL CIRCULO DE BOGOTA
COLOMBIA
11 OCT 2010
ESTE DOCUMENTO
ES COPIA DEL ORIGINAL
QUE FUE PRESENTADA PARA ESTA
DILIGENCIA DE AUTENTICACIÓN

10. *Signature*

Secretary of State

BY

OFFICE OF SECRETARY OF

NP-24 A (REV. 4-05)

OSP 05 90772

STATE OF CALIFORNIA

County of Orange

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

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

This 25th day of JULY 2006

Rosa Mercedes Romero Pinto Notaria Treinta DEL CIRCULO DE BOGOTÁ COLOMBIA
11 OCT 2010
ESTE DOCUMENTO ES COPIA DEL ORIGINAL QUE FUE PRESENTADA PARA ESTA LIGERACIA DE AUTENTICACIÓN

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

By _____ Deputy
ANGEL CARDENAS

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of ORANGE } ss.

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

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

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

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

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

WITNESS my hand and official seal.

Mary Lou McNown
Signature of Notary Public

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

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

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

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

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Notaría Treinta del Círculo de Bogotá Colombia
11 OCT 2006
ESTE DOCUMENTO ES COPIA DEL ORIGINAL QUE PRESENTADA PARA ESTA DILIGENCIA DE AUTENTICACIÓN

Capacity(ies) Claimed by Signer

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

Signer's Name: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

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

Signer Is Representing: _____

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

Análisis Basados en Inmunología de la Actividad de la Toxina Botulínica Serotipo A

[01] Esta solicitud de patente reivindica prioridad de conformidad con 35 U.S.C. § 119(e) con respecto a la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Serie No. 61/036,723 presentada el 14 de marzo de 2008, la cual se incorpora por este medio por referencia en su totalidad.

[02] La capacidad de las toxinas clostridiales, tales como, *por ej.*, las neurotoxinas botulínicas (BoNTs), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F y BoNT/G, y la neurotoxina tetánica (TeNT), de inhibir la transmisión neuronal se aprovechan en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y cosméticas, véase *por ej.*, William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin (Slack, Inc., 2004). Las toxinas clostridiales disponibles en el comercio como composiciones farmacéuticas incluyen preparaciones de BoNT/A, tales como, por ej., BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, Inglaterra), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Alemania), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, Corea del Sur), BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China); y preparaciones de BoNT/B, tales como, *por ej.*, MYOBLOC®/NEUROBLOC® (Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA). Como ejemplo, el BOTOX® está aprobado en la actualidad en los Estados Unidos para el tratamiento de distonía cervical en adultos para disminuir la gravedad de la posición anormal de la cabeza y el dolor del cuello asociado con distonía cervical; para el tratamiento de hiperhidrosis axilar primaria grave, que se maneja inadecuadamente con agentes tópicos; y para el tratamiento de estrabismo y blefaroespasmo asociados con distonía, incluyendo blefarosespasmo esencial benigno o trastornos nerviosos VII en pacientes de 12 años de edad y más.

[03] En la actualidad el bioanálisis LD_{50} en ratones, una prueba de letalidad, sigue siendo el "patrón oro" usado por todos las fabricantes farmacéuticos para expresar la potencia de sus preparaciones. S. S. Arnon et al., JAMA 285: 1059-1070 (2001). En efecto, las unidades en las etiquetas de las preparaciones farmacéuticas son unidades LD_{50} en ratones, y el número de animales necesarios para producir datos

15

LD_{50} estadísticamente útiles es enorme. La ventaja del bioanálisis LD_{50} en ratones es que mide todos los pasos necesarios para la captación de toxina botulínica (*por ej.*, unión de la toxina a un receptor de superficie celular, internalización del complejo toxina-receptor, traslocación de cadena ligera en el citoplasma, escisión de la cadena ligera del sustrato), en lugar de determinar simplemente la actividad para parte únicamente de este proceso de intoxicación, tal como, *por ej.*, en análisis *in vitro* que miden tan sólo la actividad enzimática de cadena ligera. Desafortunadamente, el bioanálisis LD_{50} en ratones adolece de muchas desventajas incluyendo un costo operacional elevado, debido a los grandes números de animales de laboratorio requeridos, una falta de especificidad puesto que todos los serotipos BoNT producirán el mismo final cuantificable, y el potencial de inexactitud a menos que se empleen grandes grupos de animales. Adicionalmente, los grupos de derechos de los animales han ejercido presión sobre los organismos de control en los Estados Unidos (FDA/NICEATM/ICCVAM) y Europa (MHRA y EDQM), y sobre las compañías farmacéuticas, que fabrican productos de neurotoxina botulínica, con el fin de reducir la experimentación con animales y, aún más importante, reemplazar el bioanálisis LD_{50} en ratones para la liberación de productos. Los organismos de control están comprometiendo a las compañías farmacéuticas a aplicar el principio de las tres "Rs" a la experimentación de neutotoxinas botulínicas: reducir, refinar, reemplazar. D. Straughan, *Progress in Applying the Three Rs to the Potency Testing of Botulinum Toxin Type A,* Altern. Lab. Anim. 34(3): 305-313 (2006). En años recientes, se han dado ya varios pasos para reducir y refinar el bioensayo L_{50} en ratones, con el fin de estandarizar el protocolo y producir datos más consistentes usando menos animales por análisis.

[04] Por consiguiente, un análisis de la actividad de la toxina botulínica sencillo, confiable, validado y aceptable para un organismo gubernamental, que pueda evaluar la integridad de todos los pasos necesarios en la captación de la toxina botulínica sería de valor significativo porque tal análisis no basado en animales aliviaría la necesidad de experimentación animal y todas las desventajas, costos y preocupaciones éticas asociadas con este tipo de análisis basado en animales. La presente especificación proporciona composiciones novedosas, células y métodos para analizar la actividad de una toxina botulínica A útil para varias industrias, tales como, *por ej.*, las industrias farmacéuticas y de alimentos, y ofrece también

ventajas relacionadas. Tales composiciones, células y métodos no utilizan animales vivos o tejidos tomados de animales vivos, pero pueden evaluar todos los pasos necesarios para la acción de la neurotoxina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS

[05] FIG. 1 muestra una representación esquemática del paradigma actual de liberación de neurotransmisores e intoxicación con toxina clostridial en una neurona central y periférica. FIG. 1A muestra una representación esquemática para el mecanismo de liberación de neurotransmisores de una neurona central y periférica. El proceso de liberación puede describirse como compuesto por dos pasos: 1) acoplamiento dirigido de vesículas (***"vesicle docking"***), en donde la proteína SNARE unida a vesícula de una vesícula que contiene moléculas neurotransmisoras se asocia con las proteínas SNARE unidas a membrana localizadas en la membrana plasmática; y 2) liberación de neurotransmisores, en donde la vesícula se fusiona con la membrana plasmática y las moléculas del neurotransmisor se liberan por exocitosis. FIG. 1B muestra una representación esquemática del mecanismo de intoxicación para la actividad de la toxina botulínica y tetánica en una neurona central y periférica. Este proceso de intoxicación puede describirse como compuesto por cuatro pasos: 1) unión a receptor, en donde la toxina clostridial se une a un complejo de receptor clostridial e inicia el proceso de intoxicación; 2) internalización del complejo, en donde luego de la unión de la toxina, una vesícula que contiene el complejo sistema toxina/receptor se libera por endocitosis en la célula; 3) traslocación de la cadena ligera, en donde se considera que ocurren múltiples sucesos, incluyendo cambios en el pH interno de la vesícula, formación de un poro de canal que comprende el dominio H_N de la cadena pesada de la toxina clostridial, separación de la cadena ligera de la toxina clostridial de la cadena pesada, y liberación de la cadena ligera y 4) modificación de la diana enzimática, en donde la cadena ligera de la toxina clostridial escinde proteolíticamente sus sustratos SNARE dianas, tales como, *por ej.*, SNAP-25, VAMP o sintaxina, impidiendo así el acoplamiento de las vesículas y la liberación de neurotransmisores.

[06] FIG. 2 muestra una comparación de la captación de BoNT/A en cuatro líneas celulares por análisis Western blot. FIG. 2A muestra un gráfico del producto de

escisión SNAP-25 detectado con base en la cantidad de BoNT/A usada para tratar la línea celular. Los datos se analizaron en SigmaPlot usando un modelo logístico de 4 parámetros, y se obtuvieron valores EC_{50} para cada línea celular. La clasificación (***"ranking"***) de las señales del producto de escisión SNAP-25 detectadas fue: SiMa» Neuro-2a>LA1-55n> PC12. FIG. 2B muestra las relaciones señal/ruido de las señales brutas a 300 pM vs. 0 pM, y se calcularon 1.2 pM vs. 0 pM para el análisis. Las células SiMa generaron las relaciones máximas señal/ruido y los valores EC_{50} mínimos.

[07] FIG. 3 muestra la optimización del medio de diferenciación celular para líneas celulares establecidas útiles en un método basado en inmunología de detectar la actividad BoNT/A, divulgado en la presente especificación.

[08] FIG. 4 muestra la optimización del tiempo de diferenciación celular para células que comprenden una línea celular establecida útil en un método basado en inmunología de detectar la actividad BoNT/A, divulgado en la presente especificación.

[09] FIG. 5 muestra la optimización del tratamiento BoNT/A de células que comprenden una línea celular establecida útil en un método basado en inmunología de detectar la actividad BoNT/A, divulgado en la presente especificación. Los resultados indican que se obtuvo una EC_{50} de menos de 2 pM con cualquiera de los tratamientos BoNT/A examinados.

[010] FIG. 6 muestra la sensibilidad de un método basado en inmunología de detectar la actividad BoNT/A, divulgado en la presente especificación. Los resultados indicaron que la captación de BoNT/A por las células tomó menos de un minuto antes de producir cantidades significativas de producto de escisión SNAP-25 sobre el fondo.

[011] FIG. 7 muestra la especificidad de un método basado en inmunología de detectar la actividad BoNT/A, divulgado en la presente especificación. Los resultados indican que los métodos basados en inmunología de detectar la actividad BoNT/A, divulgados en la presente especificación, pueden medir todos los pasos involucrados en la intoxicación BoNT/A.

[012] FIG. 8 muestra una curva de respuesta a dosis de células SiMa diferenciadas tratadas con un complejo BoNT/A usando un método basado en inmunología de detectar la actividad BoNT/A, divulgado en la presente especificación.

[013] FIG. 9 muestra los resultados de un análisis basado en inmunología de la actividad BoNT/A para un producto farmacéutico BoNT/A formulado usando un método basado en inmunología de detectar la actividad BoNT/A, divulgado en la presente especificación.

[014] FIG. 10 muestra la detección de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes en suero humano, usando un método basado en inmunología de detectar la actividad BoNT/A, divulgado en la presente especificación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[015] La presente especificación ofrece análisis novedosos para determinar la presencia o ausencia de una BoNT/A activa en una muestra y para determinar la actividad/potencia de una preparación BoNT/A. Los novedosos análisis basados en células, divulgados en la presente especificación, utilizan células, reactivos y métodos de detección que permiten al análisis detectar cantidades picomolares de BoNT/A en una muestra. Los análisis basados en células, divulgados en la presente especificación, reducen la necesidad de estudios de toxicidad en animales, pero sirven para analizar múltiples funciones BoNT/A, a saber, unión y captación celular de la toxina, traslocación en el citosol y actividad proteasa. Como se discute con más detalle a continuación, los novedosos métodos y composiciones pueden usarse para analizar muestras crudas y no procesadas, así como toxinas de doble cadena altamente purificadas y productos de toxinas formulados y, además, son adaptables a formatos de análisis robotizados.

[016] Por consiguiente, un aspecto divulgado en la presente especificación ofrece composiciones para producir anticuerpos α-SNAP-25 que pueden unir un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de

corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Las composiciones pueden contener un coadyuvante y una composición que incluya un antígeno SNAP-25, un transportador conectado a un antígeno SNAP-25, o un transportador conectado a un espaciador flexible enlazado a un antígeno SNAP-25, en donde el conector flexible interviene entre el antígeno SNAP-25 y el transportador. Se contempla que cualquiera y todos los antígenos SNAP-25, que desencadenan una respuesta inmunitaria que produce un anticuerpo α-SNAP-25, que puede unir un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte de BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, pueden ser útiles como un antígeno SNAP-25, incluyendo, sin limitación, un antígeno SNAP-25 derivado de una SNAP-25 de ocurrencia natural, un antígeno SNAP-25 derivado de una SNAP-25 de ocurrencia no natural y un antígeno SNAP-25 que comprende un fragmento inmunorreactivo de la SNAP-25, la SNAP-25 de una SNAP-25 de ocurrencia natural a una SNAP-25 de ocurrencia no natural. Los antígenos SNAP-25 útiles para producir anticuerpos α-SNAP-25, que pueden unir un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 de un enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, incluyen, sin limitación, antígenos SNAP-25 que comprenden un péptido SNAP-25 con una glutamina C-terminal carboxilada conectada a un péptido transportador, incluyendo, sin limitación SEQ ID NO: 38. Otras composiciones útiles para producir anticuerpos α-SNAP-25, que pueden unir un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, incluyen, sin limitación, una composición que comprende un transportador conectado a un conector flexible enlazado a un antígeno SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada, en donde el conector flexible interviene entre el antígeno SNAP-25 y el transportador. Se contempla que cualquiera y todos los coadyuvantes pueden ser útiles en tal composición, incluyendo, sin limitación, polietilen glicol (PEG), monometoxipolietilen glicol (mPEG), alcohol polivinílico (PVA - *polyvinyl alcohol*), coadyuvante de Freund completo e incompleto.

[017] Otro aspecto divulgado en la presente especificación proporciona métodos de producir un anticuerpo α-SNAP-25, que puede unir un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Aspectos de este método comprenden los

20

pasos de (a) administrar a un animal una composición divulgada en la presente especificación; (b) recoger del animal una muestra que contenga un anticuerpo α-SNAP-25 o una célula que produzca un anticuerpo α-SNAP-25; y (c) aislar el anticuerpo α-SNAP-25 de la muestra. Los métodos divulgados son útiles para elaborar anticuerpos monoclonales α-SNAP-25, que puedan unir un epítopo que comprende una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, o anticuerpos policlonales α-SNAP-25, que pueden unir un epítopo que comprende una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25.

[018] Aún otro aspecto divulgado en la presente especificación provee anticuerpos α-SNAP-25, que pueden unir un epítopo que comprende un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Tales anticuerpos α-SNAP-25 incluyen anticuerpos de ocurrencia natural y no natural, así como anticuerpos α-SNAP-25 monoclonales o anticuerpos α-SNAP-25 policlonales. Anticuerpos α-SNAP-25 monoclonales útiles como anticuerpos α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, incluyen, sin limitación, los anticuerpos α-SNAP-25 monoclonales producidos de líneas celulares de hibridoma 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2.

[019] Todavía otro aspecto divulgado en la presente especificación provee métodos de detectar actividad BoNT/A. Aspectos de este método comprenden los pasos de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que incluye BoNT/A, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A; (b) aislar de la célula tratada un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; (c) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, que puede unir un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; y (d) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; en donde la detección por el complejo

anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad BoNT/A. El anticuerpo α-SNAP-25 del paso **c** puede conectarse opcionalmente a un soporte de fase sólida.

[020] Todavía otro aspecto divulgado en la presente especificación facilita métodos de detectar actividad BoNT/A. Aspectos de este método comprenden los pasos de (a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que incluye BoNT/A, en donde la célula de una línea celular establecida puede captar una BoNT/A; (b) aislar de la célula tratada un componente SNAP-25 que comprende una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; (c) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, que puede unir un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; y (d) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; en donde la detección por el complejo anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad BoNT/A. El anticuerpo α-SNAP-25 del paso **c** puede conectarse opcionalmente a un soporte de fase sólida.

[021] Un aspecto adicional divulgado en la presente especificación proporciona métodos de determinar la inmunorresistencia BoNT/A en un mamífero. Aspectos de este método comprenden los pasos de (a) agregar una BoNT/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está examinando con respecto a la presencia o ausencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; (b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A; (c) aislar de las células tratadas un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; (d) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 que puede unir un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; (e) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; (f) repetir los pasos **a-e** con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de prueba; y (g) comparar la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso (e) con la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso (f),

en donde la detección de una cantidad menor de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso (e) relativa a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso (f) es indicativa de la presencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes. El anticuerpo α-SNAP-25 del paso **d** puede conectarse opcionalmente a un soporte de fase sólida. La muestra de control en paso **f** puede incluir igualmente una muestra de control positivo, además de la muestra de control negativo.

[022] Las toxinas clostridiales producidas por *Clostridium botulinum, Clostridium tetani, Clostridium baratii* y *Clostridium butyricum* son las más ampliamente usadas en tratamientos terapéuticos y cosméticos de humanos y otros mamíferos. Las cepas de *C. botulinum* producen siete serotipos antigénicamente distintos de toxinas botulínicas (BoNTs), los cuales se han identificado investigando brotes de botulismo en el hombre (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E y BoNT/F), en animales (BoNT/C1 y BoNT/D), o se ha aislado del suelo (BoNT/G). Aunque todos los siete serotipos de la toxina botulínica tienen una estructura y propiedades biológicas similares, cada una despliega igualmente características heterogéneas, tales como, *por ej.*, propiedades farmacológicas diferentes. En contraste, la toxina tetánica (TeNT) se produce por un grupo uniforme de *C. tetani.* Dos otras especies de Clostridia, *C. baratii* y *C. butyricum,* producen también toxinas similares a BoNT/F y BoNT/E, respectivamente.

[023] Las toxinas clostridiales son traducidas cada una como un polipéptido de cadena sencilla de aproximadamente 150 kDa, que posteriormente se divide por escisión proteolítica dentro de un bucle disulfuro por una proteasa de ocurrencia natural, tal como, *por ej.*, una proteasa de toxina clostridial endógena o una proteasa de ocurrencia natural producida en el ambiente. Este procesamiento postraduccional produce una molécula de doble cadena que comprende una cadena ligera (LC) de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada (HC) de aproximadamente 100 kDa sostenidas entre sí por un enlace disulfuro simple e interacciones no covalentes. Cada molécula de doble cadena madura comprende tres dominios funcionalmente distintos: 1) un dominio enzimático localizado en la LC que incluye una región metaloproteasa que contiene una actividad endopeptidasa dependiente de zinc, la cual reconoce específicamente componentes esenciales del aparato de liberación de neurotransmisores; 2) un

dominio de traslocación contenido en la mitad amino-terminal de la HC (H_N) que facilita la liberación de la LC de las vesículas intracelulares en el citoplasma de la célula diana; y 3) un dominio de unión encontrado en la mitad carboxilo-terminal de la HC (H_c) que determina la actividad de unión y la especificidad de unión de la toxina al complejo receptor, localizado en la superficie de la célula diana.

[024] La unión, traslocación y actividad enzimática de estos tres dominios funcionales son todas necesarias para la toxicidad. Aunque todos los detalles de este proceso no se conocen todavía con exactitud, el mecanismo general de la intoxicación celular mediante el cual las toxinas clostridiales entran a una neurona e inhiben la liberación de neurotransmisores es similar, independientemente del serotipo o subtipo. Aunque los solicitantes no desean quedar limitados por la siguiente descripción, el mecanismo de intoxicación puede describirse como conformado por cuatro pasos, como mínimo: 1) unión a receptor, 2) internalización del complejo, 3) traslocación de cadena ligera y 4) modificación de la diana enzimática (FIG. 1). El proceso se inicia cuando el dominio HC de una toxina clostridial se une a un sistema receptor específico de la toxina, localizado en la superficie de la membrana plasmática de una célula diana. Se cree que la especificidad de unión de un complejo receptor se logra, en parte, por combinaciones específicas de gangliósidos y receptores de proteína que parecen incluir claramente cada complejo receptor de toxina clostridial. Una vez unidos, los complejos toxina/receptor se internalizan por endocitosis y las vesículas internalizadas se distribuyen a vías intracelulares específicas. El paso de traslocación parece desencadenarse por la acidificación del compartimiento de la vesícula. Este proceso parece iniciar reordenaciones estructurales importantes dependientes del pH, que incrementan la hidrofobicidad, promueven la formación de poros y facilitan la separación de las cadenas ligeras y pesadas de la toxina. Una vez separadas, la endopeptidasa de cadena ligera de la toxina se libera de la vesícula intracelular en el citosol, donde parece reconocer componentes esenciales del aparato de liberación de neurotransmisores. Estas proteínas centrales, proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP - *vesicle-associated membrane protein*)/sinaptobrevina, proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-25) y sintaxina, son necesarias para el acoplamiento y fusión de las vesículas sinápticas en la terminal nerviosa y constituyen miembros de la familia de receptores de proteínas de unión al factor sensible a N-etilmaleimida

soluble (SNARE). BoNT/A y BoNT/E escinden la SNAP-25 en la región carboxilo-terminal, liberando un fragmento de nueve o veintiseis aminoácidos, respectivamente, y BoNT/C1 escinde asimismo la SNAP-25 cerca del término carboxilo liberando un fragmento de ocho aminoácidos. Los serotipos botulínicos BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G y la toxina tetánica actúan en la porción central conservada de VAMP y liberan la porción amino terminal de VAMP en el citosol. BoNT/C1 escinde la sintaxina en un sitio único cerca de la superficie de la membrana citosólica. La proteólisis selectiva de SNAREs sinápticas explica el bloqueo de la liberación de neurotransmisores causado por las toxinas clostridiales *in vivo*. Las dianas de la proteína SNARE de toxinas clostridiales son comunes a la exocitosis en una variedad de tipos no neuronales; en estas células, como en las neuronas, la actividad de la peptidasa de cadena ligera inhibe la exocitosis, véase, *por ej.*, Yann Humeau et al., *How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release,* 82(5) Biochimie. 427-446 (2000); Kathryn Turton et al., *Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility,* 27(11) Trends Biochem. Sci. 552-558. (2002); Giovanna Lalli et al., *The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons,* 11(9) Trends Microbiol. 431-437, (2003).

[025] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una composición para producir anticuerpos α-SNAP-25, que pueden unir un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Otros aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una composición que induce una respuesta inmunitaria para producir anticuerpos α-SNAP-25, que pueden unir un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Tal como se emplea en esta especificación, el término "composición que induce una respuesta inmunitaria" se refiere a una composición que contiene un antígeno SNAP-25 el cual, cuando se administra a un animal, estimula una respuesta inmunitaria contra el antígeno SNAP-25, produciendo así anticuerpos α-SNAP-25 que pueden unir un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. El término "respuesta inmunitaria" se refiere a cualquier respuesta por el sistema inmunitario de un animal a una composición que induce una respuesta inmunitaria. Respuestas inmunitarias

25

ejemplares incluyen, pero no se limitan a, inmunidad humoral celular así como local y sistémica, tal como, *por ej.*, respuestas de linfocitos T citotóxicos (***"CTL responses"***), incluyendo inducción, específica del antígeno, de CD8+ CTLs, respuestas de linfocitos T colaboradores, incluyendo respuestas proliferativas de linfocitos T y liberación de citocinas, y respuestas de linfocitos B incluyendo, *por ej.*, una respuesta que produce anticuerpos. El término "que induce una respuesta inmunitaria" se refiere a la administración de una composición, que induce una respuesta inmunitaria, o a un polinucleótido que codifica la composición que induce la respuesta inmunitaria, en donde una respuesta inmunitaria se afecta, *es decir,* se estimula, inicia o induce.

[026] Una composición comprende un antígeno SNAP-25. Tal como se emplea en esta especificación, el término "antígeno" se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmunitaria e incluye, sin limitación, péptidos, polisacáridos y conjugados de lípidos, tales, *por ej.*, lipoproteínas y glucolípidos. Tal como se emplea en esta especificación, el término "antígeno SNAP-25" se refiere a cualquier antígeno que tiene un término carboxilo en el residuo P1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, que puede provocar una respuesta inmunitaria. Un antígeno SNAP-25 usado en una composición que induce una respuesta inmunitaria tiene que ser lo suficientemente grande para ser sustancialmente único en secuencia, reduciendo en esa forma la posibilidad de producir anticuerpos que reaccionen cruzadamente contra antígenos distintos de SNAP-25. Adicionalmente, un antígeno SNAP-25 usado en una composición que induce una respuesta inmunitaria tiene que ser lo suficientemente pequeño para desencadenar tan sólo una respuesta inmunitaria sustancialmente contra una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, aumentando así la posibilidad de producir anticuerpos α-SNAP-25 que puedan distinguir una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de una SNAP-25 que carece del término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. Adicionalmente, es también muy deseable generar anticuerpos α-SNAP-25 de una secuencia única de aminoácidos en un buen rendimiento que sean reproduciblemente selectivos y que se unan con avidez aceptable, con el fin de permitir el diseño de un análisis altamente sensible.

[027] La secuencia que rodea un sitio de escisión BoNT/A presente en SNAP-25 se denota como P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5', representando P_1-P_1' el enlace escindible. Luego de la escisión por BoNT/A, los productos de escisión resultantes generados comprenden un fragmento que incluye la secuencia P_5-P_4-P_3-P_2-P_1 y un fragmento que incluye P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'. Por consiguiente, tal como se emplea en esta especificación, el término "SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A" se refiere a cualquier SNAP-25 que tenga el residuo P_1 como su aminoácido carboxilo-terminal. Por ejemplo, Q_{197}-R_{198} de SNAP-25 humana (SEQ ID NO: 5) representa el enlace escindible P_1-P_1' para el sitio de escisión BoNT/A. Como tal, "SNAP-25 que tiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A" sería cualquier producto de escisión SNAP-25 que tiene una glutamina como su aminoácido carboxilo-terminal, en donde la glutamina representa Q_{197} del enlace escindible. Como otro ejemplo, K_{204}-H_{205} de la SNAP-25 de *Torpedo marmorata* (SEQ ID NO: 16) representa el enlace escindible P_1-P_1' para el sitio de escisión BoNT/A. Como tal, "SNAP-25 que tienen una lisina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A" sería cualquier producto de escisión SNAP-25 que tiene una lisina en su aminoácido carboxilo-terminal en donde la lisina representa K_{204} del enlace escindible.

[028] El antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A puede modificarse para intensificar la inmunogenicidad de un antígeno SNAP-25, un hapteno, o cualquier otro compuesto antigénico que es inmunogénico, no inmunogénico, o débilmente inmunogénico cuando no asociado con la modificación. En un aspecto de esta incorporación, el residuo carboxilo-terminal P_1 del enlace escindible de un antígeno SNAP-25 puede carboxilarse. La carboxilación aumenta las propiedades inmunogénicas deseadas de un antígeno SNAP-25 en dos respectos. Primero, debido a que los aminoácidos cargados aumentan la inmunogenicidad, agregar un grupo COO^- al residuo carboxilo-terminal incrementará la inmunogenicidad general de un antígeno SNAP-25. Segundo, debido a que el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A está en un estado cargado luego de la escisión, agregar un grupo COO^- al residuo carboxilo-terminal imitará mejor el antígeno actual para cuya unión están diseñados los anticuerpos α-SNAP-25 divulgados en la presente especificación.

[029] En un aspecto de esta incorporación, el residuo amino-terminal de un antígeno SNAP-25 puede modificarse por la adición de un aminoácido adaptado para unir el antígeno SNAP-25 a una proteína transportadora, tal como, *por ej.*, una hemocianina de lapa (KLH - *keyhole limpet hemacyanin*), una ovalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA - *bovine serum albumin*), un inhibidor de tripsina de soya (STI - *soybean trypsin inhibitor*), o un péptido de fijación múltiple (MAP - *multiple attachment peptide*). Por ejemplo, un residuo de cisteína puede ponerse en el término amino con el fin de conjugar la proteína transportadora KLH.

[030] Por consiguiente, en una incorporación, un antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A puede tener, *por ej.*, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19, por lo menos 20, por lo menos 25, o por lo menos 30 aminoácidos de longitud. En otra incorporación, un antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A puede tener, *por ej.*, como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, como máximo 8, como máximo 9, como máximo 10, como máximo 11, como máximo 12, como máximo 13, como máximo 14, como máximo 15, como máximo 16, como máximo 17, como máximo 18, como máximo 19, como máximo 20, como máximo 25, o como máximo 30 aminoácidos de longitud. En todavía otra incorporación, un antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A puede tener, *por ej.*, entre 7-12 aminoácidos, entre 10-15 aminoácidos, o entre 13-18 aminoácidos.

[031] En otra incorporación, el antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A comprende SEQ ID NO: 32. En aspectos de esta incorporación, el antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P^1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A comprende SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, o SEQ ID NO: 148. En una incorporación

adicional, el antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A comprende SEQ ID NO: 38.

[032] En todavía otra incorporación, el antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A comprende SEQ ID NO: 39. En aspectos de esta incorporación, el antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A comprende SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, o SEQ ID NO: 44. En una incorporación adicional, el antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A comprende SEQ ID NO: 45.

[033] Se contempla que cualquiera y todos los antígenos SNAP-25 que desencadenan una respuesta inmunitaria que produce anticuerpos α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, pueden ser útil como un antígeno SNAP-25. Por consiguiente, variantes de secuencias de aminoácidos que comprenden SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, o SEQ ID NO: 148 pueden ser útiles como un antígeno SNAP-25 para desencadenar una respuesta inmunitaria que produce anticuerpos α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. En consecuencia, en una incorporación, un antígeno SNAP-25 puede sustituir por lo menos 1, por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, o por lo menos 5 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos a los antígenos SNAP-25 que comprenden SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, o SEQ ID NO: 148. En aún otra incorporación, un antígeno SNAP-25 puede tener por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con los antígenos SNAP-25 que comprenden SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ

ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, o SEQ ID NO: 148.

[034] Se contempla que uno o más transportadores pueden conectarse a un antígeno SNAP-25, con el fin de mejorar la inmunogenicidad de un antígeno SNAP-25 que es inmunogénico, no inmunogénico, o débilmente inmunogénico cuando no está asociado con el transportador. Ejemplos no limitantes, incluyen, *por ej.*, una hemocianina de lapa (KLH), una ovalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA), un inhibidor de tripsina de soya (STI), o un péptido de fijación múltiple (MAP - *multiple attachment peptide*). Como es bien conocido en el arte, un antígeno no antigénico o débilmente antigénico puede hacerse antigénico acoplando el antígeno a un transportador. Varios otros transportadores y métodos para acoplar un antígeno a una transportador son bien conocidos en el arte. Véase, *por ej.*, Harlow and Lane, supra, 1998a; Harlow and Lane, supra, 1998b; y David W. Waggoner, Jr. et al., *Immunogenicity-enhancing carriers and compositions thereof and methods of using the same,* Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20040057958 (Mar. 25, 2004). Igualmente puede generarse un epítopo expresando el epítopo como una proteína de fusión. Métodos para expresar funciones polipeptídicas son bien conocidos por los expertos en el arte como se describe, por ejemplo, en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999). Como el extremo carboxilo-terminal del antígeno SNAP-25 tiene que ser el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, un transportador tiene que conectarse al extremo amino del antígeno SNAP-25.

[035] Se contempla que uno o más espaciadores flexibles puedan conectarse a un antígeno SNAP-25 con el fin de mejorar la inmunogenicidad de un antígeno SNAP-25 que es inmunogénico, no inmunogénico, o débilmente inmunogénico cuando no está asociado con los conectores flexibles. Un espaciador flexible incrementa la longitud peptídica total del antígeno SNAP-25 y proporciona flexibilidad, facilitando en esa forma la adecuada presentación del antígeno SNAP-25 a las células inmunitarias. Como un ejemplo no limitante, una composición puede comprender un antígeno SNAP-25 conectado a uno o más espaciadores flexibles en tándem para presentar mejor el antígeno SNAP-25 a las células inmunitarias, facilitando en esa forma la respuesta inmunitaria.

30

[036] Un espaciador flexible que comprende un péptido tiene por lo menos un aminoácido de longitud y comprende aminoácidos no cargados con pequeños grupos R de cadena lateral pequeña, tales como, *por ej.*, glicina, alanina, valina, leucina o serina. Así, en una incorporación, un espaciador flexible puede tener, *por ej.*, por lo menos 1, por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, o por lo menos 10 aminoácidos de longitud. En otra incorporación, un espaciador flexible puede tener, *por ej.*, por lo menos 1, como máximo 2, como máximo 3, como máximo 4, como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, como máximo 8, como máximo 9, o como máximo 10 aminoácidos de longitud. En aún otra incorporación, un espaciador flexible puede tener, *por ej.*, entre 1-3 aminoácidos, entre 2-4 aminoácidos, entre 3-5 aminoácidos, entre 4-6 aminoácidos, o entre 5-7 aminoácidos. Ejemplos no limitantes de un espaciador flexible incluyen, *por ej.*, espaciadores G tales como GGG, GGGG (SEQ ID NO: 55), y GGGGS (SEQ ID NO: 56) o espaciadores A tales como AAA, AAAA (SEQ ID NO: 57) y AAAAV (SEQ ID NO: 58). Un espaciador flexible se conecta sin cambio en la pauta de lectura (***"is linked in-frame"***) al antígeno SNAP-25 como proteína de fusión.

[037] Como se discute más arriba, un espaciador flexible se usa, en parte, para incrementar la longitud peptídica total del antígeno SNAP-25. Por ejemplo, un antígeno SNAP-25 de 5-10 aminoácidos puede tener su longitud total aumentada conectando un espaciador flexible de 3-5 aminoácidos al extremo amino del antígeno SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno SNAP-25 de 5-10 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada conectando un espaciador flexible de 4-6 aminoácidos al extremo amino del antígeno SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno SNAP-25 de 5-10 aminoácidos puede tener su longitud total aumentada conectando un espaciador flexible de 7-10 aminoácidos al extremo amino del antígeno SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno SNAP-25 de 7-12 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada conectando un espaciador flexible de 1-3 aminoácidos al extremo amino del antígeno SNAP-25. Como otro ejemplo, un antígeno SNAP-25 de 7-12 aminoácidos puede tener su longitud total incrementada conectando un espaciador flexible de 4-6 aminoácidos al extremo amino del antígeno SNAP-25. El aumento de longitud proporcionado por el espaciador flexible permite la selección de un antígeno SNAP-25 de tamaño

pequeño, incrementado así la probabilidad de que el antígeno SNAP-25 sólo desencadenará una respuesta inmunitaria sustancialmente contra una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, acrecentando así la posibilidad de producir anticuerpos α-SNAP-25, que puedan distinguir una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de una SNAP-25 que carece de un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A.

[038] Se contempla que las composiciones divulgadas en la presente especificación pueden comprender opcionalmente un antígeno SNAP-25 divulgado en la presente especificación y uno o más coadyuvantes. Tal como se emplea en esta especificación, el término "coadyuvante", cuando se emplea en referencia a una composición SNAP-25, se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que aumenta o diversifica la respuesta inmunitaria a un antígeno SNAP-25. Por ejemplo, un coadyuvante puede servir para reducir el número de inmunizaciones o la cantidad de antígeno requerido para inmunización protectora. El empleo de coadyuvantes en una composición que induce una respuesta inmunitaria es bien conocido. El objetivo principal de estos coadyuvantes es permitir un incremento en la respuesta inmunitaria. Coadyuvantes no limitantes incluyen, *por ej.*, liposomas, fases aceitosas, incluyendo, sin limitación, el tipo de coadyuvantes de Freund, tales como, *por ej.*, coadyuvante completo de Freund (FCA *Freund's complete adjuvant*); coadyuvante incompleto de Freund (FIA - *Freund's incomplete adjuvant*); glicósidos de sapogenina, tales como, *por ej.*, saponinas; carbopol; N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (comúnmente conocida como dipéptido de muramilo o "MDP" - *muramyl dipeptide*); y lipopolisacárido (LPS - *lipopolysaccharide*). Tales coadyuvantes se usan generalmente en la forma de una emulsión con una fase acuosa, o, más comúnmente, pueden constar de sales orgánicas insolubles en agua. Estas sales inorgánicas pueden constar, por ejemplo, de hidróxido de aluminio, sulfato de zinc, hidróxido de hierro coloidal, fosfato de calcio o cloruro de calcio. Un coadyuvante comúnmente empleado es hidróxido de aluminio ($Al(OH)_3$). Actualmente, el único coadyuvante aprobado por la FDA para uso en humanos son las sales de aluminio (Alum) las cuales se usan para "depositar" antígenos por precipitación de los antígenos. Los coadyuvantes provistos más arriba son simplemente ejemplares.

De hecho, puede usarse cualquier coadyuvante en una composición SNAP-25 divulgada en la presente especificación, siempre que el coadyuvante satisfaga las características requeridas para inducir una respuesta inmunitaria.

[039] Un transportador divulgado en la presente especificación puede actuar asimismo como un coadyuvante. Coadyuvantes específicos y métodos de elaborarlos y usarlos se describen en, *por ej.*, Gupta et al. Vaccine, 11: 993-306, 1993; Arnon, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987; y David W. Waggoner, Jr. et al., *Immunogenicity-Enhancing Carriers and Compositions Thereof and Methods of Using the Same,* Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20040057958 (25 de marzo de 2004). Coadyuvantes adicionales incluyen cualquier compuesto descrito en el Capítulo 7 (páginas 141-227) de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell, M. F. and Newman, M. J.) Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Plenum Press (New York). Ejemplos de este compendio incluyen Dipéptido de Muramilo (MDP) y Montanide 720. Moléculas tales como Poli Inosina:Citosina (Poli I:C) o ADN plasmídico, que contiene motivos CpG, pueden administrarse igualmente como coadyuvantes en combinación con antígenos encapsulados en micropartículas. En otro ejemplo, el coadyuvante es un agente que facilita la entrada del compuesto antigénico en el citoplasma de una célula, tal como listeriolisina, estreptolisina o una mezcla de las mismas.

[040] Por consiguiente, en una incorporación, una composición SNAP-25 contiene un antígeno SNAP-25 con una glutamina carboxilo-terminal carboxilada conectada a un péptido transportador. En aspectos de esta incorporación, un antígeno SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo-terminal carboxilada comprende SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, o SEQ ID NO: 148. En otro aspecto de esta incorporación, un antígeno SNAP-25 comprende SEQ ID NO: 38. En aspectos de esta incorporación, el péptido transportador es una hemocianina de lapa (KLH), una ovalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA), un inhibidor de tripsina de soya (STI) o un péptido de fijación múltiple (MAP).

[041] En otra incorporación, una composición SNAP-25 comprende un antígeno SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo-terminal carboxilada conectada a un

33

péptido transportador. En aspectos de esta incorporación, un antígeno SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo-terminal carboxilada comprende SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, o SEQ ID NO: 44. En otro aspecto de esta incorporación, un antígeno SNAP-25 comprende SEQ ID NO: 45. En aspectos de esta incorporación, el péptido transportador es una hemocianina de lapa (KLH), una ovalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA), un inhibidor de tripsina de soya (STI) o un péptido de fijación múltiple (MAP).

[042] En todavía otra incorporación, una composición SNAP-25 comprende un antígeno SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada conectada a uno o más conectores flexibles y un péptido transportador en donde los conectores flexibles intervienen entre el antígeno SNAP-25 y el péptido transportador. En aspectos de esta incorporación, el antígeno SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo-terminal carboxilada comprende SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, o SEQ ID NO: 148. En otra incorporación, un antígeno SNAP-25 comprende SEQ ID NO: 46. En aspectos de esta incorporación, el péptido transportador es una hemocianina de lapa (KLH), una ovalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA), un inhibidor de tripsina de soya (STI) o un péptido de fijación múltiple (MAP). En aspectos de esta incorporación, el conector flexible es un espaciador G o un espaciador A.

[043] En aún otra incorporación, una composición SNAP-25 comprende un antígeno SNAP-25 que tiene una lisina C-terminal carboxilada conectada a un conector flexible y un péptido transportador, en donde el conector flexible interviene entre el antígeno SNAP-25 y el péptido transportador. En aspectos de esta incorporación, el antígeno SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo-terminal carboxilada comprende SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, o SEQ ID NO: 44. En otro aspecto de esta incorporación, un antígeno SNAP-25 comprende SEQ ID NO: 47. En aspectos de esta incorporación, el péptido transportador es una hemocianina de lapa (KLH), una ovalbúmina (OVA), una tiroglobulina (THY), una albúmina sérica bovina (BSA), un inhibidor de tripsina de soya (STI) o un péptido de fijación múltiple (MAP). En aspectos de esta incorporación, el conector flexible es un espaciador G o un

espaciador A.

[044] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un método para producir anticuerpos α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Un anticuerpo α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, puede producirse por una amplia variedad de métodos que son bien conocidos en el arte. Protocolos específicos para elaborar y usar anticuerpos, así como detectar y medir la especificidad de unión de anticuerpos, afinidad de unión y avidez de unión son conocidos en el arte. Véase, *por ej.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998a); y USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL NO. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001; y Current Protocols in Molecular Biology, 2004; David Anderson et al., *Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use,* Patente de los Estados Unidos 7,034,132 (25 de abril de 2005); y Beatriz M. Carreno et al., *Antibodies Against CTLA4,* Patente de los Estados Unidos 7,034,121 (25 de abril de 2006).

[045] Como un ejemplo no limitante, anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que unen un epítopo, que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, pueden producirse inyectando un animal, tal como, *por ej.*, un conejo, una cabra, un ratón u otro mamífero, con una o más inyecciones de una composición divulgada en la presente especificación. Como otro ejemplo no limitante, anticuerpos policlonales α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, pueden producirse inyectando un huevo, tal como, *por ej.*, un huevo de gallina, con una o más inyecciones de una composición divulgada en la presente especificación. La concentración de anticuerpos en el animal inmunizado puede monitorearse en el curso del tiempo por técnicas estándar, tales como un análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA - *enzyme linked immunosorbent assay*) usando un antígeno inmovilizado o un análisis de actividad basado en

células. Si se desea, anticuerpos policlonales para un anticuerpo α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, pueden aislarse del mamífero (*por ej.*, de la sangre) y purificarse posteriormente por técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad de proteína A para obtener la fracción IgG, o por purificación de afinidad contra el péptido usado para producir los anticuerpos.

[046] Como otro ejemplo no limitante, un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, puede producirse usando un método de hibridoma. Véase, *por ej.*, Capítulo 6 *Monoclonal Antibodies,* páginas 196-244, Harlow & Lane, *supra,* 1998a; y Capítulo 7 *Growing Hybridomas,* páginas 245-282, Harlow & Lane, *supra,* 1998a; y Goding, páginas 59-103, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986). En este método, un animal hospedero, tal como, *por ej.*, un ratón, un hámster, u otro animal hospedero apropiado, se expone típicamente a una o más inyecciones de un antígeno SNAP-25, divulgado en la presente especificación, para provocar linfocitos que produzcan, o capaces de producir, anticuerpos α-SNAP-25, que se unirán específicamente a una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. La concentración de anticuerpos en el animal inmunizado puede monitorearse en el curso del tiempo por técnicas estándar, tales como un análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando un antígeno inmovilizado, o un análisis de actividad basado en células. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro* usando una línea apropiada de cultivo de células. En un momento apropiado después de la inmunización, *por ej.*, cuando las concentraciones de anticuerpos son máximas, células productoras de anticuerpos se aíslan del animal. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica, si se desean células de origen humano, o se utilizan esplenocitos o células de los ganglios linfáticos, si se desean fuentes mamíferas no humanas. Las células productoras de anticuerpos aisladas se fusionan con una línea celular inmortal usando un agente de fusión apropiado, tal como polietilen glicol, para formar una célula de hibridoma. Usualmente líneas celulares inmortalizadas son células mamíferas transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano.

Típicamente una línea celular de mieloma murino se fusiona con esplenocitos recolectados de un ratón apropiadamente inmunizado para producir el hibridoma. Líneas celulares inmortales preferidas son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles a medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Cualquiera de un número de líneas celulares de mieloma puede usarse como pareja de fusión, de acuerdo con técnicas estándar, *por ej.*, las estirpes P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14 de mieloma. Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan entonces usando un medio HAT, que elimina células de mieloma no fusionadas y fusionadas en forma no productiva (los esplenocitos no fusionados mueren varios días después en el cultivo porque no son transformados). El medio de cultivo en el cual se cultivan las células de hibridoma puede analizarse luego para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Por ejemplo, sobrenadantes de hibridoma pueden detectarse selectivamente usando un medio positivo α-SNAP-25 en un análisis de inmunoprecipitación, un análisis de unión *in vitro*, tal como, *por ej.*, un radioinmunoanálisis (RIA) o un análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), o en un análisis de actividad basado en células. Tales técnicas y análisis son conocidos en el arte. Véase *por ej.*, Capítulo 11 *Immunoprecipitation,* páginas 421-470, Harlow & Lane, *supra,* 1998a; Capítulo 12 *Immunoblotting,* páginas 471-510, Harlow & Lane, *supra,* 1998a; Capítulo 14 *Immunoassays,* páginas 553-612, Harlow & Lane, *supra,* 1998a. Pueden realizarse entonces estudios adicionales para determinar si el anticuerpo es también no reactivo a una SNAP-25 que carece de un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 puede determinarse igualmente, *por ej.*, por análisis Scatchard. Véase, *por ej.*, Peter J. Munson and David Rodbard, *Ligand: A Versatile Computerized Approach For Characterization of Ligand-Binding Systems,* 107(1) Anal. Biochem. 220-239 (1980). Una vez identificadas las células de hibridoma deseadas, se utilizan procedimientos de dilución limitante para aislar clones que se originan de una célula única hasta que se obtiene una línea celular clonal que expresa el anticuerpo monoclonal deseado. Aquellos anticuerpos suficientemente selectivos para una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A y que unen con avidez suficientemente alta se

seleccionan para caracterización posterior y estudio.

[047] Otra alternativa para preparar un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, es detectando selectivamente una biblioteca de inmunoglobulina recombinante combinatoria, tal como, *por ej.*, una biblioteca de fagos para exposición de anticuerpos en sus superficies (***"an antibody phage display library"***), con un péptido SNAP-25 y aislar los miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que unen una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. En el comercio se dispone de kits para generar y detectar selectivamente bibliotecas de fagos para exposición [de anticuerpos] en sus superficies, tales como, *por ej.*, the Recombinant Phage Antibody System (Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ); y the SurfZAP™ Phage Display Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Adicionalmente, ejemplos de métodos y reactivos útiles en generar y detectar selectivamente una biblioteca de fagos para exposición de anticuerpos en sus superficies pueden hallarse en, por ejemplo, Ladner et al. Patente de los Estados Unidos 5,223,409; Borrebaeck et al. Patente de los Estados Unidos 5,712,089; Griffiths et al. Patente de los Estados Unidos 5,885,793; Griffiths et al. Patente de los Estados Unidos 5,962,255; McCafferty et al. Patente de los Estados Unidos 5,969,108; Griffiths et al. Patente de los Estados Unidos 6,010,884; Jespers et al. Patente de los Estados Unidos 6,017,732; Borrebaeck et al. Patente de los Estados Unidos 6,027,930; Johnson et al. Patente de los Estados Unidos 6,140,471; McCafferty et al. Patente de los Estados Unidos 6,172,197, cada una de las cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad.

[048] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, recoger una muestra que contiene un anticuerpo α-SNAP-25 o células que producen un anticuerpo α-SNAP-25. Tal como se emplea en esta especificación, el término "muestra que contiene un anticuerpo α-SNAP-25 o una célula que produce un anticuerpo α-SNAP-25" se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene por lo menos un anticuerpo α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Se contempla que

cualquiera y todas las muestras que puedan contener un anticuerpo α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, puede usarse en este método, incluyendo, sin limitación, sangre, plasma, suero y fluido linfático. Se contempla igualmente que cualquier célula capaz de producir un anticuerpo α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, puede usarse en este método, incluyendo, sin limitación, células CD8, una célula CTL, un linfocito T cooperador y un linfocito B. Una variedad de métodos bien conocidos pueden usarse para recoger de un individuo una muestra que contiene el anticuerpo α-SNAP-25 o una célula que produce un anticuerpo α-SNAP-25, véase, *por ej.*, Harlow & Lane, *supra,* 1998a; y Harlow & Lane, *supra,* 1998b. Análogamente, una variedad de métodos bien conocidos pueden usarse para procesar una muestra para aislar un anticuerpo α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Un procedimiento para recoger una muestra puede seleccionarse basándose en el tipo de anticuerpo que se va a aislar. Como un ejemplo no limitante, cuando se aíslan anticuerpos policlonales α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, una muestra apropiada puede ser una muestra de sangre que contenga tales anticuerpos α-SNAP-25, mientras que cuando se aíslan anticuerpos monoclonales α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, una muestra apropiada puede ser una célula que produce un anticuerpo α-SNAP-25, tal como un esplenocito o hibridoma.

[049] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, aislar de la muestra un anticuerpo α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Métodos de aislar tales anticuerpos α-SNAP-25, tales como, *por ej.*, anticuerpos policlonales α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, o anticuerpos monoclonales

α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, son bien conocidos por los expertos en el arte. Véase, *por ej.*, Harlow and Lane, supra, 1998a; y Harlow and Lane, supra, 1998b. Por ejemplo, tales anticuerpos policlonales α-SNAP-25 pueden aislarse de la muestra por técnicas bien conocidas, tales como, *por ej.*, cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción IgG de suero inmunitario. Posterior, o alternativamente, un antígeno SNAP-25 específico puede inmovilizarse en una columna o microesferas magnéticas para purificar los anticuerpos policlonales α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P^1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, por cromatografía de inmunoafinidad. Un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, puede aislarse del medio de cultivo o fluido ascítico por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, *por ej.*, proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

[050] Por consiguiente, en una incorporación, un método de producir un anticuerpo α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, comprende los pasos (a) administrar a un animal una composición que contiene un antígeno SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada conectada a un péptido transportador; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo α-SNAP-25 o una célula que produce un anticuerpo α-SNAP-25; y (c) aislar el componente anticuerpo α-SNAP-25 de la muestra. En un aspecto de esta incorporación, el anticuerpo α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, es un anticuerpo policlonal. En otro aspecto de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto adicional de esta incorporación, un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término

40

carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25 producido, es un subtipo de IgG. En otros aspectos de esta incorporación, la composición SNAP-25 comprende además un coadyuvante, tal como, *por ej.*, polietilen glicol (PEG), monometoxipolietilen glicol (mPEG), o alcohol polivinílico (PVA).

[051] En otra incorporación, un método de producir anticuerpos α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, comprende los pasos de (a) administrar a un animal una composición que contiene un péptido SNAP-25 que tiene una glutamina C-terminal carboxilada conectada a un conector flexible y un péptido transportador, en donde el conector flexible interviene entre el péptido SNAP-25 y el péptido transportador; (b) recoger del animal una muestra que contiene un anticuerpo α-SNAP-25 o una célula que produce un anticuerpo α-SNAP-25; y (c) aislar el anticuerpo α-SNAP-25 de la muestra. En un aspecto de esta incorporación, los anticuerpos α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, son un anticuerpo policlonal. En otro aspecto de esta incorporación, anticuerpos α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, son un anticuerpo monoclonal. En un aspecto adicional de esta incorporación, un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, que une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25 producido, es un subtipo de IgG. En otros aspectos de esta incorporación, la composición SNAP-25 comprende además un coadyuvante, tal como, *por ej.*, polietilen glicol (PEG), monometoxipolietilen glicol (mPEG), o alcohol polivinílico (PVA).

[052] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un anticuerpo α-SNAP-25 aislado que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. Tal como se emplea en esta especificación, el término "aislado" se refiere a separar una molécula de su ambiente natural mediante el uso de intervención humana. Tal como se emplea en esta especificación, el término "anticuerpo" se

refiere a una molécula generada por un sistema inmunitario, la cual se produjo en respuesta a un antígeno particular, que específicamente se une a ese antígeno, e incluye anticuerpos de ocurrencia natural y anticuerpos de ocurrencia no natural. Tal como se emplea en esta especificación, el término "α-SNAP-25" es sinónimo con "anti-SNAP-25" y se refiere a un anticuerpo que se une a un antígeno SNAP-25. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un dímero, un multímero, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo bi-funcional, un anticuerpo asociado con una célula, como un receptor Ig, un anticuerpo lineal, un diacuerpo, o un minicuerpo, siempre que el fragmento exhiba la actividad biológica deseada, y derivados de cadena única de los mismos. Un anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, que comprende los dominios V_H y V_L, así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y los dominios constantes de cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}, o un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, tal como, *por ej.*, un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fc, un fragmento Fd, un fragmento Fv. Un anticuerpo puede derivarse de cualquier especie vertebrada (*por ej.*, humana, cabra, caballo, asno, murina, rata, conejo, o gallina), y puede ser de cualquier tipo (*por ej.*, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (*por ej.*, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) o subclase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). Para divulgación general de la estructura de anticuerpos de ocurrencia natural, anticuerpos de ocurrencia no natural y sus fragmentos de unión a un compuesto antigénico, véase, *por ej.*, Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, páginas 269-315 (1994); Borrabeck, Antibody Engineering, 2d ed. (Oxford University Press 1995), cada uno de los cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad.

[053] Los anticuerpos de ocurrencia natural son glicoproteínas usualmente heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está conectada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena ligera y pesada tiene también puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H), seguido por un número de dominios constantes.

Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera se alínea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera se alínea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

[054] El completo reconocimiento del antígeno y el sitio de unión a antígeno están contenidos en los dominios variables del anticuerpo, *es decir*, el fragmento Fv. Este fragmento incluye un dímero de un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) en estrecha asociación, no covalente. Cada dominio comprende cuatro regiones de armazón o entramado (FR - *framework regions*), que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, conectadas por tres regiones hipervariables, las cuales forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β. Cada región hipervariable comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región determinante de complementariedad (CDRs - *complementarity determining region*). Colectivamente, si la configuración tridimensional de las seis regiones CDR que definen un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L que confiere especificidad de unión a antígeno. Véase, *por ej.*, Cyrus Chothia, et al., *Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions,* Nature 342(6252): 877-883 (1989); Elvin A. Kabat, et al *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad. Los dominios constantes del anticuerpo no están involucrados directamente en unir un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

[055] Un antígeno diana tiene generalmente uno o más sitios de unión, también llamados epítopos, los cuales son reconocidos por el sitio de unión a antígeno formado por la CDR. Tal como se emplea en esta especificación, un "epítopo" es sinónimo con "determinante antigénico" y se refiere al sitio en un antígeno diana, tal como, *por ej.*, una molécula que contenga un péptido, polisacárido o lípido, capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocito T, o de

interactuar en otra forma con una molécula. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítopo diferente tiene una estructura diferente. Por consiguiente, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

[056] Los anticuerpos policlonales se refieren a una población heterogénea de moléculas de anticuerpo que contienen por lo menos dos especies de anticuerpo capaces de unirse a un antígeno particular. Por definición, un anticuerpo policlonal incluye dos diferentes anticuerpos que se unen por lo menos a dos epítopos diferentes. Tal como se emplea en esta especificación, el término "anticuerpo monoclonal" o "anticuerpos monoclonales" se refiere a una población sustancialmente homogénea de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de anticuerpo capaz de unir un antígeno particular, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de ocurrencia natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Por definición, un anticuerpo monoclonal se une a un solo epítopo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contara un sitio antigénico único. Más aún, en contraste con los anticuerpos policlonales, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Aparte de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que pueden sintetizarse sin contaminación por otros anticuerpos. El calificativo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no tiene que interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usarse de acuerdo con la presente divulgación pueden elaborarse por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al (1975) Nature 256:495, o pueden elaborarse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo: Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; Patente de los Estados Unidos No. 5,807,715). Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse asimismo de bibliotecas de anticuerpos de exposición en fagos usando la técnicas descritas en Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597; por ejemplo.

[057] Por consiguiente, en una incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25 comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que selectivamente se une a una SNAP-25 que tiene un término

carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. En un aspecto de esta incorporación, el dominio variable de cadena pesada (V_H) es SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, o SEQ ID NO: 82. En otro aspecto de esta incorporación, el dominio variable de cadena ligera (V_L) es SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, o SEQ ID NO: 92.

[058] En otra incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25 comprende una región CDR1, una región CDR2, una región CDR3 de dominio variable de cadena pesada (V_H), o cualquier combinación de las mismas, que selectivamente se une a una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. En un aspecto de esta incorporación, la región CDR1 de dominio variable de cadena pesada (V_H) es SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, o SEQ ID NO: 120. En otro aspecto de esta incorporación, la región CDR2 de dominio variable de cadena pesada (V_H) es SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, o SEQ ID NO: 123. En todavía otro aspecto de esta incorporación, la región CDR3 de dominio variable de cadena pesada (V_H) es SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, o SEQ ID NO: 124.

[059] En otra incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25 comprende una región CDR1, una región CDR2, una región CDR3 de dominio variable de cadena ligera (V_L), o cualquier combinación de las mismas, que selectivamente se une a una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. En un aspecto de esta incorporación, la región CDR1 de dominio variable de cadena ligera (V_L) es SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, o SEQ ID NO: 129. En otro aspecto de esta incorporación, la región CDR2 de dominio variable de cadena ligera (V_L) es SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, o SEQ ID NO: 112. En todavía otro aspecto de esta incorporación, la región CDR3 de dominio variable de cadena ligera (V_L) es SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, o SEQ ID NO: 117.

[060] En todavía otra incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25 une

específicamente un epítopo que comprende una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. En un aspecto de esta incorporación, el epítopo comprende SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, o SEQ ID NO: 148. En un aspecto de esta incorporación, el epítopo comprende SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, o SEQ ID NO: 44.

[061] Como se discutió en las secciones anteriores, la secuencia que rodea un sitio de escisión BoNT/A presente en SNAP-25 se denota P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5', representando P_1-P_1' el enlace escindible. Luego de la escisión por BoNT/A, los productos de escisión resultantes producidos comprenden un fragmento que incluye la secuencia P_5-P_4-P_3-P_2-P_1 y un fragmento que incluye P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'. Tal como se emplea en esta especificación, el término "anticuerpos α-SNAP-25 que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25" se refiere a anticuerpos α-SNAP-25 que selectivamente se unen a cualquier fragmento de producto de escisión SNAP-25, que comprende la secuencia P_5-P_4-P_3-P_2-P_1 pero no a cualquier fragmento de producto de escisión SNAP-25 que incluya la secuencia P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5' o a cualquier SNAP-25 que tenga un enlace escindible P_1-P_1' intacto de un sitio de escisión BoNT/A. Tal como se emplea en esta especificación, el término "anticuerpo α-SNAP-25_{197}" se refiere a un anticuerpo que selectivamente se une a una SNAP-25 que tiene un residuo carboxilo terminal P_1 que corresponde a la glutamina 197 de SEQ ID NO: 5. Tal como se emplea en esta especificación, el término "anticuerpo α-SNAP-25_{204}" se refiere a un anticuerpo que selectivamente se une a una SNAP-25 que tiene un residuo P_1 carboxilo terminal que corresponde a la lisina 204 de SEQ ID NO: 16.

[062] Tal como se emplea en esta especificación, el término "selectivamente" se refiere a tener un efecto único o influencia o reaccionar en únicamente una forma o con únicamente una cosa. Tal como se emplea en esta especificación, el término "selectivamente une," cuando se hace en referencia a un anticuerpo, se refiere a la unión discriminatoria del anticuerpo al epítopo diana indicado, de modo que tal anticuerpo no reaccione de manera sustancialmente cruzada con epítopos no diana. El tamaño mínimo de péptido epítopo, como se define en esta

especificación, es alrededor de cinco aminoácidos, y un péptido epítopo típicamente comprende por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 15, o por lo menos 20 aminoácidos. Un péptido epítopo puede ser discontinuo, *es decir*, comprende residuos de aminoácidos que no son adyacentes en la estructura principal del péptido sino que se reúnen en un epítopo por medio de la estructura secundaria, terciaria, o cuaternaria del péptido. Además, se anota igualmente que un epítopo podría comprender una porción de una molécula distinta de una secuencia de aminoácidos, tal como, *por ej.*, una fracción carbohidrato, una fracción lipídica como lipoproteínas o glucolípidos, o una fracción aminoácido químicamente modificada como un aminoácido fosforilado. En aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede unir selectivamente un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, que comprende por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 15, o por lo menos 20 aminoácidos. En otros aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25 que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A puede unir selectivamente un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A que comprende como máximo 5, como máximo 6, como máximo 7, como máximo 8, como máximo 9, como máximo 10, como máximo 15, o como máximo 20 aminoácidos.

[063] La unión selectiva incluye propiedades de unión tales como, *por ej.*, afinidad de unión, especificidad de unión y avidez de unión. Véase David J. King, *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies,* páginas 240 (1998). La afinidad de unión se refiere a la duración del tiempo en que el anticuerpo reside en su sitio de unión al epítopo, y puede considerarse como la fuerza con la cual un anticuerpo une su epítopo. La afinidad de unión puede describirse como una constante de disociación de equilibrio del anticuerpo (KD), que se define como la relación Kd/Ka en equilibrio. Donde Ka es la constante de velocidad de asociación del anticuerpo y Kd es la constante de velocidad de disociación del anticuerpo. La afinidad de unión se determina tanto por la asociación como por la disociación y

ninguna de las dos solas, elevada asociación o baja disociación, puede garantizar una afinidad elevada. La constante de velocidad de asociación (Ka), o constante *on-rate* (**Kon**), mide el número de acontecimientos de unión por unidad de tiempo, o la propensión del anticuerpo y el antígeno a asociarse reversiblemente en su complejo anticuerpo-antígeno. La constante de velocidad de asociación se expresa en M^{-1} s^{-1}, y se simboliza como sigue: [Ab] x [Ag] x Kon. A mayor constante de velocidad de asociación, más rápidamente se une el anticuerpo a su antígeno, o más alta la afinidad de unión entre el anticuerpo y el antígeno. La constante de velocidad de disociación (Kd), o constante *off-rate* (**Koff**), mide el número de acontecimientos de disociación por unidad de tiempo o la propensión de un complejo anticuerpo-antígeno a separarse (disociarse) reversiblemente en sus moléculas componentes, a saber, el anticuerpo y el antígeno. La constante de velocidad de disociación se expresa en s^{-1}, y se simboliza como siguen: [Ab + Ag] x Koff. A menor constante de velocidad de disociación, más estrechamente ligado está el anticuerpo a su antígeno, o mayor es la afinidad de unión entre el anticuerpo y el antígeno. La constante de disociación de equilibrio (KD) mide la velocidad a la cual los nuevos complejos anticuerpo-antígeno formados iguala la velocidad a la cual los complejos anticuerpo-antígeno se disocian en equilibrio. La constante de disociación de equilibrio se expresa en M, y se define como Koff/Kon=[Ab] x [Ag]/[Ab + Ag], donde [Ab] es la concentración molar del anticuerpo, [Ag] es la concentración molar del antígeno y [Ab + Ag] es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno, donde todas las concentraciones son de tales componentes cuando el sistema está en equilibrio. A menor constante de disociación de equilibrio, más estrechamente ligado está el anticuerpo a su antígeno, o mayor es la afinidad de unión entre el anticuerpo y el antígeno.

[064] Por consiguiente, en una incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de velocidad de asociación de, *por ej.*, menos de 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1}, menos de 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1}, menos de 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1}, o menos de 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1} En otra incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede

AB

tener una constante de velocidad de asociación de, *por ej.*, más de 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1}, más de 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1}, más de 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1}, o más de 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1}. En otros aspectos, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de velocidad de asociación entre 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1} a 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1}, 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1} a 1 x 10^8 M^{-1} s^{-1}, 1 x 10^5 M^{-1} s^{-1} a 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1}, o 1 x 10^6 M^{-1} s^{-1} a 1 x 10^7 M^{-1} s^{-1}.

[065] En otra incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de velocidad de disociación entre menos de 1 x 10^{-3} s^{-1}, menos de 1 x 10^{-4} s^{-1}, o menos de 1 x 10^{-5} s^{-1}. En otros aspectos de esta incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de velocidad de disociación de, *por ej.*, menos de 1.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos de 2.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos de 3.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos de 4.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos de 5.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos de 6.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos de 7.0 x 10^{-4} s^{-1}, menos de 8.0 x 10^{-4} s^{-1}, o menos de 9.0 x 10^{-4} s^{-1}. En otra incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de velocidad de disociación de, *por ej.*, más de 1 x 10^{-3} s^{-1}, más de 1 x 10^{-4} s^{-1}, o más de 1 x 10^{-5} s^{-1}. En otros aspectos de esta incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de velocidad de disociación de, *por ej.*, más de 1.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 2.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 3.0 x 10^{-4} s^{-1} más de 4.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 5.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 6.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 7.0 x 10^{-4} s^{-1}, más de 8.0 x 10^{-4} s^{-1} o más de 9.0 x $10^{-4}s^{-1}$.

[066] En otra incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de disociación de equilibrio de menos de 0.500 nM. En aspectos de esta

incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de disociación de equilibrio de, *por ej.*, menos de 0.500 nM, menos de 0.450 nM, menos de 0.400 nM, menos de 0.350 nM, menos de 0.300 nM, menos de 0.250 nM, menos de 0.200 nM, menos de 0.150 nM, menos de 0.100 nM, o menos de 0.050 nM. En otra incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de disociación de equilibrio de más de 0.500 nM. En aspectos de esta incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de disociación de equilibrio de, *por ej.*, más de 0.500 nM, más de 0.450 nM, más de 0.400 nM, más de 0.350 nM, más de 0.300 nM, más de 0.250 nM, más de 0.200 nM, más de 0.150 nM, más de 0.100 nM o más de 0.050 nM.

[067] En todavía otra incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de velocidad de asociación para el SNAP-25 intacto de, *por ej.*, menos de 1×10^0 M^{-1} s^{-1}, menos de 1×10^1 M^{-1} s^{-1} menos de 1×10^2 M^{-1} s^{-1} menos de 1×10^3 M^{-1} s^{-1} o menos de 1×10^4 M^{-1} s^{-1} En otra incorporación, la afinidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede tener una constante de velocidad de asociación para el SNAP-25 intacto de, *por ej.*, como máximo 1×10^0 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1×10^1 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1×10^2 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1×10^3 M^{-1} s^{-1} o como máximo 1×10^4 M^{-1} s^{-1}.

[068] La especificidad de unión es la capacidad de un anticuerpo de discriminar entre una molécula que contiene su epítopo y una molécula que no contiene ese epítopo. Un modo de medir la especificidad de unión es comparar la velocidad de asociación *Kon* del anticuerpo para una molécula que contiene su epítopo relativa a la velocidad de asociación *Kon* del anticuerpo para una molécula que no

50

contiene ese epítopo. Por ejemplo, comparando la constante de velocidad de asociación (Ka) de un anticuerpo α-SNAP-25 para un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A relativa a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo, tal como, *por ej.*, un epítopo SNAP-25 que carece de un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A o un epítopo SNAP-25 que tiene un enlace escindible P_1-P_1' intacto de un sitio de escisión BoNT/A. En aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para una SNAP-25 que no comprende su(s) epítopo(s) de, *por ej.*, menos de 1 x 10^0 M^{-1} s^{-1}, menos de 1 x 10^1 M^{-1} s^{-1}, menos de 1 x 10^2 M^{-1} s^{-1}, menos de 1 x 10^3 M^{-1} s^{-1} o menos de 1 x 10^4 M^{-1} s^{-1} En otros aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para una SNAP-25 que no comprende su(s) epítopo(s) de, *por ej.*, como máximo 1x10^0 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1 x 10^1 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1 x 10^2 M^{-1} s^{-1}, como máximo 1 x 10^3 M^{-1} s^{-1} o como máximo 1 x 10^4 M^{-1} s^{-1}.

[069] En todavía más aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para su epítopo relativa a un SNAP-25 que no comprende ese epítopo de, *por ej.*, por lo menos 2 veces más, por lo menos 3 veces más, por lo menos 4 veces más, por lo menos 5 veces más, por lo menos 6 veces más, por lo menos 7 veces más, por lo menos 8 veces más, o por lo menos 9 veces más. En aspectos adicionales de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para su epítopo relativa a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo de, *por ej.*, por lo menos 10 veces más, por lo menos 100 veces más, por lo menos 1.000 veces más, o por lo menos 10.000 veces más. En todavía otros aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que

SL

tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para su epítopo relativa a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo de, *por ej.*, como máximo 1 vez más, como máximo 2 veces más, como máximo 3 veces más, como máximo 4 veces más, como máximo 5 veces más, como máximo 6 veces más, como máximo 7 veces más, como máximo 8 veces más o como máximo 9 veces más. En todavía otros aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, tiene una constante de velocidad de asociación (Ka) para su epítopo, relativa a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo de, *por ej.*, como máximo 10 veces más, como máximo 100 veces más, como máximo 1.000 veces más o como máximo 10.000 veces más.

[070] La especificidad de unión de un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede caracterizarse igualmente como una relación en que tal anticuerpo α-SNAP-25 puede discriminar su epítopo SNAP-25 relativo a una SNAP-25 que no comprende ese epítopo, tal como, *por ej.*, un epítopo SNAP-25 que carece de un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, o un epítopo SNAP-25 que tiene un enlace escindible P_1-P_1' intacto de un sitio de escisión BoNT/A. En aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, tiene una relación de especificidad de unión para su epítopo SNAP-25 relativa a un SNAP-25 que no comprende ese epítopo de, *por ej.*, por lo menos 2:1, por lo menos 3:1, por lo menos 4:1, por lo menos 5:1, por lo menos 6:1, por lo menos 7:1, por lo menos 8:1, por lo menos 9:1, por lo menos 10:1, por lo menos 15:1, por lo menos 20:1, por lo menos 25:1, por lo menos 30:1, por lo menos 35:1, o por lo menos 40:1. En todavía otros aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, tiene una relación de especificidad de unión para su epítopo SNAP-25 relativa a una SNAP-25 que carece de un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de, *por*

52

ej., por lo menos 2:1, por lo menos 3:1, por lo menos 4:1, por lo menos 5:1, por lo menos 6:1, por lo menos 7:1, por lo menos 8:1, por lo menos 9:1, por lo menos 10:1, por lo menos 15:1, por lo menos 20:1, por lo menos 25:1, por lo menos 30:1, por lo menos 35:1, o por lo menos 40:1. En todavía otros aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, tiene una relación de especificidad de unión para su epítopo SNAP-25 relativa a una SNAP-25 que tiene un enlace escindible P_1-P_1' intacto de un sitio de escisión BoNT/A de, *por ej.*, por lo menos 2:1, por lo menos 3:1, por lo menos 4:1, por lo menos 5:1, por lo menos 64:1, por lo menos 7:1, por lo menos 8:1, por lo menos 9:1, por lo menos 10:1, por lo menos 15:1, por lo menos 20:1, por lo menos 25:1, por lo menos 30:1, por lo menos 35:1, o por lo menos 40:1.

[071] La avidez de unión, también conocida como afinidad funcional, se refiere a la suma total de la fuerza de unión funcional entre un anticuerpo multivalente y su antígeno. Las moléculas anticuerpo pueden tener más de un sitio de unión (*por ej.*, 2 para IgG, 10 para IgM), y muchos antígenos contienen más de un sitio antigénico. Aunque la avidez de unión de un anticuerpo depende de las afinidades de unión de los sitios de unión del anticuerpo individual, la avidez de unión es mayor que la afinidad de unión, ya que todas las interacciones anticuerpo-antígeno tienen que romperse simultáneamente para que el anticuerpo se disocie completamente. Se contempla que un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede unirse selectivamente a cualquiera y todos los epítopos para ese anticuerpo.

[072] Por consiguiente, en una incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25 es un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. En aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25 es un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene una glutamina carboxilo terminal, o un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene una lisina carboxilo terminal. En otros aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25 es un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que

tiene un residuo P_1 carboxilo terminal que corresponde a la glutamina 197 de SEQ ID NO: 5, o un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25, que tiene un residuo P_1 carboxilo terminal que corresponde a la lisina 204 de SEQ ID NO: 16. En todavía otros aspectos de esta incorporación, un anticuerpo α-SNAP-25 es un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25, que tiene una secuencia de aminoácidos carboxilo-terminal de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, o SEQ ID NO: 148.

[073] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un método basado en inmunología de detectar actividad BoNT/A. Los métodos basados en inmunología, divulgados en la presente especificación, pueden evaluarse por varios parámetros incluyendo, *por ej.*, exactitud, precisión, límite de detección (LOD - *limit of detection*), límites de cuantificación (LOQ - *limits of quantitation*), intervalo, especificidad, selectividad, linealidad, solidez e idoneidad del sistema. La exactitud de un método es la medida de meticulosidad de un método analítico, o la proximidad de concordancia entre el valor medido y el valor que se acepta como un valor verdadero convencional, o un valor de referencia aceptado. La precisión de un método es el grado de concordancia entre los resultados de una prueba individual, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. Como tal, la precisión evalúa 1) la variabilidad en el análisis; 2) la variabilidad en un día (repetibilidad); y 3) la variabilidad entre días (precisión intermedia); y 4) la variabilidad entre laboratorios (reproducibilidad). El coeficiente de variación (CV%) es una medida cuantitativa de la precisión expresada, relativa al valor medio observado o teórico.

[074] Un método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene que ser capaz de detectar, sobre el fondo, la presencia de un complejo anticuerpo α-SNAP-25-antígeno que comprende una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. El límite de detección (LOD) de un método se refiere a la concentración de analito que da lugar a una señal que es significativamente diferente del control negativo o blanco y representa la concentración mínima de analito que puede distinguirse del fondo.

[075] Por consiguiente, en una incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, puede detectar el LOD de BoNT/A en una cantidad que es significativamente diferente de un control negativo o blanco. En un aspecto de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*, 10 ng o menos, 9 ng o menos, 8 ng o menos, 7 ng o menos, 6 ng o menos, 5 ng o menos, 4 ng o menos, 3 ng o menos, 2 ng o menos, 1 ng o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*, 900 pg o menos, 800 pg o menos, 700 pg o menos, 600 pg o menos, 500 pg o menos, 400 pg o menos, 300 pg o menos, 200 pg o menos, 100 pg o menos de una BoNT/A. En aspectos adicionales de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*, 90 pg o menos, 80 pg o menos, 70 pg o menos, 60 pg o menos, 50 pg o menos, 40 pg o menos, 30 pg o menos, 20 pg o menos, 10 pg o menos de una BoNT/A. En otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*, 0.9 pg o menos, 0.8 pg o menos, 0.7 pg o menos, 0.6 pg o menos, 0.5 pg o menos, 0.4 pg o menos, 0.3 pg o menos, 0.2 pg o menos, 0.1 pg o menos de una BoNT/A.

[076] En otro aspecto de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*, 10 nM o menos o menos, 9 nM o menos, 8 nM o menos, 7 nM o menos, 6 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos, o 1 nM o menos de una BoNT/A. En otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*, 900 pM o menos, 800 pM o menos, 700 pM o menos, 600 pM o menos, 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos, 200 pM o menos, o 100 pM o menos de una BoNT/A. En otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*,

55

100 pM o menos, 90 pM o menos, 80 pM o menos, 70 pM o menos, 60 pM o menos, 50 pM o menos, 40 pM o menos, 30 pM o menos, 20 pM o menos, o 10 pM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*, 10 pM o menos de una BoNT/A, 9 pM o menos, 8 pM o menos, 7 pM o menos, 6 pM o menos, 5 pM o menos, 4 pM o menos, 3 pM o menos, 2 pM o menos, o 1 pM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*, 1000 fM o menos, 900 fM o menos, 800 fM o menos, 700 fM o menos, 600 fM o menos, 500 fM o menos, 400 fM o menos, 300 fM o menos, 200 fM o menos, o 100 fM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*, 100 fM o menos, 90 fM o menos, 80 fM o menos, 70 fM o menos, 60 fM o menos, 50 fM o menos, 40 fM o menos, 30 fM o menos, 20 fM o menos, o 10 fM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOD de, *por ej.*, 10 fM o menos, 9 fM o menos, 8 fM o menos, 7 fM o menos, 6 fM o menos, 5 fM o menos, 4 fM o menos, 3 fM o menos, 2 fM o menos, o 1 fM o menos de una neurotoxina botulínica A.

[077] Los límites de cuantificación (LOQ) son las concentraciones máximas y mínimas de analito en una muestra o espécimen que pueden medirse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. El límite inferior de cuantificación se refiere a la dosis mínima que un método de detección puede medir consistentemente del fondo. El límite superior de cuantificación es la dosis máxima que un método de detección puede medir consistentemente, antes de que ocurra la saturación de la señal. El intervalo lineal del método es el área entre los límites inferior y superior de cuantificación. El intervalo lineal se calcula restando el límite inferior de cuantificación del límite superior de cuantificación. Tal como se emplea en esta especificación, el término "relación señal/ruido para la asíntota inferior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite inferior de detección dividida por la señal de fondo. Tal como se emplea en esta especificación, el término "relación señal/ruido para la asíntota superior" se refiere a la señal detectada en el método en el límite superior de detección dividida por la señal de fondo.

SG

[078] Por consiguiente, en una incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, puede detectar el LOQ de BoNT/A en una cantidad que es significativamente diferente de un control negativo o blanco. En un aspecto de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOQ de, *por ej.*, 10 ng o menos, 9 ng o menos, 8 ng o menos, 7 ng o menos, 6 ng o menos, 5 ng o menos, 4 ng o menos, 3 ng o menos, 2 ng o menos, 1 ng o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación tiene un LOQ de, *por ej.*, 900 pg o menos, 800 pg o menos, 700 pg o menos, 600 pg o menos, 500 pg o menos, 400 pg o menos, 300 pg o menos, 200 pg o menos, 100 pg o menos de una BoNT/A. En aspectos adicionales de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOQ de, *por ej.*, 90 pg o menos, 80 pg o menos, 70 pg o menos, 60 pg o menos, 50 pg o menos, 40 pg o menos, 30 pg o menos, 20 pg o menos, 10 pg o menos de una BoNT/A. En otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOQ de, *por ej.*, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOQ de, *por ej.*, 0.9 pg o menos, 0.8 pg o menos, 0.7 pg o menos, 0.6 pg o menos, 0.5 pg o menos, 0.4 pg o menos, 0.3 pg o menos, 0.2 pg o menos, 0.1 pg o menos de una BoNT/A.

[079] En otro aspecto de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOQ de, *por ej.*, 10 nM o menos, 9 nM o menos, 8 nM o menos, 7 nM o menos, 6 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos, o 1 nM o menos de una BoNT/A. En otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOQ de, *por ej.*, 900 pM o menos, 800 pM o menos, 700 pM o menos, 600 pM o menos, 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos, 200 pM o menos, o 100 pM o menos de una BoNT/A. En otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOQ de, *por ej.*, 100 pM o menos, 90 pM o

menos, 80 pM o menos, 70 pM o menos, 60 pM o menos, 50 pM o menos, 40 pM o menos, 30 pM o menos, 20 pM o menos, o 10 pM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOQ de, *por ej.*, 10 pM o menos de una BoNT/A, 9 pM o menos, 8 pM o menos, 7 pM o menos, 6 pM o menos, 5 pM o menos, 4 pM o menos, 3 pM o menos, 2 pM o menos, o 1 pM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOQ de, *por ej.*, 1000 fM o menos, 900 fM o menos, 800 fM o menos, 700 fM o menos, 600 fM o menos, 500 fM o menos, 400 fM o menos, 300 fM o menos, 200 fM o menos, o 100 fM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOQ de, *por ej.*, 100 fM o menos, 90 fM o menos, 80 fM o menos, 70 fM o menos, 60 fM o menos, 50 fM o menos, 40 fM o menos, 30 fM o menos, 20 fM o menos, o 10 fM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene un LOQ de, *por ej.*, 10 fM o menos, 9 fM o menos, 8 fM o menos, 7 fM o menos, 6 fM o menos, 5 fM o menos, 4 fM o menos, 3 fM o menos, 2 fM o menos, o 1 fM o menos de una BoNT/A.

[080] Un análisis basado en inmunología, útil para poner en práctica un aspecto de los métodos divulgados, tiene que contar con una precisión de no más de 50%. En aspectos de esta incorporación, un análisis basado en inmunología tiene una precisión de no más de 50%, no más de 40%, no más de 30%, o no más de 20%. En otros aspectos de esta incorporación, un análisis basado en inmunología tiene una precisión de no más de 15%, no más de 10%, o no más de 5%. En otros aspectos de esta incorporación, un análisis basado en inmunología tiene una precisión de no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, o no más de 1%.

[081] Un análisis basado en inmunología, útil para poner en práctica un aspecto de los métodos divulgados, tiene que contar con una exactitud de por lo menos 50%. En aspectos de esta incorporación, un análisis basado en inmunología tiene una exactitud de por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, o por lo menos 80%. En otros aspectos de esta incorporación, un análisis basado en inmunología tiene una exactitud de por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo

menos 95%. En otros aspectos de esta incorporación, un análisis basado en inmunología tiene una exactitud de 4por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%.

[082] Un método basado en inmunología divulgado en la presente especificación tiene que contar con una relación señal/ruido para la asíntota inferior que es estadísticamente significativa y una relación señal/ruido para la asíntota superior que es estadísticamente significativa. En aspectos de esta incorporación, un método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, tiene una relación señal/ruido para la asíntota inferior de, *por ej.*, por lo menos 3:1, por lo menos 4:1,por lo menos 5:1, por lo menos 6:1, por lo menos 7:1, por lo menos 8:1, por lo menos 9:1, por lo menos 10:1, por lo menos 15:1, o por lo menos 20:1. En otros aspectos de esta incorporación, un método basado en inmunología tiene una relación señal/ruido para la asíntota superior de, *por ej.*, por lo menos 10:1, por lo menos 15:1, por lo menos 20:1, por lo menos 25:1, por lo menos 30:1, por lo menos 35:1, por lo menos 40:1, por lo menos 45:1, por lo menos 50:1, por lo menos 60:1, por lo menos 70:1, por lo menos 80:1, por lo menos 90:1, o por lo menos 100:1, por lo menos 150:1, por lo menos 200:1, por lo menos 250:1, por lo menos 300:1, por lo menos 350:1, por lo menos 400:1, por lo menos 450:1, por lo menos 500:1, por lo menos 550:1, o por lo menos 600:1.

[083] La especificidad de un método define la capacidad del método de medir el analito de interés con respecto a la exclusión de otros componentes relevantes, tales como, *por ej.*, analito parcialmente activo o inactivo. La selectividad de un método describe la capacidad de un método analítico de diferenciar varias sustancias en una muestra. La linealidad de un método es su capacidad de provocar resultados que son directamente, o por una transformación matemática bien definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra. Por consiguiente, en una incorporación, un método basado en inmunología, divulgado en la presente especificación, puede distinguir una BoNT/A completamente activa de una BoNT/A parcialmente activa que tiene, *por ej.*, 70% o menos, 60% o menos, 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, o 10% o menos de la actividad de una BoNT/A completamente activa.

[084] La solidez del método es la reproducibilidad de los resultados de prueba

obtenidos para muestras idénticas bajo condiciones de prueba normales (pero variables). La robustez de un procedimiento es una medida de su capacidad de permanecer no afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y ofrece una indicación de su confiabilidad en el uso normal. En consecuencia, mientras la solidez evalúa cambios inevitables, la robustez evalúa cambios deliberados. Los parámetros típicos evaluados por la solidez y la robustez incluyen los efectos de congelación/descongelación, tiempos de incubación, temperatura de incubación, longevidad del reactivo, preparación de la muestra, almacenamiento de la muestra, número de pases de la célula, lotes de toxina, variabilidad entre purificaciones, y variabilidad entre reacciones de ruptura de una molécula (***"nicking reactions"***). Los parámetros de robustez para análisis basados en células incluyen el banco de las células (comienzo, mitad y fin del congelamiento), nivel de pases de la célula, densidad de siembra de la célula, densidad del stock de células (cuántos días en cultivo), edad de la célula en el matraz (tiempo de espera para la siembra), tiempo de incubación, diferentes placas, cantidades excesivas de suero y fuente de los reactivos. La idoneidad del sistema del método es la determinación del funcionamiento del análisis, incluyendo el funcionamiento de reactivos e instrumentos, durante el tiempo por análisis de un estándar de referencia. La idoneidad del sistema se recalca en la directriz de la FDA en referencia al hecho de que el equipo, electrónica, funcionamiento del análisis y muestras a analizar, constituyan un sistema integrado. La idoneidad del sistema puede evaluarse mediante pruebas con respecto al paralelismo, que consiste en que cuando se grafica la curva logaritmo de la dosis-respuesta, las diluciones seriales de la referencia y las diluciones seriales de las muestras deben dar lugar a curvas paralelas.

[085] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una célula de una línea celular establecida. Tal como se emplea en esta especificación, el término "célula" se refiere a cualquier célula eucariota susceptible a intoxicación BoNT/A por una BoNT/A, o cualquier célula eucariota que puede captar una BoNT/A. El término célula abarca células de una variedad de organismos, tales como, *por ej.*, células de ratón, rata, porcino, bovino, equino, primate y humano; de una variedad de tipos de células como, *por ej.*, neuronales y no neuronales; y pueden aislarse de, o parte de, una población de células heterogéneas, tejido u organismo. Tal como se emplea en esta especificación, el término "línea celular

60

establecida" es sinónimo con "línea celular inmortal," o "línea celular transformada" y se refiere a un cultivo celular de células seleccionadas para propagación indefinida de una población celular derivada de un organismo, tejido, o fuente de órganos. Por definición, una línea celular establecida excluye un cultivo celular de células primarias. Tal como se emplea en esta especificación, el término "células primarias" son células recolectadas directamente de tejidos u órganos frescos y no tienen el potencial de propagarse indefinidamente. Una línea celular establecida puede comprender una población heterogénea de células o una población uniforme de células. Una línea celular establecida derivada de una célula única se denomina una línea celular clonal. Una línea celular establecida puede ser una cuyas células expresan endógenamente todos los componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo celular general, por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25, y abarca la unión de una BoNT/A a un receptor BoNT/A, la internalización del complejo neurotoxina/receptor, la traslocación de la cadena ligera BoNT/A de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de una SNAP-25. Alternativamente, una línea celular establecida puede ser una a cuyas células se ha introducido de una fuente exógena por lo menos un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo celular general, por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25, y abarca la unión de una BoNT/A a un receptor BoNT/A, la internalización del complejo neurotoxina/receptor, la traslocación de la cadena ligera BoNT/A de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de una SNAP-25. También denominada una línea celular genomanipulada, las células de tal línea celular establecida pueden, *por ej.*, expresar un FGFR2 exógeno, un FGFR3 exógeno, una SV2 exógena, una SNAP-25 exógena, o cualquier combinación de los mismos.

[086] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una célula de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A. Tal como se emplea en esta especificación, los términos "célula(s) susceptible(s) a intoxicación BoNT/A," "célula(s) susceptible(s) a intoxicación BoNT/A por una BoNT/A," o "células(s) de una línea celular establecida susceptible(s) a intoxicación BoNT/A por una BoNT/A" se refieren a célula(s) que puede(n) experimentar el mecanismo general por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25 y

abarca la unión de una BoNT/A a un receptor BoNT/A, la internalización del complejo neurotoxina/receptor, la traslocación de la cadena ligera BoNT/A de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de una SNAP-25. Por definición, célula(s) susceptible(s) a intoxicación BoNT/A tiene(n) que expresar, o genomanipularse para expresar, por lo menos un receptor BoNT/A y por lo menos un sustrato SNAP-25. Tal como se emplea en esta especificación, los términos "célula(s) que puede(n) captar BoNT/A" o "célula(s) que comprende(n) una línea celular establecida que puede captar BoNT/A" se refieren a células que pueden experimentar el mecanismo general por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25 y abarca la unión de una BoNT/A a un receptor BoNT/A, la internalización del complejo neurotoxina/receptor, la traslocación de la cadena ligera BoNT/A de una vesícula intracelular al citoplasma y la escisión proteolítica de una SNAP-25. Por definición, célula(s) que puede(n) captar BoNT/A tienen que expresar, o genomanipularse para expresar, por lo menos un receptor BoNT/A y por lo menos un sustrato SNAP-25.

[087] Por consiguiente, en una incorporación, células de una línea celular establecida son susceptibles a intoxicación BoNT/A. En aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida son susceptibles a intoxicación BoNT/A en, *por ej.*, alrededor de 500 pM o menos, alrededor de 400 pM o menos, alrededor de 300 pM o menos, alrededor de 200 pM o menos, o alrededor de 100 pM, o menos de una BoNT/A. En otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida son susceptibles a intoxicación BoNT/A e, *por ej.*, alrededor de 90 pM o menos, alrededor de 80 pM o menos, alrededor de 70 pM o menos, alrededor de 60 pM o menos, alrededor de 50 pM o menos, alrededor de 40 pM o menos, alrededor de 30 pM o menos, alrededor de 20 pM o menos, o alrededor de 10 pM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos, células de una línea celular establecida son susceptibles a intoxicación BoNT/A en, *por ej.*, alrededor de 9 pM o menos, alrededor de 8 pM o menos, alrededor de 7 pM o menos, alrededor de 6 pM o menos, alrededor de 5 pM o menos, alrededor de 4 pM o menos, alrededor de 3 pM o menos, alrededor de 2 pM o menos, o alrededor de 1 pM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos, células de una línea celular establecida son susceptibles a intoxicación BoNT/A en, *por ej.*, alrededor de 0.9 pM o menos, alrededor de 0.8 pM o menos, alrededor de 0.7 pM o menos, alrededor de 0.6 pM o menos, alrededor de 0.5 pM

GL

o menos, alrededor de 0.4 pM o menos, alrededor de 0.3 pM o menos, alrededor de 0.2 pM, o alrededor de 0.1 pM o menos de una BoNT/A. Tal como se emplea en esta especificación, el término "alrededor de" cuando se califica un valor de un ítem, número, porcentaje, o término indicado, se refiere a un intervalo de más o menos diez por ciento del valor del ítem, porcentaje, parámetro, o término indicado.

[088] En otra incorporación, células que comprenden una línea celular establecida pueden captar una BoNT/A. En aspectos de esta incorporación, células que comprenden una línea celular establecida pueden captar, *por ej.*, alrededor de 500 pM o menos, alrededor de 400 pM o menos, alrededor de 300 pM o menos, alrededor de 200 pM o menos, o alrededor de 100 pM o menos de una BoNT/A. En otros aspectos de esta incorporación, células que comprenden una línea celular establecida poseen la capacidad de captar alrededor de 90 pM o menos, alrededor de 80 pM o menos, alrededor de 70 pM o menos, alrededor de 60 pM o menos, alrededor de 50 pM o menos, alrededor de 40 pM o menos, alrededor de 30 pM o menos, alrededor de 20 pM o menos, o alrededor de 10 pM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos, células que comprenden una línea celular establecida poseen la capacidad de captar alrededor de 9 pM o menos, alrededor de 8 pM o menos, alrededor de 7 pM o menos, alrededor de 6 pM o menos, alrededor de 5 pM o menos, alrededor de 4 pM o menos, alrededor de 3 pM o menos, alrededor de 2 pM o menos, o alrededor de 1 pM o menos de una BoNT/A. En todavía otros aspectos, células que comprenden una línea celular establecida poseen la capacidad de captar alrededor de 0.9 pM o menos, alrededor de 0.8 pM o menos, alrededor de 0.7 pM o menos, alrededor de 0.6 pM o menos, alrededor de 0.5 pM o menos, alrededor de 0.4 pM o menos, alrededor de 0.3 pM o menos, alrededor de 0.2 pM o menos, o alrededor de 0.1 pM o menos de una BoNT/A.

[089] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una BoNT/A. Tal como se emplea en esta especificación, el término "BoNT/A" es sinónimo con "neurotoxina botulínica serotipo A" o "neurotoxina botulínica tipo A" y se refiere tanto a una BoNT/A de ocurrencia natural como a sus BoNT/As de ocurrencia no natural, e incluye el complejo BoNT/A, que comprende la neurotoxina BoNT/A de alrededor de 150 kDa y las correspondiente proteínas no asociadas a toxina (NAPs - *non-toxin associated proteins*), así como la neurotoxina BoNT/A de

alrededor de 150 kDa sola. Ejemplos no limitantes de complejos BoNT/A incluyen, *por ej.*, el complejo BoNT/A de 900-kDa, el complejo BoNT/A de 500-kDa, el complejo BoNT/A de 300-kDa. Ejemplos no limitantes de la neurotoxina BoNT/A de alrededor de 150 kDa incluyen, *por ej.*, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4.

[090] Tal como se emplea en esta especificación, el término "BoNT/A de ocurrencia natural" se refiere a cualquier BoNT/A producida por un proceso de ocurrencia natural, incluyendo, sin limitación, isoformas BoNT/A producidas de una modificación pos-translacional, un transcrito alternativamente cortado y empalmado, o una mutación espontánea, y subtipos BoNT/A, tales como, *por ej.*, un subtipo BoNT/A1, un subtipo BoNT/A2, un subtipo BoNT/A3, un subtipo BoNT/A4, y el subtipo BoNT/A5. Una BoNT/A de ocurrencia natural incluye, sin limitación, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o una que sustituye, deleciona o agrega, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4. Composiciones farmacéuticas disponibles en el comercio de BoNT/A de ocurrencia natural incluyen, sin limitación, BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, Inglaterra), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Alemania), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, Corea del Sur), BTX-A.

[091] Tal como se emplea en esta especificación, el término "BoNT/A de ocurrencia no natural" se refiere a cualquier BoNT/A cuya estructura se modificó con la ayuda de manipulación humana, incluyendo, sin limitación, una BoNT/A con una secuencia de aminoácidos alterada, producida por ingeniería genética usando mutagénesis aleatoria o diseño racional, y una BoNT/A producida por síntesis química *in vitro*. Ejemplos no limitantes de BoNT/As de ocurrencia no natural se describen en, *por ej.*, Steward, L.E. et al., *Post-translational Modifications and Clostridial Neurotoxins,* Patente de los Estados Unidos 7,223,577; Dolly, J.O. et al., *Activatable Clostridial Toxins,* Patente de los Estados Unidos No. 7,419,676; Steward, L.E. et al., *Clostridial Neurotoxin Compositions and Modified Clostridial Neurotoxins,* US 2004/0220386; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins*

With Enhanced Targeting Capabilities For Endogenous Clostridial Toxin Receptor Systems, Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2008/0096248; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins With Altered Targeting Capabilities For Clostridial Toxin Target Cells,* Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2008/0161543; Steward, L.E. et al., *Modified Clostridial Toxins With Enhanced Translocation Capabilities and Altered Targeting Activity For Clostridial Toxin Target Cells,* Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2008/0241881, cada una de las cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad.

[092] Por consiguiente, en una incorporación, la actividad BoNT/A que se está detectando es de una BoNT/A de ocurrencia natural. En aspectos de esta incorporación, la actividad BoNT/A que se está detectando es de una isoforma BoNT/A o un subtipo BoNT/A. En aspectos de esta incorporación, la actividad BoNT/A que se está detectando es de la BoNT/A de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos de esta incorporación, la actividad BoNT/A que se está detectando es de una BoNT/A que tiene, *por ej.*, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos de esta incorporación, la actividad BoNT/A que se está detectando es de BOTOX®, DYSPORT®/RELOXIN®, PURTOX®, XEOMIN®, NEURONOX®, o BTX-A.

[093] En otra incorporación, la actividad BoNT/A que se está detectando es de una BoNT/A de ocurrencia no natural. En otros aspectos de esta incorporación, la actividad BoNT/A que se está detectando es de una variante BoNT/A de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos de esta incorporación, la actividad BoNT/A que se está detectando es de una variante BoNT/A de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguas relativas a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4. En todavía otros aspectos de esta incorporación, la actividad BoNT/A que se está detectando es de

GS

una variante BoNT/A de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos contiguas relativas a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4.

[094] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una SNAP-25. Tal como se emplea en esta especificación, el término "SNAP-25" se refiere a una SNAP-25 de ocurrencia natural o una SNAP-25 de ocurrencia no natural que es escindida preferencialmente por una BoNT/A. Tal como se emplea en esta especificación, el término "es escindida preferencialmente" se refiere a que la velocidad de la escisión proteolítica del sustrato BoNT/A por una BoNT/A es por lo menos un orden de magnitud mayor que la velocidad de la escisión proteolítica de cualquier otro sustrato por BoNT/A. En aspectos de esta incorporación, la velocidad de la escisión proteolítica de un sustrato BoNT/A por una BoNT/A es por lo menos dos órdenes de magnitud mayor, por lo menos tres órdenes de magnitud mayor, por lo menos cuatro órdenes de magnitud mayor, o por lo menos cinco órdenes de magnitud mayor que la velocidad de la escisión proteolítica de cualquier otro sustrato por BoNT/A.

[095] Tal como se emplea en esta especificación, el término "SNAP-25 de ocurrencia natural" se refiere a cualquier SNAP-25 producida por un proceso de ocurrencia natural, incluyendo, sin limitación, isoformas SNAP-25 producidas de una modificación pos-translacional, un transcrito alternativamente cortado y empalmado, o una mutación espontánea, y subtipos SNAP-25. Una SNAP-25 de ocurrencia natural incluye, sin limitación, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24, o una que sustituya, delecione o agregue, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18,

SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

[096] Tal como se emplea en esta especificación, el término " SNAP-25 de ocurrencia no natural" se refiere a cualquier SNAP-25 cuya estructura se modificó con la ayuda de manipulación humana, incluyendo, sin limitación, una SNAP-25 producida por ingeniería genética usando mutagénesis aleatoria o diseño racional y una SNAP-25 producida por síntesis química *in vitro*. Ejemplos no limitantes de SNAP-25s de ocurrencia no natural se describen en, *por ej.*, Steward, L.E. et al., *FRET Protease Assays for Clostridial Toxins,* Patente de los Estados Unidos 7,332,567; Fernandez-Salas et al., *Lipohilic Dye-based FRET Assays for Clostridial Toxin Activity,* Publicación de Patente de los Estados Unidos 2008/0160561, cada una de las cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad. Una SNAP-25 de ocurrencia no natural puede sustituir, eliminar o agregar, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

[097] Por consiguiente, en una incorporación, una SNAP-25 es una SNAP-25 de ocurrencia natural. En aspectos de esta incorporación, la SNAP-25 es una isoforma SNAP-25 o un subtipo SNAP-25. En aspectos de esta incorporación, la SNAP-25 de ocurrencia natural es la SNAP-25 de ocurrencia natural de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta incorporación, la SNAP-25 es una SNAP-25 de ocurrencia natural que tiene, *por ej.*, por lo menos 70% de identidad de aminoácidos, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID

GN

NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

[098] En otra incorporación, una SNAP-25 es una SNAP-25 de ocurrencia no natural. En otros aspectos de esta incorporación, la SNAP-25 es una SNAP-25 de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4. En otros aspectos de esta incorporación, la SNAP-25 es una SNAP-25 de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguas relativas a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24. En todavía otros aspectos de esta incorporación, la SNAP-25 es una SNAP-25 de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos contiguas relativas a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

[099] Una SNAP-25 puede ser una SNAP-25 endógena o una SNAP-25 exógena. Tal como se emplea en esta especificación, el término " SNAP-25 endógena" se refiere a una SNAP-25 presente naturalmente en la célula porque está naturalmente codificada en el genoma de la célula, de tal modo que la célula expresa inherentemente la SNAP-25 sin la necesidad de una fuente externa de SNAP-25 o una fuente externa de material genético que codifique una SNAP-25. La expresión de una SNAP-25 endógena puede ser con o sin estimulación ambiental tal como, *por ej.*, diferenciación celular. Por definición, una SNAP-25

GB

endógena puede ser únicamente una SNAP-25 de ocurrencia natural o variantes de la misma. Por ejemplo, las siguientes líneas celulares establecidas expresan una SNAP-25 endógena: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa y SK-N-BE(2)-C.

[0100] Tal como se emplea en esta especificación, el término "SNAP-25 exógena" se refiere a una SNAP-25 expresada en una célula mediante la introducción de una fuente externa de SNAP-25 o una fuente externa de material genético que codifica una SNAP-25 por manipulación humana. La expresión de una SNAP-25 exógena puede ser con o sin estimulación ambiental tal como, *por ej.*, diferenciación celular. Como un ejemplo no limitante, células de una línea celular establecida pueden expresar una SNAP-25 exógena por transfección transitoria o estable de una SNAP-25. Como otro ejemplo no limitante, células de una línea celular establecida pueden expresar una SNAP-25 exógena por transfección proteínica de una SNAP-25. Una SNAP-25 exógena puede ser una SNAP-25 de ocurrencia natural o sus variantes, o una SNAP-25 de ocurrencia no natural o sus variantes.

[0101] Por consiguiente, en una incorporación, células de una línea celular establecida expresan una SNAP-25 endógena. En aspectos de esta incorporación, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es una SNAP-25 de ocurrencia natural. En otros aspectos de esta incorporación, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24. En todavía más aspectos de esta incorporación, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es una SNAP-25 de ocurrencia natural, tal como, *por ej.*, una isoforma SNAP-25 o un subtipo SNAP-25. En otros aspectos de esta incorporación, la SNAP-25 endógena expresada por células de una línea celular establecida es una SNAP-25 de ocurrencia natural que tiene, *por ej.*, por lo menos 70% de identidad de aminoácidos, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,

SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

[0102] En otra incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar una SNAP-25 exógena. En un aspecto de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar una SNAP-25 de ocurrencia natural. En otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar la SNAP-25 de ocurrencia natural de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24. En todavía ctros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar una SNAP-25 de ocurrencia natural, tal como, *por ej.*, una isoforma SNAP-25 o un subtipo SNAP-25. En todavía otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar una SNAP-25 de ocurrencia natural que tiene, *por ej.*, por lo menos 70% de identidad de aminoácidos, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

[0103] En otro aspecto de la incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar una SNAP-25 de ocurrencia no natural. En otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar una SNAP-25 de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%,

170

por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24. En otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar una SNAP-25 de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguas relativas a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24. En todavía otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar una SNAP-25 de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos contiguas relativas a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24.

[0104] Análisis que detectan la escisión proteolítica de un sustrato BoNT/A luego de la exposición a una BoNT/A pueden usarse para evaluar si una célula está expresando una SNAP-25 endógena o una SNAP-25 exógena. En estos análisis, la generación de un producto de escisión SNAP-25 se detectaría en células que expresan una SNAP-25 luego del tratamiento BoNT/A. Ejemplos no limitantes de análisis Western blot específicos, así como reactivos, condiciones y protocolos bien caracterizados se encuentran fácilmente disponibles de vendedores comerciales que incluyen, sin limitación, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, y Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Se entiende

que éstos y análisis similares para la escisión proteolítica de SNAP-25 pueden ser útiles en identificar células que expresan una SNAP-25 endógena o una SNAP-25 exógena.

[0105] Como ejemplos no limitantes, análisis Western blot, que emplean un anticuerpo que reconoce un producto BoNT/A escindido por SNAP-25 o las dos formas escindidas y no escindidas de SNAP-25, pueden usarse para analizar la captación de BoNT/A. Ejemplos de anticuerpos α-SNAP-25 útiles para estos análisis incluyen, sin limitación, un anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), un anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 Cl 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), un anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 Cl 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), un anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 SP12 (Abeam, Cambridge, MA), un antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), un antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 (Abeam, Cambridge, MA) y un antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 S9684 (Sigma, St Louis, MO).

[0106] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un receptor BoNT/A. Tal como se emplea en esta especificación, el término "receptor BoNT/A" se refiere a un receptor BoNT/A de ocurrencia natural o a un receptor BoNT/A de ocurrencia no natural que preferencialmente interactúa con BoNT/A en una manera que provoca una respuesta de intoxicación BoNT/A. Tal como se emplea en esta especificación, el término "preferencialmente interactúa" se refiere a que la constante de disociación de equilibrio (KD) de BoNT/A para un receptor BoNT/A es por lo menos un orden de magnitud menor del de BoNT/A para cualquier otro receptor en la superficie celular. La constante de disociación de equilibrio, un tipo específico de constante de equilibrio que mide la propensión de un complejo BoNT/A-receptor BoNT/A a separarse (disociarse) reversiblemente en sus moléculas componentes, a saber, la BoNT/A y el receptor BoNT/A, se define como KD=Ka/Kd en equilibrio. La constante de asociación (Ka) se define como Ka=[C]/[L][R] y la constante de disociación (Kd) se define como Kd=[L][R]/[C], donde [L] equivale a la concentración molar de BoNT/A, [R] es la concentración molar de un receptor BoNT/A y [C] es la concentración molar del complejo BoNT/A-receptor BoNT/A, y donde todas las concentraciones son de tales

172

componentes cuando el sistema está en equilibrio. A menor constante de disociación, más estrechamente está ligada la BoNT/A a su receptor, o mayor es la afinidad de unión entre BoNT/A y el receptor BoNT/A. En aspectos de esta incorporación, la constante de disociación de BoNT/A para un receptor BoNT/A es por lo menos dos órdenes de magnitud menos, por lo menos tres órdenes de magnitud menos, por lo menos cuatro órdenes de magnitud menos, o por lo menos cinco órdenes de magnitud menos de el de BoNT/A para cualquier otro receptor. En otros aspectos de esta incorporación, la afinidad de unión de una BoNT/A que preferencialmente interactúa con un receptor BoNT/A puede tener una constante de disociación de equilibrio (KD) de, *por ej.*, de 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM, o menos 100 nM o menos. En otros aspectos de esta incorporación, la afinidad de unión de una BoNT/A que preferencialmente interactúa con un receptor BoNT/A puede tener una constante de disociación de equilibrio (KD) de, *por ej.*, 90 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 60 nM, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM, o menos 10 nM o menos. Tal como se emplea en esta especificación, el término "provoca una respuesta de intoxicación BoNT/A" se refiere a la capacidad de un receptor BoNT/A de interactuar con una BoNT/A para formar un complejo neurotoxina/receptor y la subsiguiente internalización de ese complejo en el citoplasma de la célula.

[0107] Tal como se emplea en esta especificación, el término "receptor BoNT/A de ocurrencia natural" se refiere a cualquier receptor BoNT/A producido por un proceso de ocurrencia natural, incluyendo, sin limitación, isoformas de receptor BoNT/A producidas de una modificación pos-translacional, un transcrito alternativamente cortado y empalmado, o una mutación espontánea, y subtipos de receptor BoNT/A. Un receptor BoNT/A de ocurrencia natural incluye, sin limitación, un receptor 2 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2), un receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), una glucoproteína 2 de vesícula sináptica (SV2 - *synaptic vesicle glycoprotein 2*), y un complejo tipo ganglíosido GT1b, tales como los descritos en Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays,* Publicación de Patente de los Estados Unidos 2008/0003240; Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays,* Publicación de Patente de los Estados Unidos 2008/0182799; Min Dong et al., *SV2 is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A,* Science (2006); S. Mahrhold et al., *The*

Synaptic Vesicle Protein 2C Mediates the Uptake of Botulinum Neurotoxin A into Phrenic Nerves, 580(8) FEBS Lett. 2011-2014 (2006), cada una de las cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad. Un FGFR2 de ocurrencia natural incluye, sin limitación, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70, o una que sustituya, delecione o agregue, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70. Un FGFR3 de ocurrencia natural incluye, sin limitación, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, o una que sustituya, delecione o agregue, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27. Una SV2 de ocurrencia natural incluye, sin limitación, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31, o una que sustituya, delecione o agregue, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31.

[0108] Tal como se emplea en esta especificación, el término "variante de receptor BoNT/A de ocurrencia no natural" se refiere a cualquier receptor BoNT/A producido con la ayuda de manipulación humana o diseño, incluyendo, sin limitación, un receptor BoNT/A producido por ingeniería genética usando mutagénesis aleatoria o diseño racional y un receptor BoNT/A producido por síntesis química. Ejemplos no limitantes de variantes de BoNT/A de ocurrencia no natural incluyen, *por ej.*, variantes conservadoras de receptor BoNT/A, variantes no conservadoras de receptor BoNT/A, variantes quiméricas de receptor BoNT/A y fragmentos activos de receptor BoNT/A.

[0109] Tal como se emplea en esta especificación, el término "receptor BoNT/A de ocurrencia no natural " se refiere a cualquier receptor BoNT/A cuya estructura se modificó con la ayuda de manipulación humana, incluyendo, sin limitación, un

receptor BoNT/A producido por ingeniería genética usando mutagénesis aleatoria o diseño racional y un receptor BoNT/A producido por síntesis química *in vitro*. Ejemplos no limitantes de receptores BoNT/A de ocurrencia no natural se describen en, *por ej.*, Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays,* Publicación de Patente de los Estados Unidos 2008/0003240; Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays,* Publicación de Patente de los Estados Unidos 2008/0182799, cada una de las cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad. Un receptor BoNT/A de ocurrencia no natural puede sustituir, eliminar o agregar, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más aminoácidos de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70.

[0110] Por consiguiente, en una incorporación, un receptor BoNT/A es un receptor BoNT/A de ocurrencia natural tal como, *por ej.*, FGFR2, FGFR3 o SV2. En aspectos de esta incorporación, el receptor BoNT/A es una isoforma de receptor BoNT/A o un subtipo de receptor BoNT/A. En aspectos de esta incorporación, el receptor BoNT/A de ocurrencia natural es el receptor BoNT/A de ocurrencia natural de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70. En otros aspectos de esta incorporación, el receptor BoNT/A es un receptor BoNT/A de ocurrencia natural que tiene, *por ej.*, por lo menos 70% de identidad de aminoácidos, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70.

[0111] En otra incorporación, un receptor BoNT/A es un receptor BoNT/A de

ocurrencia no natural, tal como, *por ej.*, un FGFR2 genéticamente modificado, un FGFR3 genéticamente modificado, o una SV2 genéticamente modificada. En otros aspectos de esta incorporación, el receptor BoNT/A es un receptor BoNT/A de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70. En otros aspectos de esta incorporación, el receptor BoNT/A es un receptor BoNT/A de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguas relativas a SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70. En todavía otros aspectos de esta incorporación, el receptor BoNT/A es un receptor BoNT/A de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguas relativas a SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70.

[0112] Un receptor BoNT/A puede ser un receptor BoNT/A endógeno o un receptor BoNT/A exógeno. Tal como se emplea en esta especificación, el término "receptor BoNT/A endógeno" se refiere a un receptor BoNT/A naturalmente presente en la célula porque está codificado naturalmente en el genoma de la célula, de modo que la célula expresa inherentemente el receptor BoNT/A sin necesidad de una fuente externa de receptor BoNT/A o una fuente externa de material genético, que codifica un receptor BoNT/A. La expresión de un receptor BoNT/A endógeno puede ser con o sin estimulación ambiental tal como *por ej.*,

diferenciación celular o activación de un promotor. Por ejemplo, las siguientes líneas celulares establecidas expresan por lo menos un receptor BoNT/A endógeno: BE(2)-M17, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa y SK-N-BE(2)-C. Un receptor BoNT/A endógeno puede ser únicamente un receptor BoNT/A de ocurrencia natural o sus variantes de ocurrencia natural.

[0113] Tal como se emplea en esta especificación, el término "receptor BoNT/A exógeno" se refiere a un receptor BoNT/A expresado en una célula por la introducción de una fuente externa de receptor BoNT/A o una fuente externa de material genético que codifica un receptor BoNT/A por manipulación humana. La expresión del receptor BoNT/A exógeno puede ser con o sin estimulación ambiental tal como, *por ej.*, diferenciación celular o activación de un promotor. Como un ejemplo no limitante, células de una línea celular establecida pueden expresar uno o más receptores BoNT/A exógenos por transfección transitoria o estable de una molécula polinucleotídica que codifica un receptor BoNT/A, tal como, *por ej.*, un FGFR2, un FGFR3, o una SV2. Como otro ejemplo no limitante, células de una línea celular establecida pueden expresar uno más receptores BoNT/A exógenos por transfección de proteína de los receptores BoNT/A, tales como, *por ej.*, un FGFR2, un FGFR3, o una SV2. El receptor BoNT/A exógeno puede ser un receptor BoNT/A de ocurrencia natural o sus variantes de ocurrencia natural, o un receptor BoNT/A de ocurrencia no natural o sus variantes de ocurrencia no natural.

[0114] Por consiguiente, en una incorporación, células de una línea celular establecida expresan un receptor BoNT/A endógeno. En aspectos de esta incorporación, el receptor BoNT/A endógeno expresado por células de una línea celular establecida es un receptor BoNT/A de ocurrencia natural. En otros aspectos de esta incorporación, el receptor BoNT/A endógeno expresado por células de una línea celular establecida es SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70. En todavía más aspectos de esta incorporación, el receptor BoNT/A endógeno expresado por células de una línea celular establecida

es un receptor BoNT/A de ocurrencia natural, tal como, *por ej.*, una isoforma de receptor BoNT/A o un subtipo de receptor BoNT/A. En otros aspectos de esta incorporación, el receptor BoNT/A endógeno expresado por células de una línea celular establecida es un receptor BoNT/A de ocurrencia natural que tiene, *por ej.*, por lo menos 70% de identidad de aminoácidos, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70.

[0115] En otra incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar un receptor BoNT/A exógeno. En un aspecto de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar un receptor BoNT/A de ocurrencia natural. En otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar el receptor BoNT/A de ocurrencia natural de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70. En todavía otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar un receptor BoNT/A de ocurrencia natural, tal como, *por ej.*, una isoforma de receptor BoNT/A o un subtipo de receptor BoNT/A. En todavía otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar un receptor BoNT/A de ocurrencia natural que tiene, *por ej.*, por lo menos 70% de identidad de aminoácidos, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69,

98

o SEQ ID NO: 70.

[0116] En otro aspecto de la incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar un receptor BoNT/A de ocurrencia no natural. En otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar un receptor BoNT/A de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70. En otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar un receptor BoNT/A de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos no contiguas, relativas a SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70. En todavía otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar un receptor BoNT/A de ocurrencia no natural que tiene, *por ej.*, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o 100 o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos contiguas, relativas a SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70

[0117] En otra incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar un FGFR2 exógeno, un

FGFR3 exógeno, una SV2 exógena, o cualquier combinación de los mismos. En aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar un FGFR2 de ocurrencia natural, un FGFR3 de ocurrencia natural, una SV2 de ocurrencia natural, o cualquier combinación de los mismos. En todavía otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar un FGFR2 de ocurrencia no natural, un FGFR3 de ocurrencia no natural, una SV2 de ocurrencia no natural, o cualquier combinación de los mismos. En todavía otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida se genomanipulan transitoria o establemente para expresar uno cualquiera de un FGFR2 de ocurrencia natural o un FGFR2 de ocurrencia no natural, un FGFR3 de ocurrencia natural o un FGFR3 de ocurrencia no natural, una SV2 de ocurrencia natural o una SV2 de ocurrencia no natural, o cualquier combinación de los mismos.

[0118] Células que expresan uno o más receptores BoNT/A endógenos o exógenos pueden identificarse por métodos rutinarios incluyendo análisis directos e indirectos para captación de toxinas. Análisis que determinan las propiedades de unión o captación de BoNT/A pueden utilizarse para evaluar si una célula está expresando un receptor BoNT/A. Tales análisis incluyen, sin limitación, análisis de enlazamiento cruzado que usan BoNT/A marcada, tal como, *por ej.*, [1251] BoNT/A, [1251], véase, *por ej.*, Noriko Yokosawa et al., *Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines,* 57(1) Infect. Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa et al., *Binding of botulinum type CI, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes,* 29(2) Toxicon 261-264 (1991); y Tei-ichi Nishiki et al., *Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes,* 269(14) J. Biol. Chem. 10498-10503 (1994). Otros análisis no limitantes incluyen análisis inmunocitoquímicos que detectan la unión de BoNT/A usando anticuerpos marcados y no marcados, véase, *por ej.*, Atsushi Nishikawa et al., *The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells,* 319(2) Biochem. Biophys. Res. Commun. 327-333 (2004) y análisis de inmunoprecipitación, véase, *por ej.*, Yukako Fujinaga et al., *Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes,* 150(Pt 5)

Microbiology 1529-1538 (2004), que detectan toxina ligada usando anticuerpos marcados y no marcados. Anticuerpos útiles para estos análisis incluyen, sin limitación, anticuerpos seleccionados contra BoNT/A, anticuerpos seleccionados contra un receptor BoNT/A, tal como, *por ej.*, FGFR2, FGFR3, o SV2, y/o anticuerpos seleccionados contra un gangliósido, tal como, *por ej.*, GD1a, GD1b, GD3, GQ1b, o GT1 b. Si el anticuerpo es marcado, la unión de la molécula puede detectarse por varios medios, incluyendo análisis Western blot, observación microscópica directa de la localización celular del anticuerpo, medición del anticuerpo adherido a la célula o sustrato luego de un paso de lavado, citometría de flujo, electroforesis o electroforesis capilar, empleando técnicas bien conocidas por los expertos en el arte. Si el anticuerpo no es marcado, se puede emplear un anticuerpo secundario marcado para detección indirecta de la molécula ligada, y la detección puede proseguir como para un anticuerpo marcado. Se entiende que estos y similares análisis que determinan las propiedades o características de la captación de BoNT/A pueden ser útiles en identificar células que expresan receptores BoNT/A endógenos o exógenos.

[0119] Análisis que monitorean la liberación de una molécula luego de la exposición a BoNT/A pueden usarse asimismo para evaluar si una célula está expresando uno o más receptores BoNT/A endógenos o exógenos. En estos análisis, la inhibición de la liberación de la molécula ocurriría en células que expresan un receptor BoNT/A luego del tratamiento BoNT/A. Análisis bien conocidos incluyen métodos que miden la inhibición de la liberación de una catecolamina radio-marcada de neuronas, tales como, *por ej.*, liberación de [3H] noradrenalina o [3H] dopamina, véase, *por ej.*, A Fassio et al., *Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F,* 90(3) Neuroscience 893-902 (1999); y Sara Stigliani et al., *The sensitivity of catecholamine release to botulinum toxin C1 and E suggests selective targeting of vesicles set into the readily releasable pool,* 85(2) J. Neurochem. 409-421 (2003), o miden la liberación de catecolamina usando un procedimiento fluorométrico, véase, *por ej.*, Anton de Paiva et al., *A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly,* 268(28) J. Biol. Chem. 20838-20844 (1993); Gary W. Lawrence et al., *Distinct exocytotic responses of intact and permeabilised*

chromaffin cells after cleavage of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) or synaptobrevin by botulinum toxin A or B, 236(3) Eur. J. Biochem. 877-886 (1996); y Patrick Foran et al., *Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabiiized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release,* 35(8) Biochemistry 2630-2636 (1996). Otros ejemplos no limitantes incluyen análisis que miden la inhibición de la liberación de hormonas de células endocrinas, tales como, *por ej.*, células de la pituitaria anterior o células ováricas. Se entiende que estos análisis y similares para liberación de moléculas pueden ser útiles en identificar células que expresan receptores BoNT/A endógenos o exógenos.

[0120] Análisis que detectan la escisión proteolítica de un sustrato BoNT/A luego de la exposición a una BoNT/A pueden usarse asimismo para evaluar si una célula está expresando uno o más receptores BoNT/A endógenos o exógenos. En estos análisis, la generación de un producto de escisión de un sustrato BoNT/A, o la desaparición del sustrato BoNT/A intacto, se detectaría en células que expresan un receptor BoNT/A luego del Tratamiento BoNT/A. Ejemplos no limitantes de análisis Western blot específicos, así como reactivos, condiciones y protocolos bien caracterizados se encuentran fácilmente disponibles de vendedores comerciales que incluyen, sin limitación, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, y Stratagene, Inc., La Jolla, CA. Se entiende que estos y similares análisis para la escisión proteolítica de un sustrato BoNT/A pueden ser útiles en identificar células que expresan receptores BoNT/A endógenos o exógenos.

[0121] Como ejemplos no limitantes, análisis Western blot que utilizan un anticuerpo que reconoce un producto escindido SNAP-25 BoNT/A o las dos formas escindidas y no escindidas de SNAP-25 pueden usarse para analizar la captación de BoNT/A. Ejemplos de anticuerpos α-SNAP-25 útiles para estos análisis incluyen, sin limitación, anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 de ratón SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 Cl 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 Cl 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 SP12 (Abeam, Cambridge,

MA), antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO), y antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 (Abeam, Cambridge, MA).

[0122] Aspectos de la presente divulgación proporcionan células que, a través de manipulación genética o ingeniería recombinante, se elaboran para expresar una SNAP-25 exógena y/o uno o más receptores BoNT/A exógenos. Células útiles para expresar una SNAP-25 exógena y/o uno o más receptores BoNT/A exógenos a través de manipulación genética o ingeniería recombinante incluyen células neuronales y células no neuronales que pueden, o no pueden, expresar una SNAP-25 endógena y/o uno o más receptores BoNT/A endógenos. Se entiende además que tales células, manipuladas genéticamente o modificadas por ingeniería recombinante, pueden expresar una SNAP-25 exógena y uno o más receptores BoNT/A exógenos bajo control de un elemento promotor constitutivo, específico del tejido, específico de la célula o inducible, un elemento potenciador o ambos. Se entiende que cualquier célula es útil siempre que la célula pueda manipularse genéticamente o modificarse por ingeniería recombinante para expresar una SNAP-25 exógena y/o uno o más receptores BoNT/A exógenos y sea capaz de experimentar intoxicación BoNT/A.

[0123] Métodos útiles para introducir en una célula una molécula exógena polinucleotídica, que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo general por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25, tales como, *por ej.*, una SNAP-25, un FGFR2, un FGFR3, o una SV2, incluyen, sin limitación, métodos de transferencia mediada químicamente, tales como, *por ej.*, métodos de transferencia mediada por fosfato de calcio, mediada por dietil-aminoetil (DEAE) dextrano, mediada por lípido, mediada por polietilenimina (PEI), mediada por polilisina y mediada por polibreno; métodos de transferencia mediada físicamente, tales como, *por ej.*, transferencia biolística de partículas, microinyección, fusión de protoplastos y electroporación; y métodos de transferencia mediada víricamente, tales como, *por ej.*, transfección mediada retrovíricamente, véase, *por ej.*, *Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells,* páginas 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); y Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, páginas 9.16.4-9.16.11 (2000), cada uno de los cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad. Un experto en el arte entiende que la selección de un método específico de introducir una molécula polinucleotídica en una célula dependerá, en parte, de si la célula contendrá transitoria o establemente un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo general por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25. Ejemplos no limitantes de una molécula polinucleotídica, que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo general por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25, son los siguientes: molécula polinucleotídica FGFR2 de SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, o SEQ ID NO: 138; molécula polinucleotídica FGFR3 de SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, o SEQ ID NO: 141; molécula polinucleotídica SV2 de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, o SEQ ID NO: 144; y molécula polinucleotídica SNAP-25 de SEQ ID NO: 145, o SEQ ID NO: 146.

[0124] Métodos de transferencia mediada químicamente son bien conocidos por una persona de habilidad ordinaria en el arte y se describen en, *por ej.*, Martin Jordan & Florian Worm, *Transfection of Adherent and Suspended Cells by Calcium Phosphate,* 33(2) Methods 136-143 (2004); Chun Zhang et al., *Polyethylenimine Strategies for Plasmid Delivery to Brain-Derived Cells,* 33(2) Methods 144-150 (2004), cada uno de los cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad. Tales métodos de transferencia mediada químicamente pueden prepararse por procedimientos estándar y se encuentran disponibles en el comercio, véase, *por ej.*, CellPhect Transfection Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); Mammalian Transfection Kit, Calcium phosphate and DEAE Dextran, (Stratagene, Inc., La Jolla, CA); Lipofectamine™ Transfection Reagent (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); ExGen 500 Transfection kit (Fermentas, Inc., Hanover, MD), y SuperFect and Effectene Transfection Kits (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

[0125] Métodos de transferencia mediada físicamente son bien conocidos por una persona de habilidad ordinaria en el arte y se describen en, *por ej.*, 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); y Oliver Greschet al., *New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells,* 33(2) Methods 151-163 (2004), cada uno de los cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad.

[0126] Métodos de transferencia mediada víricamente son bien conocidos por una persona de habilidad ordinaria en el arte y se describen en, *por ej.*, Chooi M. Lai et al., *Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors,* 21(12) DNA Cell Biol. 895-913 (2002); Ilya Frolov et al., *Alphavirus-Based Expression Vectors: Strategies and Applications,* 93(21) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 11371-11377 (1996); Roland Wolkowicz et al., *Lentiviral Vectors for the Delivery of DNA into Mammalian Cells,* 246 Methods Mol. Biol. 391-411 (2004); A. Huser & C. Hofmann, *Baculovirus Vectors: Novel Mammalian Cell Gene-Delivery Vehicles and Their Applications,* 3(1) Am. J. Pharmacogenomics 53-63 (2003); Tiziana Tonini et al., *Transient Production of Retroviral- and Lentiviral-Based Vectors for the Transduction of Mammalian Cells,* 285 Methods Mol. Biol. 141-148 (2004); Manfred Gossen & Hermann Bujard, *Tight Control of Gene Expression in Eukaryotic Cells by Tetracycline-Responsive Promoters,* Patente de los Estados Unidos No. 5,464,758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, *Methods for Regulating Gene Expression,* Patente de los Estados Unidos No. 5,814,618; David S. Hogness, *Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same,* Patente de los Estados Unidos No. 5,514,578; David S. Hogness, *Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor,* Patente de los Estados Unidos 6,245,531; Elisabetta Vegeto et al., *Progesterone Receptor Having C. Terminal Hormone Binding Domain Truncations,* Patente de los Estados Unidos No. 5,364,791; Elisabetta Vegeto et al., *Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy,* Patente de los Estados Unidos No. 5,874,534, cada uno de los cuales se incorpora

85

por este medio por referencia en su totalidad. Tales métodos de transferencia mediada víricamente pueden prepararse por procedimientos estándar y se encuentran disponibles en el comercio, véase, *por ej.*, ViraPower™ Adenoviral Expression System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y ViraPower™ Adenoviral Expression System Instruction Manual 25-0543 version A, Invitrogen, Inc., (15 de julio de 2002); y AdEasy™ Adenoviral Vector System (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) y AdEasy™ Adenoviral Vector System Instruction Manual 064004f, Stratagene, Inc. Además, tales sistemas de transferencia vírica puede prepararse por métodos estándar y se encuentran disponibles en el comercio, véase, *por ej.*, BD™ Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems (BD Biosciences-Clonetech, Palo Alto, CA) y BD™ Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems User Manual, PT3001-1, BD Biosciences Clonetech, (14 de marzo de 2003), GeneSwitch™ System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y GeneSwitch™ System A Mifepristone-Regulated Expression System for Mammalian Cells version D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (4 de noviembre de 2002); ViraPower™ Lentiviral Expression System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y ViraPower™ Lentiviral Expression System Instruction Manual 25-0501 version E, Invitrogen, Inc., (8 de diciembre de 2003); y Complete Control® Retroviral Inducible Mammalian Expression System (Stratagene, La Jolla, CA) y Complete Control® Retroviral Inducible Mammalian Expression System Instruction Manual, 064005e.

[0127] Por consiguiente, en una incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen transitoriamente una molécula polinucleotídica que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo general por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25. En otra incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen transitoriamente una molécula polinucleotídica que codifica una pluralidad de componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo general por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25. En aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen transitoriamente una molécula polinucleotídica que codifica FGFR2, FGFR3, SV2 o SNAP-25. En aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen transitoriamente una molécula polinucleotídica que

codifica FGFR2 de SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, o SEQ ID NO: 138. En otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen transitoriamente una molécula polinucleotídica que codifica FGFR3 de SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, o SEQ ID NO: 141. En todavía otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen transitoriamente una molécula polinucleotídica que codifica SV2 de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, o SEQ ID NO: 144. En todavía otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen transitoriamente una molécula polinucleotídica que codifica SNAP-25 de SEQ ID NO: 145, o SEQ ID NO: 146.

[0128] En otra incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen establemente una molécula polinucleotídica que codifica un componente necesario para que las células experimenten el mecanismo general por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25. En otra incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen establemente una molécula polinucleotídica que codifica una pluralidad de componentes necesarios para que las células experimenten el mecanismo general por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25. En aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen establemente una molécula polinucleotídica que codifica FGFR2, FGFR3, SV2 o SNAP-25. En aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen establemente una molécula polinucleotídica que codifica FGFR2 de SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, o SEQ ID NO: 138. En otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen establemente una molécula polinucleotídica que codifica FGFR3 de SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, o SEQ ID NO: 141. En todavía otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen establemente una molécula polinucleotídica que codifica SV2 de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, o SEQ ID

NO: 144. En todavía otros aspectos de esta incorporación, células de una línea celular establecida susceptible a intoxicación BoNT/A contienen establemente una molécula polinucleotídica que codifica SNAP-25 de SEQ ID NO: 145, o SEQ ID NO: 146.

[0129] Como se mencionó anteriormente, un componente exógeno necesario para que las células experimenten el mecanismo general por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25, tales como, *por ej.*, una SNAP-25, un FGFR2, un FGFR3, o una SV2, divulgados en la presente especificación puede introducirse en una célula. Pueden ser útiles cualquiera y todos los métodos útiles para introducir tal componente exógeno con un agente de transferencia en una población de células, con la condición de que este método introduzca transitoriamente el componente exógeno, divulgado en la presente especificación, en por lo menos 50% de las células dentro de una población de células dada. Por consiguiente, aspectos de esta incorporación pueden incluir una población de células en la cual, *por ej.*, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, o por lo menos 90% de la población de células dada contiene transitoriamente un componente exógeno necesario para que las células experimenten el mecanismo general por el cual una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25, tales como, *por ej.*, una SNAP-25, un FGFR2, un FGFR3, o una SV2, divulgados en la presente especificación. Tal como se emplea en esta especificación, el término "agente de transferencia" se refiere a cualquier molécula que permita o intensifique la internalización de un componente enlazado covalentemente, no enlazado covalentemente o en cualquier otra manera asociado con un polipéptido en una célula. Por consiguiente, el término "agente de transferencia" abarca, sin limitación, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas, moléculas polinucleótido, liposomas, lípidos, virus, retrovirus y células que, sin limitación, transportan una molécula enlazada covalentemente o no covalentemente a la membrana de la célula, el citoplasma de la célula o el núcleo. Se entiende además que el término "agente de transferencia" abarca moléculas que se internalizan por cualquier mecanismo, incluyendo agentes de transferencia que funcionan por endocitosis mediada por receptor y aquellos que son independientes de la endocitosis mediada por receptor.

[0130] Un agente de transferencia puede ser también un agente que permite o intensifica la captación celular de un componente enlazado covalentemente, como FGFR2, FGFR3, SV2, o SNAP-25, tal como, *por ej.*, por conjugación química o por proteínas de fusión producidas genéticamente. Métodos que enlazan covalentemente agentes de transferencia y métodos de usar tales agentes se describen en, *por ej.*, Steven F. Dowdy, *Protein Transduction System and Methods of Use Thereof,* Publicación Internacional No. WO 00/34308; Gerard Chassaing & Alain Prochiantz, *Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules,* Patente de los Estados Unidos No. 6,080,724; Alan Frankel et al., *Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiety,* Patente de los Estados Unidos No. 5,674,980; Alan Frankel et al., *TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates,* Patente de los Estados Unidos No. 5,747,641; Alan Frankel et al., *TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins,* Patente de los Estados Unidos No. 5,804,604; Peter F. J. O'Hare et al., *Use of Transport Proteins,* Patente de los Estados Unidos No. 6,734,167; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells,* Patente de los Estados Unidos No. 5,807,746; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells,* Patente de los Estados Unidos No. 6,043,339; Yao-Zhong Lin et al., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity,* Patente de los Estados Unidos No. 6,248,558; Yao-Zhong Lin et al., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity,* Patente de los Estados Unidos No. 6,432,680; Jack J. Hawiger et al., *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells,* Patente de los Estados Unidos No. 6,495,518; Yao-Zhong Lin et al., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity,* Patente de los Estados Unidos No. 6,780,843; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes,* Patente de los Estados Unidos No. 6,306,993; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes,* Patente de los Estados Unidos No. 6,495,663; y Pamela B. Davis et al., *Fusion Proteins for Protein Delivery,* Patente de los Estados Unidos No. 6,287,817, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad.

[0131] Un agente de transferencia puede ser asimismo un agente que permita o intensifique la captación celular de un componente asociado no covalentemente, como FGFR2, FGFR3, SV2c, o SNAP-25. Métodos que funcionan en la ausencia de enlazamiento covalente y métodos de usar tales agentes se describen en, *por ej.*, Gilles Divita et al, *Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use,* Patente de los Estados Unidos No. 6,841,535; Philip L Feigner and Olivier Zelphati, *Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use,* Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2003/0008813; y Michael Karas, *Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids,* Publicación de Patente de los Estados Unidos 2004/0209797, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad. Tales agentes de transferencia de péptidos pueden prepararse y usarse por métodos estándar y se encuentran disponibles en el comercio, véase, *por ej.,* the CHARIOT™ Reagent (Active Motif, Carlsbad, CA); BIO-PORTER® Reagent (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA), BIO TREK™ Protein Delivery Reagent (Stratagene, La Jolla, CA), y PRO-JECT™ Protein Transfection Reagent (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

[0132] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, una muestra que incluye una BoNT/A. Tal como se emplea en esta especificación, el término "muestra que incluye una BoNT/A" se refiere a cualquier materia biológica que contiene o potencialmente contiene una BoNT/A activa. Una variedad de muestras pueden analizarse de acuerdo con un método divulgado en la presente especificación incluyendo, sin limitación, BoNT/A purificada, parcialmente purificada, o no purificada; una toxina recombinante de cadena única o doble cadena con una secuencia de ocurrencia natural o no natural; BoNT/A recombinante con una especificidad de proteasa modificada; BoNT/A recombinante con una especificidad celular alterada; BoNT/A no procesada; un producto BoNT/A formulado, incluyendo, *por ej.*, BOTOX®, DYSPORT®/RELOXIN®, XEOMIN®, PURTOX®, NEURONOX®, BTX-A y células; o lisados de células crudos, fraccionados o parcialmente purificados de, *por ej.*, fuentes de bacterias, levadura, insecto, o mamíferos; sangre, plasma o suero; alimentos crudos, parcialmente cocidos, cocidos, o procesados; bebidas; comida para animales; muestras de suelo; muestras de agua; sedimentos de estanques; lociones; cosméticos; y formulaciones clínicas. Se entiende que el término muestra abarca muestras de tejido, incluyendo, sin limitación, muestras de tejido de

mamífero, muestras de tejido de ganado tales como ovejas, muestras de tejido de vaca y cerdo; muestras de tejido de primate; y muestras de tejido humano. Tales muestras abarcan, sin limitación, muestras intestinales tales como muestras intestinales de un bebé, y muestras de tejido obtenidas de una herida. Como ejemplos no limitantes, un método de detectar cantidades picomolares de actividad BoNT/A puede ser útil para determinar la presencia o actividad de una BoNT/A en una muestra de alimento o bebida; analizar una muestra de un humano o animal, por ejemplo, expuesto a una BoNT/A o que tiene uno o más síntomas de botulismo; seguir la actividad durante la producción y purificación de BoNT/A no procesada; analizar un producto BoNT/A formulado utilizado en aplicaciones farmacéuticas o cosméticas; o analizar suero sanguíneo de un sujeto en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes.

[0133] Por consiguiente, en una incorporación, una muestra que contiene una BoNT/A es una muestra que contiene cualquier cantidad de una BoNT/A. En aspectos de esta incorporación, una muestra que contiene una BoNT/A comprende alrededor de 100 ng o menos, alrededor de 10 ng o menos, alrededor de 1 ng o menos, alrededor de 100 pg o menos, alrededor de 10 pg o menos, o alrededor de 1 pg o menos de una BoNT/A. En otros aspectos de esta incorporación, una muestra que contiene una BoNT/A comprende alrededor de 1 μM o menos, alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos, alrededor de 1 nM o menos, alrededor de 100 pM o menos, alrededor de 10 pM o menos, alrededor de 1 pM o menos, alrededor de 100 fM o menos, alrededor de 10 fM o menos, o alrededor de 1 fM o menos de una BoNT/A.

[0134] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, aislar de la célula tratada un componente SNAP-25 que incluye una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. Tal como se emplea en esta especificación, el término "componente SNAP-25 que incluye una SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A" se refiere a un componente celular que contiene el producto de escisión SNAP-25. Se contempla que cualquier método apropiado para enriquecer o aislar un componente SNAP-25 puede ser útil, incluyendo, sin limitación, protocolos para lisar células, protocolos de purificación en columna de centrifugado (***"spin-column purification protocols"***),

inmunoprecipitación, purificación de afinidad, y cromatografía de proteínas.

[0135] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, un anticuerpo α-SNAP-25 fijado a un soporte de fase sólida. Tal como se emplea en esta especificación, el término "soporte de fase sólida" es sinónimo con "fase sólida" y se refiere a cualquier matriz que pueda usarse para inmovilizar un anticuerpo α-SNAP-25 divulgado en la presente especificación. Ejemplos no limitantes de soportes de fase sólida incluyen, *por ej.*, un tubo; una placa; una columna; alfileres o "tiras reactivas"; una partícula magnética, una microesfera u otros medios cromatográficos esféricos o fibrosos, tales como, *por ej.*, agarosa, sefarosa, sílice y plástico; y láminas o membranas, tales como, *por ej.*, nitrocelulosa y fluoruro de polivinilideno (PVDF – *polyvinylidene fluoride*). El soporte de fase sólida puede construirse usando una amplia variedad de materiales tales como, *por ej.*, vidrio, carbón, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, diazocelulosa, o almidón. El soporte de fase sólida seleccionado puede tener una propiedad física que lo haga fácilmente separable del material soluble o no ligado y, generalmente, permite que materiales no ligados, tales como, *por ej.*, exceso de reactivos, subproductos de reacción, o solventes, se separen o se extraigan de otro modo (por, *por ej.*, lavado, filtración, centrifugación, etc.) de un componente de análisis ligado a soporte de fase sólida. Ejemplos no limitantes de cómo hacer y utilizar soportes de fase sólida se describen en, *por ej.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, *supra,* (2001); y Current Protocols in Molecular Biology, *supra,* (2004), cada uno de los cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad.

[0136] Aspectos de la presente divulgación comprenden, en parte, detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, y un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. Se contempla que cualquier sistema de detección puede usarse para poner en práctica aspectos de este método divulgado, basado en inmunología, con la condición de que la relación señal/ruido pueda distinguir en un grado estadísticamente significativo la señal del complejo anticuerpo-antígeno de la señal de fondo. Ejemplos no limitantes de sistemas de

92

detección basados en inmunología incluyen análisis immunoblot, como análisis Western blotting y dot-blotting, inmunoprecipitación, análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y ELISA sándwich. La detección de la señal puede lograrse empleando autorradiografía con creación de imágenes o la creación de imágenes para detectar radioactividad usando compuestos de fósforo (***"phosphorimaging"***) (AU), quimioluminiscencia (CL), electroquimioluminiscencia (ECL), bioluminiscencia (BL), fluorescencia, transferencia de energía de resonancia, polarización en plano, citometría colorimétrica, o citometría de flujo (FC). Descripciones de sistemas de detección de fase immune se divulgan en, *por ej.*, Michael M.Rauhut, Chemiluminescence, In Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3rd ed., John Wiley and Sons, 1985); A. W. Knight, *A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenerated Chemiluminescence,* Trends Anal. Chem. 18(1): 47-62 (1999); K. A. Fahnrich, et al., *Recent Applications of Electrogenerated Chemiluminescence in Chemical Analysis,* Talanta 54(4): 531-559 (2001); *Commonly Used Techniques in Molecular Cloning,* páginas A8.1-A8-55 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001); *Detection Systems,* páginas A9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001); Electrogenerated Chemiluminescence, (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004), cada uno de los cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad.

[0137] Un ELISA sándwich (o inmunoanálisis sándwich) es un método basado en dos anticuerpos, que se unen a dos diferentes epítopos en el antígeno. Un anticuerpo de captura, que tiene una elevada especificidad de unión para el antígeno de interés, se adhiere a una superficie sólida. A continuación se agrega el antígeno, seguido por la adición de un segundo anticuerpo designado como el anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección une el antígeno a un epítopo diferente del anticuerpo de captura. Por lo tanto, el antígeno queda 'emparedado' entre los dos anticuerpos. La afinidad de unión del anticuerpo para el antígeno es usualmente el principal determinante de la sensibilidad del inmunoanálisis. A medida que la concentración del antígeno aumenta, se incrementa la cantidad del anticuerpo de detección llevando a una respuesta medida más alta. Para cuantificar el grado de unión pueden emplearse diferentes sistemas indicadores, tales como, *por ej.*, una enzima unida al anticuerpo secundario y un sustrato

indicador en donde la reacción enzimática forma una lectura como la señal de detección. La señal generada es proporcional a la cantidad de antígeno diana presente en la muestra. El sustrato indicador usado para medir el acontecimiento de unión determina el modo de detección. Un lector de placas espectrofotométrico se emplea en la detección colorimétrica. Se han desarrollado sustratos quimioluminiscentes y electroquimioluminescentes, los cuales amplían aún más la señal y pueden leerse en un lector luminiscente. Por lo tanto, el indicador puede ser una lectura fluorescente en donde el paso enzimático del análisis se reemplaza con un fluoróforo y la lectura se mide entonces usando un lector fluorescente. Reactivos y protocolos necesarios para realizar un ELISA sándwich ECL se encuentran disponibles en el comercio, incluyendo, sin excepción, la plataforma de detección MSD sandwich ELISA-ECL (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

[0138] Por consiguiente, en una incorporación, detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α-SNAP-25, que selectivamente se une a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, y un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, puede llevarse a cabo un análisis immuno-blot, un análisis de inmunoprecipitación, un ELISA, o un ELISA sándwich. En aspectos de esta incorporación, la detección se efectúa usando una análisis immuno-blot AU, CL, ECL, o BL, un análisis de inmunoprecipitación AU, CL, ECL, BL, o FC, un ELISA AU, CL, ECL, BL, o FC, o un análisis ELISA sándwich AU, CL, ECL, BL, o FC.

[0139] Aspectos de la presente divulgación pueden llevarse a la práctica en una forma *singleplex* o *multiplex*. Un método basado en inmunología de detectar actividad BoNT/A puesto en práctica en una forma *singleplex* es una que únicamente detecta la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α-SNAP-25 y un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. Un método basado en inmunología de detectar actividad BoNT/A puesto en práctica en una forma *multiplex* es uno que concurrentemente detecta la presencia de dos o más complejos anticuerpo-antígeno; uno de los cuales es el

complejo anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α-SNAP-25 y un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; y el otro(s) de los cuales es el complejo anticuerpo-antígeno contra una segunda, tercera, cuarta, etc., proteína diferente. Puede utilizarse una segunda proteína, *por ej.*, como un control interno para minimizar la variabilidad muestra a muestra, normalizando la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno α-SNAP-25/SNAP-25, detectado con respecto a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado por la segunda proteína. Como tal, la segunda proteína es usualmente una que se expresa consistentemente por la célula, tal como una proteína de mantenimiento (***"a house-keeping protein"***). Ejemplos no limitantes de una segunda proteína útil, incluyen, *por ej.*, una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), sintaxina, citoquinas. Métodos de llevar a cabo en una forma *multiplex* un análisis basado en inmunología se describen en, *por ej.*, U. B. Nielsen and B. H. Geierstanger, *Multiplexed Sandwich Assays in Microarray Format,* J. Immunol. Methods, 290(1-2): 107-120 2004); R. Barry and M, Soloviev, *Quantitative Protein Profiling using Antibody Arrays,* Proteomics, 4(12): 3717-3726 (2004); M. M. Ling et al., *Multiplexing Molecular Diagnostics and Immunoassays using Emerging Microarray Technologies,* Expert Rev Mol Diagn. 7(1): 87-98 (2007); S. X. Leng et al., *ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research,* J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63(8): 879-884 (2008), cada uno de los cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad.

[0140] Por consiguiente, en una incorporación, se pone en práctica en una forma *singleplex* un método basado en inmunología de detectar actividad BoNT/A, detectando únicamente la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno, que comprende un anticuerpo α-SNAP-25 y un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. En otra incorporación, se pone en práctica en una forma *multiplex* un método basado en inmunología de detectar actividad BoNT/A, detectando concurrentemente la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que comprende un anticuerpo α-SNAP-25 y un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A y por lo menos otro complejo anticuerpo-antígeno a una proteína distinta de SNAP-25, tal como, *por ej.*, GAPDH o sintaxina.

[0141] Aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, un método de determinar inmunorresistencia BoNT/A. Tal como se emplea en esta especificación, el término "inmunorresistencia BoNT/A" significa un mamífero que no responde completamente a una terapia BoNT/A, o muestra un efecto benéfico reducido de una terapia BoNT/A, porque la respuesta inmune de ese mamífero, directa o indirectamente, reduce la eficacia de la terapia. Un ejemplo no limitante de eficacia reducida sería la presencia en un mamífero de por lo menos un anticuerpo α-BoNT/A neutralizante que se une a una toxina BoNT/A en una manera que reduce o impide la especificidad o actividad de la toxina. Tal como se emplea en esta especificación, el término "terapia BoNT/A" significa un tratamiento, remedio, cura, cicatrización, rehabilitación o cualquier otro medio de contrarrestar algo indeseable en un mamífero, que requiere una neuromodulación usando una toxina BoNT/A o administrando a un mamífero una o más dosis controladas de una medicación, preparación o mezcla de una toxina BoNT/A, que tiene un efecto medicinal, terapéutico, curativo, cosmético, remedial o cualquier otro efecto benéfico. La terapia BoNT/A comprende, sin limitación, el uso de cualquier fragmento de la misma de ocurrencia natural o modificado, en cualquier formulación, combinado con cualquier transportador o ingrediente activo y administrado por cualquier vía de administración. Una terapia BoNT/A ejemplar bien conocida es una terapia BOTOX®.

[0142] Aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está examinando para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes. Tal como se emplea en esta especificación, el término "muestra de prueba" se refiere a cualquier materia biológica que contiene, o potencialmente contiene, por lo menos un anticuerpo α-BoNT/A. Un anticuerpo α-BoNT/A puede ser un anticuerpo anti-BoNT/A neutralizante o un anticuerpo anti-BoNT/A no neutralizante. Tal como se emplea en esta especificación, el término "anticuerpos anti-BoNT/A neutralizantes" significa cualquier anticuerpo α-BoNT/A que, bajo condiciones fisiológicas, se unirá a una región de una impedir a la toxina ejercer su efecto en una terapia BoNT/A. Tal como se emplea toxina BoNT/A en tal manera como para reducir o en esta especificación, el término "anticuerpos no neutralizantes de α-BoNT/A" significa cualquier anticuerpo α-BoNT/A que, bajo condiciones fisiológicas, se

unirá a una región de una toxina BoNT/A, pero no impedirá que la toxina ejerza su efecto en una terapia BoNT/A. Se contempla que cualquiera y todas las muestras, que puedan contener anticuerpos α-BoNT/A, puedan usarse en este método, incluyendo, sin limitación, sangre, plasma, suero y fluido linfático. Adicionalmente, cualquiera y todos los organismos capaces de generar anticuerpos α-BoNT/A contra una toxina BoNT/A pueden servir como fuente para una muestra incluyendo, pero no limitados a, pájaros y mamíferos, incluidos ratones, ratas, cabras, ovejas, caballos, asnos, vacas, primates y humanos. Ejemplos no limitantes de protocolos específicos para toma de muestras de sangre y preparación de suero se describen en, *por ej.*, Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, BLOOD COLLECTION IN HEALTHCARE (F.A. Davis Company, 2001); y Diana Garza & Kathleen Becan-McBride, PHLEBOTOMY HANDBOOK: BLOOD COLLECTION ESSENTIALS (Prentice Hall, 6th ed., 2002). Estos protocolos son procedimientos rutinarios perfectamente al alcance de una persona experta en el arte y de la enseñanza contenida en esta especificación. Una muestra de prueba puede obtenerse de un organismo antes de la exposición a una toxina BoNT/A, luego de un tratamiento BoNT/A único, luego de tratamientos múltiples con una toxina BoNT/A, antes de la iniciación de la resistencia a una terapia BoNT/A, o luego de la iniciación de la resistencia a una terapia BoNT/A.

[0143] Aspectos de la presente divulgación proporcionan, en parte, una muestra de control. Tal como se emplea en esta especificación, el término "muestra de control" significa cualquier muestra en la cual es conocida la presencia o ausencia de la muestra de prueba e incluye muestras de control negativo y positivo. Con respecto a anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes, una muestra de control negativa puede obtenerse de un individuo que nunca había estado expuesto a BoNT/A y pueden incluir, sin limitación, una muestra del mismo individuo que suministra la muestra de prueba, pero tomada antes de someterse a una terapia con BoNT/A; una muestra tomada de un individuo diferente que nunca había estado expuesto a BoNT/A; una muestra combinada tomada de una pluralidad de diferentes individuos que nunca habían sido expuestos a BoNT/A. Con respecto a anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes, una muestra de control positivo puede obtenerse de un individuo que manifiesta inmunorresistencia BoNT/A e incluye, sin limitación, un individuo que arroja positivo en análisis de experimentación basada en pacientes; un individuo que arroja positivo en un bioanálisis *in vivo*; y un

individuo que muestra hiperinmunidad, *por ej.*, un individuo vacunado con BoNT/A.

[0144] Se prevé además que anticuerpos α-BoNT/A pueden purificarse de una muestra. Anticuerpos anti-BoNT/A pueden purificarse de una muestra usando una variedad de procedimientos incluyendo, sin limitación, cromatografía de proteína A/G y cromatografía de afinidad. Ejemplos no limitantes de protocolos específicos para purificar anticuerpos de una muestra se describen en, *por ej.*, 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); y MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, *supra,* (2001), las cuales se incorporan por este medio por referencia. Adicionalmente, ejemplos no limitantes de métodos de purificación de anticuerpos, así como reactivos, condiciones y protocolos bien caracterizados se obtienen fácilmente de vendedores comerciales que incluyen, sin limitación, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; y Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA. Estos protocolos son procedimientos rutinarios perfectamente al alcance de un experto en el arte.

[0145] Por consiguiente, en una incorporación, una muestra incluye sangre. En un aspecto de esta incorporación, la muestra incluye sangre de ratón, sangre de rata, sangre de cabra, sangre de oveja, sangre de caballo, sangre de asno, sangre de vaca, sangre de primate o sangre humana. En otra incorporación, una muestra incluye plasma. En un aspecto de esta incorporación, una muestra de prueba incluye plasma de ratón, plasma de rata, plasma de cabra, plasma de oveja, plasma de caballo, plasma de asno, plasma de vaca, plasma de primate o plasma humano. En otra incorporación, una muestra incluye suero. En un aspecto de esta incorporación, la muestra incluye suero de ratón, suero de rata, suero de cabra, suero de oveja, suero de caballo, suero de asno, suero de vaca, suero de primate y suero humano. En otra incorporación, una muestra incluye fluido linfático. En un aspecto de esta incorporación, una muestra incluye fluido linfático de ratón, fluido linfático de rata, fluido linfático de cabra, fluido linfático de oveja, fluido linfático de caballo, fluido linfático de asno, fluido linfático de vaca, fluido linfático de primate o fluido linfático humano. En todavía otra incorporación, una muestra es una muestra de prueba. En todavía otra incorporación, una muestra es una muestra de

control. En aspectos de esta incorporación, una muestra de control es una muestra de control negativo o una muestra de control positivo.

[0146] Aspectos de la presente divulgación contemplan, en parte, comparar la cantidad de SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A detectado en paso (d) con la cantidad de SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A detectado en paso (e). En una incorporación, la cantidad de producto de escisión SNAP-25 en la muestra de prueba es mayor comparada con la cantidad de producto de escisión SNAP-25 en la muestra de control. En un aspecto de esta incorporación, una cantidad mayor de producto de escisión SNAP-25 en la muestra de prueba, comparada con una muestra de control positivo indica una reducción en, o falta de, inmunorresistencia BoNT/A en el mamífero. En otro aspecto de esta incorporación, una cantidad equivalente de producto de escisión SNAP-25 en la muestra de prueba, comparada con una muestra de control negativo, indica una reducción en, o falta de, inmunorresistencia BoNT/A en el mamífero. En otra incorporación, la cantidad de producto de escisión SNAP-25 en la muestra de prueba es menor, comparada con la cantidad de producto de escisión SNAP-25 en la muestra de control. En un aspecto de esta incorporación, una cantidad menor o equivalente de producto de escisión SNAP-25 en la muestra de prueba, comparada con una muestra de control positivo, indica un aumento en, o la presencia de, la inmunorresistencia BoNT/A en el mamífero. En otro aspecto de esta incorporación, una menor cantidad de producto de escisión SNAP-25 en la muestra de prueba, comparada con una muestra de control negativo, indica un aumento en, o la presencia de, la inmunorresistencia BoNT/A en el mamífero.

[0147] Se contempla que cualquiera y todas las condiciones de análisis apropiadas para detectar la presencia de un anticuerpo α-BoNT/A neutralizante en una muestra son útiles en los métodos divulgados en la presente especificación, tales como, *por ej.*, condiciones de análisis lineales y condiciones de análisis no lineales. En una incorporación, las condiciones de análisis son lineales. En un aspecto de esta incorporación, la cantidad de análisis de una BoNT/A es excesiva. En otro aspecto de esta incorporación, la cantidad de análisis de una BoNT/A es limitante de la velocidad. En otro aspecto de esta incorporación, la cantidad de

análisis de una muestra de prueba es limitante de la velocidad.

[0148] Aspectos de la presente divulgación pueden describirse igualmente en la siguiente forma:

1. Una composición que contiene un transportador conectado a un conector flexible enlazado a un antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A.

2. La composición de 1, en donde el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A es glutamina o lisina.

3. La composición de 1, en donde el antígeno SNAP-25 comprende SEQ ID NO: 147.

4. La composición de 1, en donde la secuencia de aminoácidos del conector flexible y el antígeno SNAP-25 es SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 46.

5. Un anticuerpo α-SNAP-25 aislado, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25.

6. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítopo que no contiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25 de menos de 1×10^1 M^{-1} s^{-1}; y en donde el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio para el epítopo de menos de 0.450 nM.

7. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, y SEQ ID NO: 82; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, y SEQ ID NO: 92.

100

8. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende por lo menos la CDR1 V_H de SEQ ID NO: 93, la CDR1 V_H de SEQ ID NO: 94, la CDR1 V_H de SEQ ID NO: 95, la CDR1 V_H de SEQ ID NO: 118, la CDR1 V_H de SEQ ID NO: 119, o la CDR1 V_H de SEQ ID NO: 120.

9. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende por lo menos la CDR2 V_H de SEQ ID NO: 96, la CDR2 V_H de SEQ ID NO: 97, la CDR2 V_H de SEQ ID NO: 98, la CDR2 V_H de SEQ ID NO: 99, la CDR2 V_H de SEQ ID NO: 121, la CDR2 V_H de SEQ ID NO: 122, o la CDR2 V_H de SEQ ID NO: 123.

10. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende por lo menos la CDR3 V_H de SEQ ID NO: 100, la CDR3 V_H de SEQ ID NO: 101, la CDR3 V_H de SEQ ID NO: 102, o la CDR3 V_H de SEQ ID NO: 124.

11. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende por lo menos la CDR1 V_L de SEQ ID NO: 103, la CDR1 V_L de SEQ ID NO: 104, la CDR1 V_L de SEQ ID NO: 105, la CDR1 V_L de SEQ ID NO: 106, la CDR1 V_L de SEQ ID NO: 107, la CDR1 V_L de SEQ ID NO: 125, la CDR1 V_L de SEQ ID NO: 126, la CDR1 V_L de SEQ ID NO: 127, la CDR1 V_L de SEQ ID NO: 128, o la CDR1 V_L de SEQ ID NO: 129.

12. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende por lo menos la CDR2 V_L de SEQ ID NO: 108, la CDR2 V_L de SEQ ID NO: 109, la CDR2 V_L de SEQ ID NO: 110, la CDR2 V_L de SEQ ID NO: 111, o la CDR2 V_L de SEQ ID NO: 112.

13. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado comprende por lo menos la CDR3 V_L de SEQ ID NO: 113, la CDR3 V_L de SEQ ID NO: 114, la CDR3 V_L de SEQ ID NO: 115, la CDR3 V_L de SEQ ID NO: 116, o la CDR3 V_L de SEQ ID NO: 117.

14. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado contiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 121 y SEQ ID NO: 100; y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110 y SEQ ID NO:

115.

15. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado une selectivamente el epítopo SNAP-25 de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, o SEQ ID NO: 148.

16. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado une selectivamente el epítopo SNAP-25 de SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, o SEQ ID NO: 44.

17. Un método de detectar la actividad BoNT/A, método que comprende los pasos de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que contiene BoNT/A, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A por una BoNT/A; b) aislar de la célula tratada un componente SNAP-25, que incluye un producto de escisión SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; c) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; en donde la detección por el complejo anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad BoNT/A.

18. Un método de detectar la actividad BoNT/A, método que comprende los pasos de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que contiene BoNT/A, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A por una BoNT/A; b) aislar de la célula tratada un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; c) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 fijado a un soporte de fase sólida, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; en donde la

detección por el complejo anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad BoNT/A.

19. Un método de detectar la actividad BoNT/A, método que comprende los pasos de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que contiene BoNT/A, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A por una BoNT/A; b) aislar de la célula tratada un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; c) fijar el componente SNAP-25 a un soporte de fase sólida; d) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; y e) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; en donde la detección por el complejo anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad BoNT/A.

20. Un método de detectar la actividad BoNT/A, método que comprende los pasos de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que contiene BoNT/A, en donde la célula de una línea celular establecida puede captar BoNT/A; b) aislar de la célula tratada un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; c) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; en donde la detección por el complejo anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad BoNT/A.

21. Un método de detectar la actividad BoNT/A, método que comprende los pasos de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que contiene BoNT/A, en donde la célula de una línea celular establecida puede captar BoNT/A; b) aislar de la célula tratada un componente SNAP-25 que

incluye un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; c) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 fijado a un soporte de fase sólida, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; y d) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; en donde la detección por el complejo anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad BoNT/A.

22. Un método de detectar la actividad BoNT/A, método que comprende los pasos de: a) tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que contiene BoNT/A, en donde la célula de una línea celular establecida puede captar BoNT/A; b) aislar de la célula tratada un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; c) fijar el componente SNAP-25 a un soporte de fase sólida; d) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; y e) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; en donde la detección por el complejo anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad BoNT/A.

23. Un método de determinar la inmunorresistencia BoNT/A en un mamífero, que comprende los pasos de: a) agregar una BoNT/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está examinando para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A; c) aislar de las células tratadas un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; d) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de

corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; f) repetir los pasos **b-e** con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una BoNT/A y un suero no conocido por contener anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; y g) comparar la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **e** con la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f**, en donde la detección de una cantidad menor de complejo anticuerpo-antígeno detectado en el paso **e** relativa a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f** es indicativa de la presencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes.

24. Un método de determinar la inmunorresistencia BoNT/A en un mamífero que comprende los pasos de: a) agregar una BoNT/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está examinando para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A; c) aislar de las células tratadas un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; d) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 fijado a un soporte de fase sólida, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; f) repetir los pasos **b-e** con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una BoNT/A y un suero no conocido por contener anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; y g) comparar la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **e** con la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f**, en donde la detección de una cantidad menor de complejo anticuerpo-antígeno detectado en el paso **e** relativa a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f** es indicativa de la presencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes.

25. Un método de determinar la inmunorresistencia BoNT/A en un mamífero que comprende los pasos de: a) agregar una BoNT/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está examinando para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A; c) aislar de las células tratadas un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; d) fijar el componente SNAP-25 a un soporte de fase sólida; e) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; f) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; g) repetir los pasos **b-f** con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una BoNT/A y un suero no conocido por contener anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; y h) comparar la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f** con la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **g**, en donde la detección de una cantidad menor de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f**, relativa a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **g**, es indicativa de la presencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes.

26. Un método de determinar la inmunorresistencia BoNT/A en un mamífero que comprende los pasos de: a) agregar una BoNT/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está examinando para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos de α-BoNT/A neutralizantes; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en donde la célula de una línea celular establecida puede captar BoNT/A; c) aislar de las células tratadas un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; d) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un

término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; f) repetir los pasos **b-e** con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una BoNT/A y un suero no conocido por contener anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; y g) comparar la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **e** con la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f**, en donde la detección de una cantidad menor de complejo anticuerpo-antígeno detectado en el paso **e**, relativa a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f**, es indicativa de la presencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes.

27. Un método de determinar la inmunorresistencia BoNT/A en un mamífero que comprende los pasos de: a) agregar una BoNT/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está examinando para detectar la presencia o ausencia anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en donde la célula de una línea celular establecida puede captar BoNT/A; c) aislar de las células tratadas un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; d) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 fijado a un soporte de fase sólida, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; e) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; f) repetir los pasos **b-e** con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una BoNT/A y un suero no conocido por contener anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; y g) comparar la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **e** con la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f**, en donde la detección de una cantidad menor de complejo anticuerpo-antígeno detectado en el paso **e**, relativa a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f** es indicativa de la presencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes.

28. Un método de determinar la inmunorresistencia BoNT/A en un mamífero que comprende los pasos de: a) agregar una BoNT/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está examinando para detectar la presencia o ausencia anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; b) tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en donde la célula de una línea celular establecida puede captar BoNT/A; c) aislar de las células tratadas un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A; d) fijar el componente SNAP-25 a un soporte de fase sólida; e) contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25; f) detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25; g) repetir los pasos **b-f** con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una BoNT/A y un suero no conocido por contener anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; y h) comparar la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f** con la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **g**, en donde la detección de una cantidad menor de complejo anticuerpo-antígeno detectado en el paso **f**, relativa a la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **g**, es indicativa de la presencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes.

29. El método de 17-22 y 23-25, en donde la célula es susceptible a intoxicación BoNT/A en alrededor de 500 pM o menos, en alrededor de 400 pM o menos, en alrededor de 300 pM o menos, en alrededor de 200 pM o menos, en alrededor de 100 pM o menos de una BoNT/A.

30. El método de 20-22 y 26-28, en donde la célula puede captar alrededor de 500 pM o menos, en alrededor de 400 pM o menos, en alrededor de 300 pM o menos, en alrededor de 200 pM o menos, en alrededor de 100 pM o menos de BoNT/A.

31. El método de 17-22, en donde la muestra comprende alrededor de 100 ng o

menos, alrededor de 10 ng o menos, alrededor de 1 ng o menos, 100 fg o menos, 10fg o menos, o 1 fg o menos de una BoNT/A

32. El método de 17-22, en donde la muestra comprende alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos, alrededor de 1 nM o menos, alrededor de 100 pM o menos, alrededor de 10 pM o menos, alrededor de 1 pM o menos, alrededor de 100 fM o menos, alrededor de 10 fM o menos, o alrededor de 1 fM o menos de una BoNT/A.

33. El método de 17-28, en donde el anticuerpo α-SNAP-25 es el anticuerpo α-SNAP-25 aislado de 5-16.

34. El método de 17-28, en donde la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno se detecta por un análisis immuno-blot, un análisis de inmunoprecipitación, un ELISA, o un ELISA sándwich.

35. El método de 17-28, en donde el método basado en inmunología tiene una relación señal/ruido para la asíntota inferior de por lo menos 3:1, por lo menos 5:1, por lo menos 10:1, por lo menos 20:1, por lo menos 50:1, o por lo menos 100:1.

36. El método de 17-28, en donde el método basado en inmunología tiene una relación señal/ruido para la asíntota superior de por lo menos 10:1, por lo menos 20:1, por lo menos 50:1, por lo menos 100:1, por lo menos 200:1, por lo menos 300:1, por lo menos 400:1, por lo menos 500:1, o por lo menos 600:1.

37. El método de 17-28, en donde el método basado en inmunología puede detectar la actividad EC_{50} de, *por ej.*, por lo menos 100 ng, por lo menos 50 ng, por lo menos 10 ng, por lo menos 5 ng, por lo menos 100 pg, por lo menos 50 pg, por lo menos 10 pg, por lo menos 5 pg, por lo menos 100 fg, por lo menos 50 fg, por lo menos 10 fg, o por lo menos 5 fg.

38. El método de 17-28, en donde el método basado en inmunología puede detectar la actividad EC_{50} de, *por ej.*, por lo menos 10 nM, por lo menos 5 nM, por lo menos 100 pM, por lo menos 50 pM, por lo menos 10 pM, por lo menos 5 pM, por lo menos 100 fM, por lo menos 50 fM, por lo menos 10 fM, por lo menos 5 fM, o por lo menos 1 fM.

39. El método de 17-28, en donde el método basado en inmunología tiene un LOD de, *por ej.*, 10 pg o menos, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una BoNT/A

40. El método de 17-28, en donde el método basado en inmunología tiene un LOD de, *por ej.*, 100 fM o menos, 90 fM o menos, 80 fM o menos, 70 fM o menos, 60 fM o menos, 50 fM o menos, 40 fM o menos, 30 fM o menos, 20 fM o menos, o 10 fM o menos de una BoNT/A.

41. El método de 17-28, en donde el método basado en inmunología tiene un LOQ de, *por ej.*, 10 pg o menos, 9 pg o menos, 8 pg o menos, 7 pg o menos, 6 pg o menos, 5 pg o menos, 4 pg o menos, 3 pg o menos, 2 pg o menos, 1 pg o menos de una BoNT/A

42. El método de 17-28, en donde el método basado en inmunología tiene un LOQ de, *por ej.*, 100 fM o menos, 90 fM o menos, 80 fM o menos, 70 fM o menos, 60 fM o menos, 50 fM o menos, 40 fM o menos, 30 fM o menos, 20 fM o menos, o 10 fM o menos de una BoNT/A.

43. El método de 17-28, en donde el método basado en inmunología puede distinguir una BoNT/A completamente activa de una BoNT/A parcialmente activa con 70% o menos, 60% o menos, 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, o 10% o menos de la actividad de una BoNT/A completamente activa.

EJEMPLOS

Ejemplo I

Detección Sistemática (*"Screening"*) de Líneas celulares Candidatas

[0149] El siguiente ejemplo ilustra cómo identificar líneas celulares establecidas, susceptibles a intoxicación BoNT/A, o que tienen capacidad de captación BoNT/A requerida por un método de detectar actividad BoNT/A, divulgado en la presente especificación.

1. Crecimiento en cultivo madre de líneas celulares candidatas.

[0150] Para cultivar las líneas celulares, una densidad apropiada de células de la línea celular, que se está analizando, se sembraron en un matraz de cultivo de tejido de 162 cm^2 que contenía 30 mL de un medio de cultivo apropiado (véase Tabla 1), y se cultivaron en un incubador a 37°C bajo 5% o 10% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaron la densidad deseada.

Tabla 1. Medios Usados en la Detección Sistemática de Líneas celulares.

Línea celular	Composición de los Medio de Cultivo Suero
Kelly SiMa	RPMI 1640, 10% suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomicina, 2 mM L-glutamina
NB69	RPMI 1640, 15% suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomicina
CHP-126	RPMI 1640, 20% suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomicina
N4TG3	RPMI 1640, 10% suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomicina, 100 µM 6-tioguanina
MHH-NB-11	RPMI 1640, 10% suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 0.1 mM aminoácidos no esenciales
PC12	RPMI 1640, 5% suero bovino fetal inactivado por calor, 10% suero equino, 2 mM GlutaMAX™, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 1% penicilina-estreptomicina
N18TG2	DMEM (11885-084, Gibco), 10% suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomicina, 100 µM 6-tioguanina
N1E-115 N18 ND8/34 NG108-15 NG115-401L NS20Y SK-N-SH	90 % DMEM, 10% suero bovino fetal inactivado por calor, 2 mM glutamina, 2 mM glucosa
SK-N-DZ SK-N-F1	90% DMEM, 10% suero bovino fetal inactivado por calor, 4 mM glutamina, 4 mM glucosa, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 1.5 g/L $NaHCO_3$
BE(2)-C BE(2)-M17 CHP-212 LA-1-55n LA-N-1 MC-1XC SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM(11090-081, Gibco), Ham's F12 (11765-054, Gibco), 10% suero bovino fetal inactivado por calor, 2 mM glutamina, 0.1 mM aminoácidos no esenciales,
NB4 1A3	Ham's F10 (12471-017, Gibco), 2.5% suero bovino fetal inactivado por calor, 15% suero equino inactivado por calor, 2 mM glutamina
Neuro-2a	EMEM, 10% suero bovino fetal inactivado por calor, 2 mM glutamina, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 1.5 g/L $NaHCO_3$, 1 mM piruvato de sodio

2. *Detección sistemática con dosis única de líneas celulares candidatas usando 1 nM BoNT/A.*

[0151] Un parámetro examinado para mejorar la sensibilidad de un análisis basado en células fue identificar líneas celulares adecuadas que exhibieron una excelente capacidad de captar una neurotoxina clostridial y adherirse a una superficie de un sustrato. Inicialmente, líneas celulares se examinaron en cuanto a su capacidad de captar 1 nM BoNT/A y su capacidad de unirse a una superficie. Para determinar si una línea celular fue capaz de captar 1 nM BoNT/A, una densidad apropiada de células de un cultivo madre de la línea celular, que se estaba analizando, se sembraron en los pozos de placas de cultivo de tejido de 24 pozos que contenían 1 mL de un medio de cultivo de suero apropiado (Tabla 1). Las células se cultivaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaron la densidad deseada (aproximadamente 18 a 24 horas). El medio de cultivo se aspiró de cada pozo y se reemplazó con 1) medio de cultivo fresco que no contenía toxina (línea celular no tratada) o 2) medio de cultivo fresco que contenía 1 nM de un complejo BoNT/A (línea celular tratada). Luego de una incubación de un día para otro, las células se lavaron aspirando el medio de cultivo y enjuagando cada pozo con 200 µl de 1 x PBS. Para recolectar las células, se aspiró la 1 x PBS, se lisaron las células agregando 50 µl de 2 x SDS solución amortiguadora de carga, el lisado se transfirió a un tubo de ensayo limpio y la muestra se calentó a 95°C durante 5 minutos.

[0152] Para detectar la presencia de sustrato SNAP-25 no escindido y productos SNAP-25 escindidos, se analizó por Westen blot una alícuota de cada muestra recolectada. En este análisis, una alícuota de 12 µl de la muestra recolectada se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida MOPS usando geles de poliacrilamida prefabricados NuPAGE® Novex 12% Bis-Tris (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) bajo condiciones reductoras desnaturalizantes. Se transfirieron péptidos separados del gel a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) por Western blotting usando un Trans-Blot® SD semi-dry electrophoretic transfer cell apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las membranas PVDF se bloquearon incubando a temperatura ambiente durante 2 horas en una solución que contenía solución salina amortiguada con Tris (TBS - *Tris-Buffered Saline*) (25 mM de ácido 2-amino-2-hidroximetil-1,3-

propanodiol clorhídrico (Tris-HCl)(pH 7.4), 137 mM de cloruro de sodio, 2.7 mM de cloruro de potasio), 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato), 2% de albúmina sérica bovina (BSA - *Bovine Serum Albumin*), 5% de leche en polvo descremada. Membranas bloqueadas se incubaron a 4°C de un día para otro en TBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato), 2% BSA, y 5% de leche en polvo descremada que contenía 1) una dilución 1:5.000 de un anticuerpo monoclonal de ratón α-SNAP-25 como el anticuerpo primario (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD); 2) una dilución 1:5.000 de antisuero policlonal de conejo α-SNAP-25 S9684 como el anticuerpo primario (Sigma, St. Louis, MO). Los dos anticuerpos monoclonal de ratón y policlonal de conejo α-SNAP-25 pueden detectar tanto el sustrato SNAP-25 no escindido y el producto de escisión SNAP-25, permitiendo la evaluación de la expresión SNAP-25 general en cada línea celular y el porcentaje de SNAP-25 escindida luego del tratamiento BoNT/A como un parámetro para evaluar la cantidad de captación [absorción] de BoNT/A. Los blots sondeados con el anticuerpo primario se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en TBS, TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Las membranas lavadas se incubaron a temperatura de la sala durante 2 horas en TBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato), 2% BSA y 5% leche en polvo descremada que contenía 1) una dilución 1:10.000 de inmunoglobulina G anti-ratón policlonal en cabra, anticuerpo de cadenas pesada y ligera (IgG, H+L) conjugado a peroxidasa de rábano (Zymed, South San Francisco, CA) como anticuerpo secundario; 2) una dilución 1:10.000 de inmunoglobulina G anti-conejo policlonal en cabra, anticuerpo de cadenas pesada y ligera (IgG, H+L) conjugado a peroxidasa de rábano (Zymed, South San Francisco, CA) como anticuerpo secundario. Los blots sondeados con el anticuerpo secundario se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en TBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). La detección de señal de productos SNAP-25 marcados se visualizaron usando el Sistema de Detección Western Blot ECL Plus™ (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), y la membrana se procesó gráficamente, y se cuantificó el porcentaje de producto escindido con un Typhoon 9410 Variable Mode Imager e Imager Analysis software (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La selección del tamaño de pixel (100 a 200 pixeles) y los valores de voltaje PMT (350 a 600, normalmente 400) dependió del blot individual. Tabla 2 indica las líneas celulares donde se detectó un producto de la escisión SNAP-25 cuando se

trató con 1 nM BoNT/A. Las siguientes líneas celulares exhibieron ambas una captación de 1 nM BoNT/A y la fijación apropiada a la superficie de un sustrato: BE(2)-M17, IMR-32, Kelly, LA1-55n, N1E-115, N4TG3, N18, Neuro-2a, NG108-15, PC12, SH-SY5Y, SiMa y SK-N-BE(2)-C.

[0153] Para determinar si una línea celular era capaz de fijarse a una superficie, una densidad apropiada de células de un cultivo madre de la línea celular, que se estaba analizando, se sembraron en los pozos de placas de cultivo de tejido de 24 pozos que contenían 1 mL de un medio de cultivo apropiado (Tabla 1). Las células se cultivaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaron la densidad deseada (aproximadamente 18 a 24 horas). La fijación celular se evaluó por el porcentaje de células que se adhirieron a la superficie del fondo del pozo de la placa de tejido, relativo al número total de células sembradas. Las líneas celulares CHP-126, IMR-32, LA-N-1, MC-IXC, NG115-401L, SK-N-BE(2)-C, SK-N-F1 y SK-N-MC se consideraron inapropiadas porque cada línea celular exhibió menos de 50% de fijación (Tabla 2). Todas las demás líneas celulares analizadas exhibieron características apropiadas de fijación de células (Tabla 2).

Tabla 2. Detección Sistemática con Dosis Única de Líneas celulares Candidatas Usando 1 nM BoNT/A.

Línea celular	Descripción	Fuente	Captación 1 nM BoNT/A	Fijación
BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2268	No	>60%
BE(2)-M17	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2267	Sí	>60%
CHP-126	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 304	No	<50%
CHP-212	Neuroblastoma humano	ATCCCRL-2273	No	>60%
HCN-1a	Neurona cortical del cerebro	ATCC CRL-10442	No	>60%
HCN-2	Neurona cortical del cerebro	ATCC CRL-10742	No	>60%
IMR-32	Neuroblastoma humano	ATCCCRL-127	Sí	<50%
Kelly	Neuroblastoma humano	ECACC 92110411	Sí	>60%
Kelly	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 355	Sí	>60%
LA1-55n	Neuroblastoma humano	ECACC 06041203	Sí	>60%
LA-N-1	Neuroblastoma humano	ECACC 06041201	—	<25%
MC-IXC	Neuroepitelioma humano	ATCC CRL-2270	—	<25%
MHH-NB-11	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 157	No	>60%
N1E-115	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-2263	Sí	>60%

N4TG3	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 101	No	>60%
N18TG2	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 103	No	>60%
NB4 1A3	Neuroblastoma de ratón	ECACC 89121405	No	>60%
ND3	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG primario de rata neonatal	ECACC 92090901	No	>60%
ND7/23	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG primario de rata	ECACC 92090903	No	>60%
ND8	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG primario de rata neonatal	**ATCC**	No	>60%
ND8/34	Neuroblastoma de ratón	ECACC 92090904	No	>60%
ND15	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG primario de rata neonatal	ECACC 92090907	No	>60%
ND27	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG primario de rata	ECACC 92090912	No	>60%
NB69	Neuroblastoma humano	ECACC 99072802	No	>60%
NDC	Neuroblastoma de ratón/híbrido DRG primario de rata neonatal	ECACC 92090913	No	>60%
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	Sí	>60%
NG108-15	Neuroblastoma de ratón/híbrido de glioma de rata	ECACC 88112302	Sí	>60%
NG115-401L	Neuroblastoma de ratón/híbrido de glioma de rata	ECACC 87032003	No	<50%
NS20Y	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 94	No	>60%
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	Sí	>60%
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	Sí	>60%
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	Sí	>60%
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2271	Sí	<50%
SK-N-AS	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2137	No	>60%
SK-N-DZ	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2149	No	>60%
SK-N-F1	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2142	No	<50%
SK-N-MC	Neuroblastoma humano	ATCC HTB-10	—	<25%
SK-N-SH	Neuroblastoma humano	ECACC 86012802	No	>60%
TE189.T	Médula espinal	ATCC CRL-7947	No	>60%

Ejemplo II

Evaluación de las Condiciones de Cultivo en la Captación de Neurotoxina en Líneas Celulares Candidatas

[0154] El siguiente ejemplo ilustra cómo determinar las condiciones de cultivo para líneas celulares establecidas, que maximizan la intoxicación susceptible a BoNT/A o tienen capacidad de captación BoNT/A.

1. Efectos de la diferenciación celular en la captación de neurotoxina de líneas celulares candidatas.

[0155] Para determinar si la diferenciación celular mejoraba la captación de neurotoxina, líneas celulares que exhibían captación de 1 nM BoNT/A se transfirieron a medio libre de suero para inducir la diferenciación. Una densidad apropiada de células de un cultivo madre de la línea celular, que se estaba analizando, se sembraron en los pozos de placas de cultivo de tejido de 24 pozos que contenían 1 mL de un medio libre de suero que incluía Minimum Essential Medium con 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Estas células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos estándar y rutinarios, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 2 a 3 días). Como control, una densidad apropiada de células de un cultivo madre de la línea celular, que se estaba analizando, se sembraron en los pozos de placas de cultivo de tejido de 24 pozos que contenían 1 mL de un medio de cultivo apropiado (Tabla 1). Estas células de control no diferenciadas se cultivaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaron la densidad deseada (aproximadamente 18 a 24 horas). Se aspiró de cada pozo el medio de los dos cultivos de control diferenciados y no diferenciados y se reemplazó con medio fresco que contenía 0 (muestra no tratada), 0.1 nM, 0.3 nM, o 1 nM de un complejo BoNT/A. Luego de la incubación de un día para otro, las células se lavaron y se recolectaron como se describe en Ejemplo I.

[0156] Para detectar la presencia de productos SNAP-25 escindidos, se analizó por Western blot una alícuota de cada muestra recolectada, como se describe en Ejemplo I, excepto que las muestras recolectadas se separan por SDS-PAGE usando 12% 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), y el suero anticuerpo α-SNAP-25_{197} policlonal de conejo se usó como el anticuerpo primario (véase Ejemplo IV). Tabla 3 indica las líneas celulares que exhibieron un producto de la escisión SNAP-25 cuando se trataron con 0.1 nM BoNT/A. De las líneas celulares analizadas, únicamente las líneas celulares SiMa y Neuro-2a exhibieron una captación de 0.1 nM BoNT/A en el estado no diferenciado. No obstante, aparte de las líneas celulares SiMa y Neuro-2a, las líneas celulares N18, LA1-55n, PC12 y SH-SY5Y todas exhibieron una captación de 0.1 nM BoNT/A en el estado diferenciado.

Tabla 3. Efectos de la Diferenciación Celular en la Captación de Neurotoxina de Líneas celulares Candidatas

Línea celular	Descripción	Fuente	Captación de 0.1 nMBoNT/A	
			No Diferen-ciada	Diferen-ciada
BE(2)-M17	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2267	No	No
Kelly	Neuroblastoma humano	DSMZACC355	No	No
LA1-55n	Neuroblastoma humano	ECACC 06041203	No	Sí
N1E-115	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-2263	No	No analizada
N4TG3	Neuroblastoma de ratón	DSMZACC 101	No	No analizada
N18	Neuroblastoma de ratón/híbrido de glioma de rata	ECACC 88112301	No	Sí
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	Sí	Sí
NG108-15	Neuroblastoma de ratón/híbrido de glioma de rata	ECACC 88112302	No	No analizada
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	No	Sí
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	No	Sí
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZACC 164	Sí	Sí
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2271	No	No analizada

117

2. Efectos del tratamiento con ganglíosido en la captación de neurotoxina de líneas celulares candidatas diferenciadas.

[0157] Para determinar si tratamientos que mejoran la unión de baja afinidad de neurotoxina podían mejorar la captación de neurotoxina, líneas celulares diferenciadas, que exhibían captación de 1 nM BoNT/A, se trataron con ganglíosido GT1b. Una densidad apropiada de células de un cultivo madre de la línea celular, que se estaba analizando, se sembraron en los pozos de placas de cultivo de tejido de 24 pozos que contenían medio libre de suero, como se describe anteriormente, con o sin 25 µg/mL GT1b (Alexis Biochemicals, San Diego, CA). Estas células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos estándar y rutinarios, como se describe anteriormente. Se aspiró el medio de cada pozo y se reemplazó con medio libre de suero que contenía 0 (muestra no tratada), 1.9 pM, 3.7 pM, 7.4 pM, 14.8 pM, 29.7 pM, 59.4 pM, 118.8 pM, 237.5 pM, 574 pM, 950 pM y 1900 pM de un complejo BoNT/A. Las líneas celulares se incubaron en dos tiempos diferentes, 24 horas y 48 horas. Luego de la incubación de la toxina, las células se lavaron y se recolectaron como se describe en el Ejemplo I.

[0158] Para detectar la presencia de productos SNAP-25 escindidos, se analizó por Western blot una alícuota de cada muestra recolectada, como se describe en Ejemplo I, excepto que las muestras recolectadas se separaron por SDS-PAGE usando 12% 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), y el suero anticuerpo policlonal α-SNAP-25_{197} de conejo se usó como el anticuerpo primario (véase Ejemplo IV). Tabla 4 indica los efectos del tratamiento con gangliósidos sobre la capacidad de líneas celulares diferenciadas de captar BoNT/A. Estos resultados indican la concentración mínima de BoNT/A que producirá una banda detectable de producto de escisión SNAP-25 en el Western blot.

Tabla 4. Efectos del Tratamiento con Gangliósidos en la Captación de Neurotoxina de Líneas celulares Candidatas

Línea celular	Descripción	Fuente	Captación de BoNT/A	
			24 Horas Incubación	48 Horas Incubación
BE(2)-M17	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2267	237.5 pM	118.8 pM

118

Kelly	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 355	No analizada	No analizada
LA1-55n	Neuroblastoma humano	ECACC 06041203	15 pM	7.4 pM
N1E-115	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-2263	No analizada	No analizada
N4TG3	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 101	No analizada	No analizada
N18	Neuroblastoma de ratón/híbrido de glioma de rata	ECACC 88112301	14.8 pM	7.4 pM
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCCCCL-131	7.4 pM	7.4 pM
NG108-15	Neuroblastoma de ratón/híbrido de glioma de rata	ECACC 88112302	No analizada	No analizada
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	7.4 pM	7.4 pM
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	No analizada	No analizada
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	1.9 pM	1.9pM
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2271	No analizada	No analizada

3. ***Desarrollo de medio libre de suero con propiedades de diferenciación celular que mejoraron la captación de neurotoxina de líneas celulares candidatas.***

[0159] Para determinar si mejoras del tratamiento que inducen diferenciación celular podían mejorar la captación de neurotoxina, líneas celulares SiMa, Neuro-2a y PC12 se cultivaron en varios medios libres de suero para inducir la diferenciación. Una densidad apropiada de células de un cultivo madre de la línea celular, que se estaba analizando, se sembraron en los pozos de placas de cultivo de tejido de 24 pozos que contenían 1 mL de varios medios de prueba libres de suero. Los parámetros analizados fueron 1) el efecto de medio basal diferente sobre la captación de BoNT/A (MEM y RPMI 1649); 2) el efecto de la presencia o ausencia de factores neurotróficos sobre la captación de BoNT/A (suplemento N2 y suplemento B27); 3) el efecto de la presencia o ausencia de factores de diferenciación sobre la captación de BoNT/A (ácido retinoico y factor de crecimiento nervioso); y 4) el efecto de la presencia o ausencia de suero sobre la captación de BoNT/A (medio libre de suero y medio con suero reducido). Como control, una densidad apropiada de células de un cultivo madre de la línea celular, que se estaba analizando, se sembraron en los pozos de placas de cultivo de

tejido de 24 pozos que contenían 1 mL de un medio libre de suero de control (Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 100 unidades/mL penicilina, y 100 µg/mL estreptomicina). Estas células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos estándar y rutinarios, tales como detención del crecimiento y la extensión de neuritas (aproximadamente 2 a 3 días). Se aspiró el medio de cada pozo y se reemplazó con medio fresco libre de suero que contenía 0 (muestra no tratada), 0.005 pM, 0.015 pM, 0.05 pM, 0.14 pM, 0.42 pM, 1.2 pM, 3.7 pM, 11 pM, 33 pM, 100 pM y 300 pM de un complejo BoNT/A. Además, las células diferenciadas se trataron con BoNT/A durante 24 horas, seguidas por un cambio de medio e incubación de 48 horas en medio fresco sin toxina para permitir la acumulación de producto de escisión SNAP-25. Las células se lavaron entonces y se recolectaron como se describe en el Ejemplo I.

Tabla 5. Medio Libre de Suero Utilizado para Líneas celulares Diferenciadoras.

Línea celular	Composición del Medio Libre de Suero de Prueba
LA1-55n	Minimum Essential Medium con 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES, 1x suplemento N2, y 1 x suplemento B27
Neuro-2a	Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, 0.1 mM ácidos no esenciales, 10 mM HEPES
PC12	RPMI 1640, 2 mM GlutaMAX™, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 1% penicilina-estreptomicina y 50 ng/mL factor de crecimiento nervioso
SiMa	Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES

[0160] Para detectar la presencia de un producto de escisión SNAP-25, se analizó por Western blot una alícuota de cada muestra recolectada, como se describe en Ejemplo I, excepto que las muestras recolectadas se separaron por SDS-PAGE usando 12 % 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), y se usó un suero anticuerpo policlonal de conejo α-SNAP-25 (véase Ejemplo IV). El medio más optimizado determinado para cada línea celular se muestra en Tabla 5. Tabla

6 indica la cantidad mínima de un producto de escisión SNAP-25 detectado cuando las líneas celulares se cultivaron en este medio libre de suero optimizado. El uso del medio libre de suero optimizado resultó en la detección de señales de actividad BoNT/A con relaciones señal/ruido aceptables en líneas celulares LA1-55n, Neuro-2a, PC-12 y SiMa (FIG. 2). Por ejemplo, condiciones de diferenciación optimizadas resultaron en un aumento de 5 veces en la detección de producto de escisión SNAP-25, comparada con el medio libre de suero del control para células Neuro-2a y PC12, y casi de 50 veces para las células SiMa. Además, una relación señal/ruido mínima de 3:1 para la asíntota inferior y 10:1 para la asíntota superior se requiere para desarrollar un análisis robusto adaptable para validación. Con la excepción de LA-1-55n, todas las líneas celulares optimizadas proporcionaron una relación señal/ruido para la asíntota inferior de por lo menos 3:1 cuando la señal detectada de la dosis de 1.2 pM se comparó con la señal de fondo de 0 pM BoNT/A (FIG. 2). Además, todas las líneas celulares optimizadas proporcionaron una relación señal/ruido para la asíntota superior de por lo menos 100:1 cuando la señal de la dosis de 300 pM se comparó con la señal de fondo de 0 pM BoNT/A (FIG. 2). Estos resultados indican que cualquiera de estas líneas celulares podría utilizarse para desarrollar un método basado en inmunología para detectar actividad BoNT/A, como se divulga en la presente especificación, porque el análisis estaba detectando la presencia de cantidades pM de BoNT/A.

Tabla 6. Efectos de Medios Libres de Suero Optimizados sobre la Captación de Neurotoxina de Líneas celulares Candidatas

Línea celular	Descripción	Fuente	Captación de BoNT/A	
			Medio Libre de Suero de Control	Medio Libre de Suero Optimizado
BE(2)-M17	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2267	No analizada	No analizada
Kelly	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC355	No analizada	No analizada
LA1-55n	Neuroblastoma humano	ECACC 06041203	7.4 pM	3.7 pM
N1E-115	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-2263	No analizada	No analizada
N4TG3	Neuroblastoma de ratón	DSMZ ACC 101	No analizada	No analizada
N18	Neuroblastoma de ratón/híbrido de glioma de rata	ECACC 88112301	No analizada	No analizada
Neuro-2a	Neuroblastoma de ratón	ATCC CCL-131	3.7 pM	0,8 pM

NG108-15	Neuroblastoma de ratón/híbrido de glioma de rata	ECACC 88112302	No analizada	No analizada
PC12	Feocromocitoma de rata	ATCC CRL-1721	2.0 pM	0.42 pM
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2266	No analizada	No analizada
SiMa	Neuroblastoma humano	DSMZ ACC 164	0.23 pM	0.005 pM
SK-N-BE(2)-C	Neuroblastoma humano	ATCC CRL-2271	No analizada	No analizada

Ejemplo III

Desarrollo de Anticuerpos Monoclonales α-SNAP-25 que Unen Selectivamente un Epítopo SNAP-25 que tiene un Término Carboxilo Libre en el Residuo P_1 del Enlace escindible del Sitio de Corte BoNT/A

[0161] El siguiente ejemplo ilustra cómo elaborar anticuerpos monoclonales α-SNAP-25, los cuales pueden unirse selectivamente a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A.

1. Generación de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25.

[0162] Para desarrollar anticuerpos monoclonales α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, el péptido de 13 residuos CDSNKTRIDEANQCOOH (SEQ ID NO: 38) se diseñó como un antígeno de producto de escisión SNAP-25. Este péptido comprende una región de conector flexible y un residuo de cisteína N-terminal para conjugación con KLH y los aminoácidos 186-197 de SNAP-25 humana (SEQ ID NO: 5) con una glutamina C-terminal carboxilada (SEQ ID NO: 38). La generación de anticuerpos monoclonales contra secuencias peptídicas únicas bien elegidas ofrece control sobre la especificidad del epítopo, permitiendo la identificación de una subpoblación particular de proteína entre un conjunto (***"a pool"***) de isoformas estrechamente relacionadas. Búsquedas BLAST revelaron que este péptido tiene una alta homología únicamente con SNAP-25 y casi ninguna posible reactividad cruzada con otras proteínas en células neuronales. De igual manera, la secuencia se examinó cuidadosamente a fondo utilizando algoritmos de computador para

determinar el índice de hidropatía, probabilidad de la superficie proteínica, regiones de flexibilidad, y estructura secundaria favorable, seguida por la orientación apropiada y la presentación de la secuencia peptídica seleccionada. El péptido se sintetizó y se conjugó a hemocianina de lapa (KLH) para aumentar la inmunogenicidad. Seis ratones Balb/c se inmunizaron con este péptido y, luego de tres inmunizaciones en alrededor de ocho semanas, los ratones se desangraron para experimentación. La sangre se dejó coagular incubando a 4°C durante 60 minutos. La sangre coagulada se centrifugó a 10.000x g a 4°C durante 10 minutos para sedimentar los residuos celulares. La muestra de suero resultante se dispensó en alícuotas de 50 µl y se almacenó a –20°C hasta que se necesitara.

[0163] Una estrategia similar basada en otros antígenos SNAP-25, divulgados en la presente especificación, se usa para desarrollar anticuerpos monoclonales α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Por ejemplo, el antígeno SNAP-25 de SEQ ID NO: 45 puede conjugarse a KLH en lugar del antígeno SNAP-25 de SEQ ID NO: 38. Como otro ejemplo, los aminoácidos 186-197 de la SNAP-25 humana del antígeno SNAP-25 de SEQ ID NO: 38 puede reemplazarse con SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, o SEQ ID NO: 44.

2. *Detección sistemática de la presencia de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25.*

[0164] Para determinar la presencia de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, el cual puede unirse selectivamente a un antígeno SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, se llevaron a cabo un ELISA comparativo y un análisis de escisión basado en células, usando el suero de ratón extraído. Para el ELISA comparativo, se construyeron dos proteínas de fusión: BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ de SEQ ID NO: 48 y la BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ de SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ incluía un péptido BirA de 16 aminoácidos naturalmente biotinilado de SEQ ID NO: 50 conectado amino-terminalmente a un péptido SNAP-25 que incluía los

aminoácidos 134-197 de SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ incluía un péptido BirA de 16 aminoácidos naturalmente biotinilado de SEQ ID NO: 50 conectado amino-terminalmente a un péptido SNAP-25 que incluía los aminoácidos 134-206 de SEQ ID NO: 5. Estos dos sustratos se suspendieron en 1 x PBS con una concentración de 10 µg/mL BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ y la BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$. La BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ y la BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ se aplicaron sobre placas separadas agregando aproximadamente 100 µl de solución de sustrato apropiada e incubando las placas a temperatura ambiente durante una hora. Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante una hora en 0.5% BSA en 1 x TBS que contenía una dilución 1:10 a 1:100 de un suero con contenido de anticuerpo derivado de uno de los seis ratones inmunizados (ratón 1, ratón 2, ratón 3, ratón 4, ratón 5 y ratón 6). Placas sondeadas con anticuerpo primario se lavaron cuatro veces durante 5 minutos cada vez en 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante 1 hora en 1 x TBS que contenía una dilución 1:10.000 de anticuerpo IgG anti-ratón policlonal en cabra conjugado a peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), como anticuerpo secundario. Las placas sondeadas con anticuerpo secundario se lavaron cuatro veces en 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Los productos SNAP-25 marcados se visualizaron por detección cromogénica usando el kit de sustrato ImmunoPure TMB (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). El desarrollo de un color amarillo en las placas recubiertas con BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$, pero no las placas recubiertas con la BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$, indicaron que el anticuerpo α-SNAP-25 reconoció preferencialmente el producto de escisión SNAP-25_{197}. Los resultados indicaron que de los seis ratones utilizados para inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4) tuvieron concentraciones más elevadas y más especificidad hacia el antígeno SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A.

[0165] Estos resultados fueron confirmados usando un análisis de actividad de cadena ligera ELISA. Se prepararon placas de 96 pozos recubiertas con estreptavidina Reacti-Bind (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) agregando aproximadamente 100 µl de la siguiente solución de sustrato: Las filas A-C se recubrieron con 100 µl de BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ con doce concentraciones diferentes; las filas D-H se recubrieron con 100 µl de BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$

a 10 µg/mL. Las placas se lavaron aspirando la solución de sustrato y enjuagando cada pozo tres veces con 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Las diluciones de BoNT/A se pre-redujeron a 37°C durante 20 minutos en solución amortiguadora de incubación BoNT/A (50 mM HEPES, pH 7.4, 1% suero bovino fetal, 10 µM $ZnCl_2$, 10 mM ditiotreitol), y 100 µl de la BoNT/A pre-reducida se agregaron a las placas recubiertas con sustrato y se incubaron a 37°C durante 90 minutos. Las placas tratadas con BoNT/A se lavaron aspirando la solución amortiguadora de incubación BoNT/A y enjuagando cada placa tres veces con 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante una hora en 0.5% BSA en 1 x TBS que contenía una dilución 1:10 a 1:100 del suero que incluía el anticuerpo que se estaba analizando. Las placas sondeadas con anticuerpo primario se lavaron cuatro veces durante 5 minutos cada vez en 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Las placas lavadas se incubaron a 37°C durante 1 hora en 1 x TBS que contenía una dilución 1:10.000 de anticuerpo IgG anti-ratón policlonal en cabra, conjugado a peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), como un anticuerpo secundario. Las placas sondeadas con anticuerpo secundario se lavaron cuatro veces en 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Los productos SNAP-25 marcados se visualizaron mediante detección cromogénica usando el kit de sustrato ImmunoPure TMB (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). El desarrollo de un color amarillo, el cual se correlacionó con la presencia del producto de escisión $SNAP\text{-}25_{197}$, se detectó en muestras tratadas con BoNT/A, pero no los controles no tratados, usando suero que contenía anticuerpo derivado de seis ratones inmunizados (ratón 1, ratón 2, ratón 3, ratón 4, ratón 5 y ratón 6). Por consiguiente, el análisis ELISA comparativo indicó que de los ratones utilizados para inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4) tuvieron concentraciones más elevadas y más especificidad hacia un antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A.

[0166] Para un análisis de escisión basado en células, una densidad apropiada de células PC12 se sembraron en placas de cultivo de tejido de 60 mm^2 que contenían 3 mL de un medio de suero apropiado (Tabla 1). Las células se cultivaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las

células alcanzaron la densidad apropiada. Se prepararon 500 µl de una solución de tranfección agregando 250 µl de medio de suero reducido OPTI-MEM, que contenía 15 µl de LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA), incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos, a 250 µl de medio de suero reducido OPTI-MEM que contenía 10 µg de un constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (SEQ ID NO: 51). El constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC comprende el vector de expresión pQBI-25 (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA), cuyos elementos promotores están funcionalmente conectados a un polinucleótido que codifica la cadena ligera GFP-BoNT/A de SEQ ID NO: 52. Esta mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. El medio se reemplazó con medio fresco no suplementado, y se agregaron 500 µl de solución de transfección a las células. A continuación las células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono durante aproximadamente 6 a 18 horas. Las células se lavaron y se recolectaron como se describe en Ejemplo II. Para detectar la presencia del producto SNAP-25_{197} escindido, se analizó por Western blot una alícuota de cada muestra recolectada como se describe en Ejemplo II, excepto que el anticuerpo primario utilizado era una dilución 1:1.000 del suero que contenía anticuerpo y el anticuerpo secundario usado fue una dilución 1:20.000 de α-IgG de ratón/peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Una banda única correspondiente al producto de escisión SNAP-25_{197} se detectó en las muestras tratadas con BoNT/A, pero no los controles no tratados, usando suero que contenía anticuerpo derivado de tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4). Por consiguiente, el análisis de escisión basado en células indicó que de los ratones utilizados para inmunización, tres ratones (ratón 2, ratón 3 y ratón 4) tuvieron concentraciones más elevadas y más especificidad hacia un antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A.

3. Producción de hibridomas.

[0167] Para elaborar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales α-SNAP-25, los cuales pueden unirse selectivamente a antígeno SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, se recogió el bazo del ratón 2 tres días luego de una inmunización de

125

"refuerzo" final y los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma P3-X63 Ag8.653 usando protocolos de hibridoma estándar. Estas células se sembraron en placas de 96 pozos, y se seleccionaron híbridos utilizando medio HAT. En un término de 8-14 días luego de la fusión, la primera detección sistemática de los aproximadamente 480 clones progenitores se llevó a cabo usando ELISA comparativo con los péptidos BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ y BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ recubiertos en dos placas separadas. El ELISA comparativo ofreció un método de detección sistemática rápida para identificar hibridomas que producen anticuerpos específicos para el SNAP-25_{197} escindido. Los 18 clones principales se sometieron a una detección selectiva adicional usando el análisis de escisión basado en células descrito anteriormente e inmunotinción de las células transfectadas LC/A. (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de Sobrenadantes que Contienen Anticuerpo Monoclonal α-SNAP-25

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

[0168] Los clones 1D3, 1G10, 2E2, 3C1, 3C3 y 3E8 se clonaron posteriormente por dilución limitante porque el medio acondicionado producido por estos clones comprendían anticuerpos α-SNAP-25 con una especificidad de unión preferencial que tiene una relación$_{197/206}$ de por lo menos 4:1 para el producto de escisión SNAP-25_{197} relativo al sustrato no escindido SNAP-25_{206} y detectaron el producto

de escisión SNAP-25_{197} usando el análisis de escisión basado en células y la inmunotinción de células PC12 transfectadas con GFP-LC/A. Análogamente los clones 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 y 4G6 se clonaron posteriormente por dilución limitante porque el medio acondicionado producido por estos clones comprendía anticuerpos α-SNAP-25 con una especificidad de unión preferencial que tienen una relación$_{206/197}$ de por lo menos 1.5:1 para el sustrato no escindido SNAP-25_{206} relativo al producto de escisión SNAP-25_{197} y detectaron el sustrato no escindido SNAP-25_{206} usando el análisis de escisión basado en células. Estos clones derivados de una célula única se detectaron sistemáticamente de nuevo usando un ELISA comparativo, escisión basada en células e inmunotinción para confirmar su afinidad y especificidad, y los anticuerpos se isotipificaron empleando procedimientos estándar. Se produjo líquido ascítico de los clones 1D3B8 (IgM.k), 1G10A12 (IgG3.k), 2C9B10 (IgG3.k), 2E2A6 (IgG3.k), 2F11B6 (IgM.k), 3C1A5 (IgG2a.k) yd 3C3E2 (IgG2a.k). El clon 3E8 dejó de producir anticuerpos durante el proceso de clonación y no pudo evaluarse posteriormente.

4. Evaluación de la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25.

[0169] Para evaluar la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, el cual puede unirse selectivamente al antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, se empleó fluido ascítico de los clones 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5 y 3C3E2 para detectar producto de escisión SNAP-25 usando el análisis de actividad basado en células, inmunocitoquímica e inmunoprecipitación.

[0170] Para el análisis de actividad basado en células, se determinó la especificidad de unión analizando la capacidad de fluido ascítico que contiene el anticuerpo α-SNAP-25 para detectar el sustrato SNAP-25_{206} no escindido y el producto SNAP-25_{197} escindido por análisis Western blot. Una densidad apropiada de células PC12 se sembraron en placas de cultivo de tejido de 60 mm^2 que contenían 3 mL de un medio de suero apropiado, se cultivaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que se consiguió una densidad celular apropiada, y se transfectaron con una solución de transfección que carecía del constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células no transfectadas) o

127

una solución de transfección que contenía el constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células transfectadas), como se describe anteriormente. Las células se lavaron y se recolectaron como se describe en Ejemplo I. Para detectar la presencia de los dos, el sustrato SNAP-25_{206} no escindido y el producto SNAP-25_{197} escindido, se analizó por Western blot una alícuota de cada muestra recolectada, como se describe en Ejemplo I, excepto que el anticuerpo primario utilizado fue una dilución 1:100 del fluido ascítico que contenía el anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, y el anticuerpo secundario utilizado fue una dilución 1:20.000 de α-IgG de ratón conjugada a peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Además, se examinaron tres anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 de ratón, disponibles en el comercio. SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), un anticuerpo α-SNAP-25, que el fabricante indica que detecta tanto el sustrato SNAP-25_{206} no escindido como el producto SNAP-25_{197} escindido, se usó con una dilución 1:15.000 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), un anticuerpo α-SNAP-25, que el fabricante indica que detecta tanto el sustrato SNAP-25_{206} no escindido como el producto SNAP-25_{197} escindido, se utilizó con una dilución de 1:100 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. MC-6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), un anticuerpo α-SNAP-25, que el fabricante indica que detecta únicamente el producto SNAP-25_{197} escindido, se utilizó con una dilución 1:100 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

[0171] Tabla 8 indica los fluidos ascíticos que contenían el anticuerpo α-SNAP-25 que detectaron únicamente el producto de escisión SNAP-25_{197}. El análisis de escisión basado en células indicó que los fluidos ascíticos producidos de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 sintetizan un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 que posee alta especificidad de unión para el producto de escisión SNAP-25_{197} que permite el reconocimiento selectivo de este producto de escisión relativo al sustrato no escindido SNAP-25_{206}. El anticuerpo SMI-81, disponible en el comercio, detectó el sustrato no escindido SNAP-25_{206}, pero sólo reconoció deficientemente el producto de escisión SNAP-25_{197} (Tabla 8). Sorpresivamente, el anticuerpo MC-6050, disponible en el comercio, sólo detectó el sustrato no escindido SNAP-25_{206}, y no reconoció el producto de escisión SNAP-25_{197} (Tabla 8). Aún más sorpresivamente, el anticuerpo MC-6050,

disponible en el comercio, sólo detectó el sustrato no escindido SNAP-25_{206}, y no reconoció el producto de escisión SNAP-25_{197}, aunque el fabricante advierte que este anticuerpo detecta selectivamente el producto de escisión SNAP-25_{197} (Tabla 8). Por consiguiente, este análisis indica que mientras 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 exhiben una selectividad apropiada para el producto de escisión SNAP-25_{197}, 1G10A12 y 2F11B6 no lo hacen. Adicionalmente, los anticuerpos SMI-81, MC-6050 y MC-6053, disponibles en el comercio, son todos inadeacuados para los métodos basados en inmunología divulgados en la presente solicitud porque todos fallaron en detectar selectivamente el producto de escisión SNAP-25_{197}.

[0172] Para análisis de inmunocitoquímica, se determinó la especificidad de unión examinando detenidamente la capacidad de un fluido ascítico, que contenía el anticuerpo α-SNAP-25, para detectar por inmunotinción el sustrato SNAP-25_{206} no escindido y el producto SNAP-25_{197} escindido. Véase, *por ej.*, Ester Fernandez-Salas et al., *Plasma Membrane Localization Signals in the Light Chain of Botulinum Neurotoxin,* Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 101(9): 3208-3213 (2004). Una densidad apropiada de células PC12 se sembraron, cultivaron y transfectaron con una solución de transfección, que carecía del constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células no transfectadas), o una solución de transfección que contenía el constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células transfectadas), como se describe anteriormente. Las células se lavaron en 1 x PBS y se fijaron en 5 mL de PAF a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células fijadas se lavaron en solución salina amortiguada con fosfato, se incubaron en 5 mL de 0.5% Triton® X-100 (polietilen glicol octilfenol éter) en 1 x PBS, se lavaron en 1 x PBS y se permeabilizaron en 5 mL de metanol a –20°C durante seis minutos. Las células permeabilizadas se bloquearon en 5 mL de 100 mM glicina a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron en 1 x PBS, y se bloquearon en 5 mL de 0.5% BSA en 1 x PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células bloqueadas se lavaron en 1 x PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas en 0.5% BSA en 1 x PBS que contenía una dilución 1:10 de fluido ascítico de una línea celular de hibridoma clonal que se estaba analizando. Las células sondeadas con anticuerpo primario se lavaron tres veces durante 5 minutos cada vez en 1 x PBS. Las células lavadas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en 1 x PBS, que contenía una dilución

1:200 de inmunoglobulina G anti-ratón policlonal en cabra, anticuerpo de cadenas pesada y ligera (IgG, H+L) conjugado a ALEXA® FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA), como un anticuerpo secundario. Las células sondeadas con anticuerpo secundario se lavaron tres veces durante 5 minutos cada vez en 1 x PBS. Las células lavadas se prepararon para examen microscópico montando en medio de montaje VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se cubrieron con un cubreobjetos. Se obtuvieron imágenes de detección de señal con un microscopio confocal Leica usando valores láser apropiados. Tabla 8 indica que el fluido ascítico que contenía el anticuerpo α-SNAP-25 detectó específicamente el producto de escisión SNAP-25_{197}. El análisis de inmunohistoquímica indicó que el fluido ascítico producido de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 sintetizan un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, el cual posee alta especificidad de unión para el producto de escisión SNAP-25_{197} que permite el reconocimiento preferencial de este producto de escisión relativo al sustrato no escindido SNAP-25_{206}.

[0173] Para análisis de inmunoprecipitación, se determinó la especificidad de unión analizando la capacidad de la Proteína A (HiTrap™ Protein A HP Columns, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ), anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 purificados para precipitar el sustrato SNAP-25_{206} no escindido y el producto SNAP-25_{197} escindido. Véase, *por ej.*, Chapter 8 *Storing and Purifying Antibodies,* pp. 309-311, Harlow & Lane, *supra,* 1998a. Una densidad apropiada de células PC12 se sembraron, se cultivaron y se transfectaron con una solución de transfección, que contenía un constructo de expresión pQBI-25/GFP (células de control; SEQ ID NO: 53), o una solución de transfección, que contenía el constructo de expresión pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC (células experimentales), como se describe anteriormente. El constructo de expresión pQBI-25/GFP comprende un vector de expresión cuyos elementos promotores están funcionalmente conectados a un polinucleótido que codifica GFP de SEQ ID NO: 54. Luego de una incubación de un día para otro, las células se lavaron aspirando el medio de cultivo y enjuagando cada pozo con 200 µl 1 x PBS. Para recolectar las células, se aspiró la PBS, las células se lisaron agregando una solución amortiguadora de lisis de inmunoprecipitación que contenía 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGDT, 10% glicerol, 1% Triton® X-100 (polietilen glicol octilfenol éter) y una mezcla inhibitoria de proteasa 1 x COMPLETE™ (Roche Applied

130

Biosciences, Indianapolis, IN) e incubando a 4°C durante 1 hora. Las células lisadas se centrifugaron a 3.000 x *g* a 4°C durante 10 minutos para extraer los residuos celulares y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se diluyó a una concentración de proteína de aproximadamente 1 mg/mL. Aproximadamente 5 µg de anticuerpo monoclonal purificado se agregaron a 0.5 mL de sobrenadante diluido y se incubaron a 4°C durante dos horas. Luego de la incubación del anticuerpo primario, aproximadamente 50 µl de Proteína G inmovilizada (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) se agregaron al sobrenadante diluido y se incubaron a 4°C durante una hora. El sobrenadante incubado se lavó tres veces durante 30 minutos cada vez agregando 0.5 mL de solución amortiguadora de lisis de inmunoprecipitación, centrifugando a 300 x *g* a 4°C durante un minuto para sedimentar la Proteína G inmovilizada, y decantando el sobrenadante. Luego de lavar, el sedimento celular se resuspendió en 30 µl de 1 x SDS solución amortiguadora de carga, y la muestra se calentó a 95°C durante 5 minutos. Para detectar la presencia del sustrato SNAP-25_{206} no escindido y el producto SNAP-25_{197} escindido, se analizó por Western blot una alícuota de cada muestra recolectada, como se describe en Ejemplo I, excepto que el anticuerpo primario utilizado fue una dilución 1:1.000 del suero anticuerpo policlonal α-SNAP-25 (véase, Ejemplo IV), y el anticuerpo secundario empleado fue una dilución 1:20.000 de α-IgG de conejo conjugada a peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Tabla 8 indica el fluido ascítico que contiene el anticuerpo α-SNAP-25 que específicamente precipitó el producto de escisión SNAP-25_{197} por análisis de inmunoprecipitación. El análisis de inmunoprecipitación indicó que el fluido ascítico producido de clones 2E2A6 y 3C1A5 sintetizan un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, el cual posee una elevada especificidad de unión para el producto de escisión SNAP-25_{197}, que permite el reconocimiento preferencial de su producto de escisión relativo al sustrato no escindido SNAP-25_{206}.

Tabla 8. Análisis de Fluido Ascítico de Clones que Contenía Anticuerpo Nonoclonal α-SNAP-25

Clon	Análisis Basado en Células		Inmunocitoquímica		Inmunoprecipitación	
	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}
1D3B8	++	-	++	-	No analizada	No analizada
1G10A12	++	++	No analizada	No analizada	No analizada	No analizada
2C9B10	++	-	++	-	No	No

					analizada	analizada
2E2A6	++	-	++	-	++	-
2F11B6	+	+	+	+	No analizada	No analizada
3C1A5	++	-	++	-	++	-
3C3E2	+	-	No analizada	No analizada	No analizada	No analizada
MC-6050	-	+	No analizada	No analizada	No analizada	No analizada
MC-6053	-	+	No analizada	No analizada	No analizada	No analizada
SMI-81	-/+	++	No analizada	No analizada	No analizada	No analizada

5. Evaluación de la afinidad de unión de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25.

[0175] Para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, el cual muestra alta especificidad de unión para el producto de escisión SNAP-25_{197} o el sustrato no escindido SNAP-25_{206}, se llevaron a cabo análisis de afinidad en un instrumento BIAcore 3000 empleando chips sensores de carboximetil dextrano (CM5) (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Se realizaron corridas (***"runs"***) a 25°C con solución amortiguadora HBS-EP que contenía 10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM cloruro de sodio, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) tensioactivo P20 a un caudal de 10 µl/min. Los péptidos SNAP-25, que comprendían los aminoácidos 134-197 de SEQ ID NO: 5 (SNAP-$25_{134-197}$) o los aminoácidos 134-206 de SEQ ID NO: 5 (SNAP-$25_{134-206}$), se unieron covalentemente a la superficie de los chips sensores CM5 usando acoplamiento de amina estándar. En pocas palabras, los chips CM5 se activaron por una inyección de 7 minutos de una mezcla de 0.2 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y 0.05 M N-hidroxisuccimida; los péptidos SNAP-25 se inyectaron entonces en 10 mM acetato de sodio (pH 4.0) durante 20 minutos a un caudal de 10 µL/min; y ésteres de succimida sin reaccionar se bloquearon por una inyección de 7 minutos de 1 M clorhidrato de etanolamina, pH 8.5. La cantidad inmovilizada de SNAP-$25_{134-197}$ o SNAP-$25_{134-206}$ sobre el chip se reflejó por un incremento 100-150 en unidades de respuesta (alrededor de 0.10-0.15 ng/mm^2). Muestras de anticuerpo que contenían fluido ascítico o anticuerpos monoclonales purificados, producidos de los clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2, así como anticuerpos α-SNAP-25, disponibles en el comercio, se pasaron sobre la superficie de los chips CM5 permitiendo un tiempo de asociación de 10 minutos y

un tiempo de disociación de 20 minutos. Las superficies se regeneraron entre corridas mediante una inyección de 1 minuto de 10 mM HCl de glicina (pH 2.5) con un caudal de 15 µL/minuto. Se ajustaron las curvas del sensograma a un modelo de unión cinético 1:1 con el software de evaluación BIA 3.0.

[0176] Los resultados indican que los dos 2E2A6 y 3C1A5 fueron altamente específicos para el producto SNAP-25_{197} escindido sobre el sustrato no escindido SNAP-25 (Tabla 9). Si se compara con las afinidades de unión de MC-6050 y MC-6053, 1D3B6 tuvo una constante de disociación de equilibrio aproximadamente 10 veces más alta para el producto de escisión SNAP-25 relativa a estos anticuerpos comerciales (Tabla 9). De modo interesante, 2E2A6 tuvo únicamente una constante de disociación de equilibrio ligeramente menor para el producto de escisión SNAP-25 relativa a estos anticuerpos comerciales (0.405 nM versus 0.497 y 0.508) (Tabla 9). Como ninguno de estos anticuerpos α-SNAP-25 comerciales reconoció el producto de escisión SNAP-25 (Tabla 8), una constante de disociación de equilibrio menor que alrededor de 0.5 nM parece crítica, en parte, para obtener tal selectividad. Análogamente, comparado con las afinidades de unión de MC-6050 y MC-6053, 2E2A6 tuvo una constante de disociación/off-rate de alrededor de por lo menos una vez más lenta (6.74×10^{-5} versus 8.82×10^{-4} s^{-1} y 1.18×10^{-3} s^{-1}) (Tabla 9). Esto sugiere además que una constante de disociación/off rate menor que alrededor de 8.82×10^{-4} parece crítica, en parte, para lograr una unión selectiva para el producto de escisión SNAP-25. Este resultado es consistente con 1D3B8, que tuvo una constante de disociación/off rate de 5.78×10^{-5} s^{-1} (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de Afinidad de Unión de Anticuerpos Monoclonales α-SNAP-25

Parámetro SPR	1D3B8		2E2A6*	
	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}[a]	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}[b]
Ka (M^{-1} s^{-1})	1.06×10^{6}	—	1.70×10^{6} (1.66×10^{5})	— (—)
Kd(s^{-1})	5.78×10^{-5}	—	1.53×10^{-4} (6.74×10^{-5})	— (—)
KD (nM)	0.050	—	0.090 (0.405)	— (—)
Parámetro SPR	**3C1A5**		**2C9B10**	
	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}[c]	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}[d]
Ka (M^{-1} s^{-1})	2.17×10^{5}	—	1.15×10^{4}	—
Kd (s^{-1})	2.88×10^{-4}	—	3.11×10^{-4}	—
KD (nM)	1.33	—	27.1	—
Parámetro SPR	**MC-6050**		**MC-6053**	
	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}

Ka (M^{-1} s^{-1})	1.78 $x10^6$	3.06 $x10^2$	2.32 x 10^6	1.06 x 10^2
Kd (s^{-1})	8.82 x 10^{-4}	6.07 $x10^{-3}$	1.18 x 10^{-3}	2.56 $x10^{-5}$
KD (nM)	0.497	19,800	0.508	240

* Se condujeron dos corridas independientes para este anticuerpo con dos chips diferentes.

[a] No se observó unión cuando hasta 125 nM de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 1D3B8 se pasaron sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.

[b] No se observó unión cuando hasta 10 μM de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 2E2A6 se pasaron sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.

[c] No se observó unión cuando hasta 100 nM de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 3C1A5 se pasaron sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.

[d] No se observó unión cuando hasta 100 nM de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 2C9B10 se pasaron sobre la superficie del chip sensor CM5 después de un tiempo de asociación de 10 minutos.

6. *Secuenciamiento del epítopo de anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 aislados.*

[0177] Para determinar el epítopo de un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 aislado, el cual se puede unir selectivamente a un antígeno SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, se secuenció la molécula polinucleotídica que codifica las cadenas pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25, producido por los hibridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2. Se extrajo mRNA y se purificó de cada hibridoma empleando protocolos estándar y se transcribió inversamente en cDNA usando un cebador complementario oligo dT o un cebador complementario (IgG1 murina CH y kappa CL) específico del gen. Se emplearon cebadores de dominio constante específicos murinos y humanos para amplificar el cDNA por PCR, luego de la producción de cDNA para determinar el isotipo del anticuerpo. Cebadores V_H y V_L degradados se usaron para amplificar los dominios variables del cDNA. Para 5'RACE, se agregó una cola dCTP homopolimérica al extremo 3' del cDNA. A continuación se amplificaron las cadenas pesadas y ligeras con un cebador codificante dG oligo y un cebador

complementario (CH/KC), específico del gen. Productos PCR incluían la secuencia del péptido señal, los dominios variables y los dominios constantes hasta el cebador complementario. Los productos PCR se purificaron en gel para extraer fragmentos pequeños, y se clonaron en un vector romo o TA para secuenciamiento. Se secuenciaron cinco clones independientes para cada cadena y se determinaron los alineamientos de las cadenas V_H y V_L y las secuencias consenso (Tabla 10). Los métodos utilizados para determinar las secuencias de aminoácidos V_H y V_L se describen en, *por ej.*, Roger A. Sabbadini, et al., *Novel Bioactive Lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same,* Publicación de Patente de los Estados Unidos 2007/0281320; y Peter Amersdorfer, et al., *Molecular Characterization of Murine Humoral Immune Response to Botulinum Neurotoxin Type A Binding Domain as Assessed by Using Phage Antibody Libraries,* 65(9) Infect. Immun. 3743-3752, cada uno de los cuales se incorpora por este medio por referencia en su totalidad. Adicionalmente, se dispone de servicios comerciales para secuenciar las cadenas variables pesadas (V_H) y variables ligeras (V_L) de un anticuerpo e identificar las regiones CDR, véase, *por ej.*, Fusion Antibodies Ltd., Northern Ireland.

[0178] La secuencia polinucleotídica que comprende las cadena V_H y V_L del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas divulgados en la presente especificación es la siguiente: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 71), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO: 73), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 75), 3C1A5 V_H variante 1 (SEQ ID NO: 77), 3C1A5 V_H variante 2 (SEQ ID NO: 79), 3C3E2 V_H (SEQ ID NO: 81); 1D3B8 V_L (SEQ ID NO: 83), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 85), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 87), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 89), y 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 91). La secuencia de aminoácidos que comprende las cadenas V_H y V_L del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas divulgados en la presente especificación es la siguiente: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 72), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO: 74), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 76), 3C1A5 V_H variante 1 (SEQ ID NO: 78), 3C1A5 V_H variante 2 (SEQ ID NO: 80), 3C3E2 V_H (SEQ ID NO: 82); 1D3B8 V_L (SEQ ID NO: 84), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 86), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 88), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 90), y 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 92). Las secuencias de aminoácidos que comprenden los dominios CDR V_H y V_L del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 y 3C3E2 se dan en Tabla 10.

Tabla 10. Secuencias CDR de los Dominios V_H y V_L de Anticuerpos monoclonales α-SNAP-25			
CDR	**Secuencia**	**Identificada en**	**SEQ ID NO:**
V_H CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5 variante 2	93
V_H CDR 1	TFTNYVIH	3C1A5 variante 1 3C3E2	94
V_H CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V_H CDR 2	YLFPGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5 variante 2	97
V_H CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C1A5 variante 1 3C3E2	98
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V_H CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5 variante 2	100
V_H CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
V_H CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C1A5 variante 1 3C3E2	102
V_L CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
V_L CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
V_L CDR 1	RASKSVSTSGYSYMH	2E2A6	105
V_L CDR 1	KASQDIKSYLS	3C1A5	106
V_L CDR 1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
V_L CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
V_L CDR 2	NAKSLAE	2C9B10	109
V_L CDR 2	LVSNLES	2E2A6	110
V_L CDR 2	YATSLAD	3C1A5	111
V_L CDR 2	YASQSIS	3C3E2	112
V_L CDR 3	FQGSHVPPT	1D3B8	113
V_L CDR 3	QHHYGTPYT	2C9B10	114
V_L CDR 3	QHIRELTRS	2E2A6	115
V_L CDR 3	LQHGESPFT	3C1A5	116
V_L CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

[0179] Ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos que comprenden variantes de dominio CDR V_H del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas divulgados en la presente especificación incluyen variante V_HCDR1 SEQ ID NO: 118 para 1D3B8; variante CDR1 VH SEQ ID NO: 119 para 2C9B10, 2E2A6 3C1A5 V_H variante 2; CDR1 VH variante SEQ ID NO: 120 para 3C1A5 V_H variante 1 y 3C3E2; CDR2 VH variante SEQ ID NO: 121 para 1D3B8 y 2E2A6; CDR2 VH variante SEQ ID NO: 122 para 2C9B10 y 3C1A5 V_H variante 2; CDR2 VH variante SEQ ID NO: 123 para 3C1A5 V_H variante 1, y 3C3E2; CDR3 VH variante MDY para 1D3B8 y 2C9B10; CDR3 VH variante MGY para 2E2A6 y

3C1A5 V_H variante 2; y CDR3 VH variante SEQ ID NO: 124 para 3C1A5 V_H variante 1 y 3C3E2. Ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos que comprenden variantes de dominio CDR V_L del anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 producido por los hibridomas divulgados en la presente especificación incluyen CDR1 VL variante SEQ ID NO: 125 para 1D3B8; CDR1 VL variante SEQ ID NO: 126 para 2C9B10; CDR1 VL variante SEQ ID NO: 127 para 2E2A6; CDR1 VL variante SEQ ID NO: 128 para 3C1A5; CDR1 VL variante SEQ ID NO: 129 para 3C3E2; V_L CDR2 variante KVS para 1D3B8; V_L CDR2 variante NAK para 2C9B10; V_L CDR2 variante LVS para 2E2A6; V_L CDR2 variante YAT para 3C1A5; y V_L CDR2 variante YAS para 3C3E2.

Ejemplo IV

Desarrollo de Anticuerpos Policlonales α-SNAP-25 que Selectivamente Unen un Epítopo SNAP-25 que tiene un Término Carboxilo Libre en el Residuo P_1 del Enlace escindible del Sitio de Corte BoNT/A

[0180] El siguiente ejemplo ilustra cómo elaborar anticuerpos policlonales α-SNAP-25 los cuales pueden unirse selectivamente a un epítopo SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A.

[0181] Para desarrollar anticuerpos policlonales α-SNAP-25 que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, se diseñó el péptido de 10 residuos CGGGRIDEANQ (SEQ ID NO: 46) como un antígeno producto de escisión SNAP-25. Este péptido que contenía un residuo cisteína N-terminal para conjugación con KLH, un espaciador flexible G (GGG) conectado a los aminoácidos 191-197 de la SNAP-25 humana (SEQ ID NO: 5) y tenía una glutamina C-terminal carboxilada. Búsquedas BLAST revelaron que este péptido tiene una alta homología únicamente con SNAP-25 y prácticamente ninguna reactividad cruzada con otras proteínas en las células neuronales. Se examinó igualmente a fondo la secuencia utilizando algoritmos de computador para determinar el índice de hidropatía, la probabilidad de superficie proteínica, regiones de flexibilidad y estructura secundaria favorable, seguida por orientación adecuada y presentación de la secuencia peptídica elegida. El péptido se sintetizó

139

y se conjugó con hemocianina de lapa (KLH) para incrementar la inmunogenicidad. Antes de inmunizar los animales, conejos no tratados previamente se diagnosticaron primero contra lisados de líneas celulares candidatas en un Western blot, con el fin de identificar animales que no presentaban inmunorreactividad a las proteínas presentes en los lisados de células. Dos conejos pre-diagnosticados se inmunizaron con este péptido, y después de tres inmunizaciones en alrededor de ocho semanas, los conejos se desangraron para experimentación. Se dejó coagular la sangre incubando a 4°C durante 60 minutos. La sangre coagulada se centrifugó a 10.000x g a 4°C durante 10 minutos para sedimentar los residuos celulares. La muestra de suero resultante se dispensó en alícuotas de 50 µl y se almacenó a –20°C hasta que se necesitara.

[0182] Una estrategia similar, basada en otros antígenos SNAP-25, divulgada en la presente especificación, se emplea para desarrollar anticuerpos policlonales α-SNAP-25, que unen un epítopo que incluye un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25. Por ejemplo, el antígeno SNAP-25 de SEQ ID NO: 47 puede conjugarse con KLH en lugar del antígeno SNAP-25 de SEQ ID NO: 46. Como otro ejemplo, los aminoácidos 191-197 de la SNAP-25 humana del antígeno SNAP-25 de SEQ ID NO: 38 puede reemplazarse con SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, o SEQ ID NO: 148.

2. Detección sistemática de la presencia de anticuerpos policlonales α-SNAP-25.

[0183] Para determinar la presencia de anticuerpos policlonales α-SNAP-25, los cuales pueden unirse selectivamente al antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, se llevaron a cabo un ELISA comparativo u análisis de escisión basados en células usando el suero de conejo extraído como se describe en Ejemplo III. El suero de ambos conejos contenía anticuerpos policlonales α-SNAP-25, los cuales pueden unirse selectivamente al antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A. Los anticuerpos

138

policlonales de conejo α-SNAP-25 se designaron como NTP 22 y NTP 23.

3. *Purificación de anticuerpos policlonales α-SNAP-25.*

[0184] Para purificar anticuerpos policlonales α-SNAP-25, los cuales pueden unirse selectivamente al antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, los anticuerpos NTP 22 y NTP 23 de suero de conejo se purificaron usando columna de afinidad que contenía el antígeno SNAP-25 de SEQ ID NO: 46.

4. Evaluación de la especificidad de unión de anticuerpos policlonales α-SNAP-25.

[0185] Para evaluar la especificidad de unión de un anticuerpo policlonal α-SNAP-25, el cual puede unirse selectivamente al antígeno SNAP-25 que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, se utilizaron anticuerpos policlonales α-SNAP-25 NTP 22 y NTP 23 para detectar producto de escisión, usando el análisis de actividad basado en células, inmunocitoquímica e inmunoprecipitación, como se describe en Ejemplo III. El análisis de escisión basado en células, el análisis de inmunocitoquímica y el análisis de inmunoprecipitación todos indicaron que los anticuerpos policlonales α-SNAP-25 NTP 22 y NTP 23 no reaccionaron cruzadamente con SNAP-25 no escindida. Por consiguiente los dos NTP 22 y NTP 23 poseen alta especificidad de unión para el producto de escisión $SNAP\text{-}25_{197}$, que permite el reconocimiento preferencial de este producto de escisión relativo al sustrato no escindido $SNAP\text{-}25_{206}$. La afinidad para los antígenos puede determinarse usando SPR en el BiAcore como se describe en Ejemplo III.

Ejemplo V

Componentes y Condiciones de Preparación para un ELISA Sándwich

[0186] El siguiente ejemplo ilustra cómo identificar y preparar los componentes y condiciones necesarias para realizar un ELISA sándwich, útil para conducir métodos basados en inmunología de detectar actividad BoNT/A detectando un producto de escisión SNAP-25, usando un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25

específico para una SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A.

1. Preparación de lisados de células tratadas con BoNT/A.

[0187] Para obtener lisados de células tratadas con BoNT/A para análisis, una densidad apropiada de células de un cultivo madre de Neuro-2a se sembraron en un matraz T175 que contenía 50 mL de un medio libre de suero con contenido de Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES. Estas células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos rutinarios y estándar, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 2 a 3 días). Como control, una densidad apropiada de células de un cultivo madre de Neuro-2a se sembró en un matraz T175 que contenía 50 mL de un medio de cultivo apropiado (Tabla 1). Estas células de control no diferenciadas se cultivaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que se alcanzó una confluencia del 50% (aproximadamente 18 horas). Los medios de los dos cultivos de control diferenciado y no diferenciado se aspiraron de cada pozo y se reemplazaron con medio fresco que contenía 0 (muestra no tratada) o 10 nM de un complejo BoNT/A. Luego de una incubación de un día para otro, las células se lavaron y se recolectaron lisando en solución amortiguadora de lisis Triton X-100 recién preparado (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100) a 4°C durante 30 minutos con agitación constante. Las células lisadas se centrifugaron a 4.000 rpm durante 20 minutos a 4°C para eliminar los residuos usando una centrífuga *bench-top*. Las concentraciones de proteína de los lisados celulares se midieron por análisis Bradford.

2. Preparación e identificación de los componentes del ELISA sándwich.

[0188] Para identificar un par apropiado de anticuerpos de captura-anticuerpo de detección se condujo un análisis ELISA sándwich ECL en veintiseis combinaciones diferentes de pares anticuerpo de captura y detección, que comprendían once diferentes anticuerpos de captura α-SNAP-25 y siete diferentes

140

anticuerpos de detección α-SNAP-25 (Tabla 12). Los anticuerpos α-SNAP-25 usados fueron anticuerpos monoclonales de ratón α-SNAP-25 2E2A6 y 3C1A5, divulgados en la presente especificación, anticuerpos monoclonales de ratón α-SNAP-25 SMI-81, MC-6050 y MC-6053, divulgados en la presente especificación, los anticuerpos policlonales de conejo α-SNAP-25 NTP 23, divulgados en la presente especificación, los anticuerpos policlonales de conejo α-SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO), los anticuerpos policlonales α-SNAP-25 H-50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), los anticuerpos policlonales de cabra α-SNAP-25 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), los anticuerpos policlonales de cabra α-SNAP-25 N-19 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), y los anticuerpos policlonales de ratón α-SNAP-25 SP12 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

[0189] Para preparar **la** solución de anticuerpo de captura, los anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 contenidos en el fluido ascítico de líneas celulares de hibridoma 2E2A6 y 3C1A5, así como los anticuerpos monoclonales α-SNAP-25 MC-6050 y MC-6053 se purificaron usando un protocolo de purificación de Proteína A estándar. Todos los demás anticuerpos α-SNAP-25 se adquirieron como anticuerpos purificados.

[0190] Para preparar la solución de anticuerpo de detección, el anticuerpo α-SNAP-25 apropiado se conjugó con reactivo marcador rutenio(II)-tris-bipiridina-(4-metisulfonato) NHS éster (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación se realizó agregando 30 µl de solución patrón concentrada MSD SULFO-TAG™ reconstituida con agua a 200 µl de 2 mg/mL anticuerpos policlonales α-SNAP-25 e incubando la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Los anticuerpos marcados se purificaron usando un protocolo de columna de centrifugado estándar, y se determinó la concentración de proteína empleando un análisis de proteína colorimétrico estándar. Se midió la absorbencia del conjugado anticuerpo α-SNAP-25/MSD SULFO-TAG™ a 455 nm usando un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de detección de anticuerpo se almacenó a 4°C hasta que se necesitara.

[0191] Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura que es específico para un producto de escisión SNAP-25, aproximadamente 5 µl de la solución apropiada de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 (20 µg/mL en 1 x PBS) se agregan a cada pozo de una placa MSD High Bind de 96 pozos, y la solución se dejó secar al aire en un gabinete de seguridad biológica durante 2-3 horas, con el fin de evaporar el líquido de la solución. Los pozos ligados al anticuerpo de captura se bloquearon entonces agregando 150 µl de solución amortiguadora de bloqueo que contenía 2% reactivo de bloqueo Amersham (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y 10% suero de cabra (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas bloqueadas se sellaron y se almacenaron a 4°C hasta que se necesitaran.

[0192] Para detectar la presencia de un producto de escisión SNAP-25 por análisis ELISA sándwich ECL, se aspiró de los pozos la solución amortiguadora de bloqueo de las placas almacenadas, 25 µl de un lisado de las células tratadas con BoNT/A, como se describe anteriormente, se agregaron a cada pozo y las placas se incubaron a 4°C de un día para otro. Los pozos de las placas se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pozo tres veces con 200 µl 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Después de lavar, se agregaron a cada pozo 25 µl de 5 µg/mL de solución de anticuerpo de detección, que contenía 2% reactivo de bloqueo Amersham en 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato), la placa se selló, y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Luego de la incubación del anticuerpo de detección, los pozos se lavaron tres veces con 200 µl 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Después de lavar, se agregaron a cada pozo 150 µL de 1 x solución amortiguadora de Lectura (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD), y se leyeron las placas usando un Lector de Imagen SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se calculó una relación dividiendo la señal obtenida con la dosis 10 nM para cada par de anticuerpos por la señal obtenida con la dosis 0 nM para cada par de anticuerpos (Tabla 12). Estos resultados indicaron que entre las veintiseis combinaciones diferentes de pares de anticuerpos examinados, sólo tres pares de anticuerpos tuvieron relaciones señal/ruido por encima de 10:1 para la dosis examinada más alta: Par No. 1 (mAb de ratón 2E2A6 y pAb de conejo S9684), Par No. 4 (mAb de ratón 3C1A5 y pAb de conejo S9684), y Par No. 18

(pAb de conejo S9684 y mAb de ratón 2E2A6). El Par 1 de anticuerpos se eligió para desarrollo de análisis posteriores.

Tabla 12. Detección Sistemática de Combinaciones de Anticuerpos α-SNAP-25

Par de Anti-cuerpos No.	Anticuerpo de Captura	Anticuerpo de Detección	Detección de Producto de Escisión SNAP-25	Detección de Sustrato SNAP-25 No Escindido	Relación Señal/Ruido (10 nM/0 nM)
1	mAb de ratón 2E2A6	pAb de conejo S9684	Sí	No	26.6:1
2	mAb de ratón 2E2A6	pAb de cabra N-19	Sí	No	7.3:1
3	mAb de ratón 2E2A6	pAb de conejo H-50	Sí	No	0.9:1
4	mAb de ratón 3C1A5	pAb de conejo S9684	Sí	No	12.1:1
5	mAb de ratón 3C1A5	pAb de cabra N-19	Sí	No	1.9:1
6	mAb de ratón 3C1A5	pAb de conejo H-50	Sí	No	0.9:1
7	pAb de cabra C-18	pAb de conejo S9684	No	No	0.8:1
8	pAb de cabra C-18	pAb de cabra N-19	No	No	0.9:1
9	pAb de cabra C-18	pAb de conejo H-50	No	No	0.9:1
10	pAb de conejo H-50	mAb de ratón 2E2A6	Sí	No	0.9:1
11	pAb de conejo H-50	pAb de cabra C-18	No	No	1.0:1
12	pAb de cabra N-19	mAb de ratón 2E2A6	Sí	No	0.9:1
13	pAb de cabra N-19	pAb de cabra C-18	No	No	1.1:1
14	pAb de conejo NTP 23	pAb de cabra N-19	Sí	No	1.2:1
15	pAb de conejo NTP23	pAb de cabra C-18	No	No	1.1:1
16	pAb de conejo NTP 23	pAb de ratón SP12	Sí	No	1.3:1
17	pAb de conejo NTP 23	pAb de conejo H-50	Sí	No	1.1:1
18	pAb de conejo S9684	mAb de conejo 2E2A6	Sí	No	21.3:1
19	pAb de conejo S9684	pAb de cabra C-18	No	No	0.7:1
20	pAb de conejo S9684	mAb de ratón SMI-81	Sí	Sí	1.2:1
21	mAb de ratón SMI-81	pAb de conejo S9684	Sí	Sí	1.1:1
22	mAb de ratón SMI-81	pAb de cabra N-19	Sí	Sí	1.0:1
23	mAb de ratón	pAb de cabra C-18	No	No	0.8:1

	SMI-81				
24	pAb de ratón SP12	pAb de cabra C-18	No	No	1.0:1
25	mAb de ratón MC-6050	pAb de conejo S9684	Sí	Sí	5.0:1
26	mAb de ratón MC-6053	pAb de conejo S9684	Sí	Sí	7.1:1

3. *Optimización de las condiciones de diferenciación celular.*

[0193] Para determinar la condición de diferenciación óptima de una línea celular, que comprende células susceptibles a intoxicación BoNT/A, cuando se emplea un sistema de detección ELISA sándwich, se examinaron varios medios de cultivo celular y la duración del tiempo de diferenciación.

[0194] Para determinar un medio de diferenciación óptimo, una densidad apropiada de células de una línea celular se sembraron en los pozos de placas de cultivo celular de 24 pozos recubiertas con Colágeno IV que contenían 1 mL de uno de los siguientes medios y suplementos de diferenciación: 1) RPMI 1640, 10% suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomicina, 2 mM L-glutamina, y 25 µg/mL GT1b); 2) RPMI-1640, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, y 25 µg/mL GT1b; 3) Minimum Essential Medium, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, y 25 µg/mL GT1b; y 4) RPMI-1640, 10% BSA, 1 x suplemento N2, 1 x suplemento NGF, y 25 µg/mL GT1b. Las células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos estándar y rutinarios, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). El medio se aspiró de cada pozo y se reemplazó con medio fresco que contenía 0 (muestra no tratada), 0.2 pM, 2 pM, o 20 pM de un complejo BoNT/A. Luego de un tratamiento de un día para otro, las células se lavaron, se incubaron durante dos días más sin toxina, para permitir la escisión del sustrato SNAP-25, y se recolectaron como se describe anteriormente en Sección 1.Las concentraciones de proteína de todos los lisados celulares se midieron por análisis Bradford. La detección de la presencia de producto SNAP-25 escindido por análisis ELISA sándwich ECL se llevó a cabo como se describió anteriormente usando el Par de Anticuerpos 1. Como se discute en Ejemplo I, las células no diferenciadas no captaron toxina tan efectivamente como las células diferenciadas. El medio de diferenciación más efectivo para incrementar la captación de BoNT/A y, por

consiguiente, la escisión SNAP-25, fue el medio 3 (MEM+N2+B27), seguido por el medio 2 (RPMI-1640+N2+B27) y el medio 4 (RPMI-1640 +N2+NGF+BSA) (FIG. 3). Las células cultivadas en medio 2 resultaron en más escisión de la SNAP-25 comparado con otro medio.

[0195] Para determinar un tiempo de diferenciación óptimo, una densidad apropiada de células de una estirpe celular SiMa se sembraron en los pozos de placas de cultivo celular de 96 pozos recubiertos con poli-D-lisina, que contenían 100 µl de un medio libre de suero que contenía Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES y 25 µg/mL GT1b. Las células se sembraron en cuatro días diferentes para obtener un curso de pruebas de tiempo de diferenciación de 6 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas, y se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono. El medio se aspiró de cada pozo y se reemplazó con medio fresco que contenía 0 (muestra no tratada), 0.1 pM, 0.2 pM, 0.4 pM, 0.8 pM, 1.6 pM, 3.1 pM, 6.25 pM, 12.5 pM, o 25 pM de un complejo BoNT/A. Después de un tratamiento de un día para otro, las células se lavaron, se incubaron durante dos días más sin toxina, para permitir la escisión del sustrato SNAP-25, y se recolectaron como se describió anteriormente en Sección 1. Luego de recolectar, las concentraciones de proteína de los lisados celulares y la detección de la presencia de producto SNAP-25 escindido por análisis ELISA sándwich ECL se llevaron a cabo como se describió anteriormente. Los datos brutos obtenidos del ECL imager se transfirieron luego a un SigmaPlot v. 9.0, y se empleó un ajuste de logística de 4 parámetros para definir las curvas de respuesta a la dosis. No hubo empleo de restricciones para la función logística de 4 parámetros al graficar los datos. Se generaron informes gráficos usando el siguiente análisis: R2 (coeficiente de correlación), a (Max para el conjunto de dato), b (pendiente), y X0 ± SE (valor EC_{50} ± error estándar). Los resultados indicaron que valores EC_{50} de menos de 2 pM podrían alcanzarse con células diferenciadas durante 48-72 horas (FIG. 4). El descubrimiento de que las células diferenciadas podrían usarse entre 48 horas a 72 horas de diferenciación, sin cambios significativos en el desempeño de las células, destaca la robustez del análisis. Aunque períodos de tiempo de diferenciación de menos de 48 horas pueden no ser apropiados para pruebas picomolares de un producto formulado, estos menores tiempos de diferenciación son lo suficientemente sensibles para

pruebas de la sustancia farmacéutica no procesada.

4. *Optimización del tiempo de tratamiento BoNT/A.*

[0196] Para determinar la duración óptima del tiempo que las células que forman una línea celular necesitan para tratarse con una BoNT/A, se examinaron varias duraciones de tiempos de tratamiento BoNT/A. Una densidad apropiada de células de una línea celular SiMa se sembraron en los pozos de placas de cultivo celular de 96 pozos recubiertos con poli-D-lisina que contenían 100 µl de un medio libre de suero con contenido de Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES y 25 µg/mL GT1b. Las células se sembraron y se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos estándar y rutinarios, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). El medio se aspiró de cada pozo y se reemplazó con medio fresco que contenía 0 (muestra no tratada), 0.1 pM, 0.2 pM, 0.4 pM, 0.8 pM, 1.6 pM, 3.1 pM, 6.3 pM, 12.5 pM, o 25 pM de un complejo BoNT/A en medio de cultivo RPMI 1640 en triplicado, para generar una respuesta completa a la dosis. Se efectuaron cinco regímenes de duración del tratamiento BoNT/A: 1) un tratamiento BoNT/A de 6 horas, extracción y lavado de las células, una incubación de células durante 18 horas sin BoNT/A, y recolección de las células como se describió anteriormente en Sección1; 2) un tratamiento BoNT/A de 24 horas, extracción y lavado de las células, y recolección de las células como se describió anteriormente en Sección 1; 3) un tratamiento BoNT/A de 24 horas, extracción y lavado de células, una incubación de células durante 24 horas sin BoNT/A, y recolección de las células como se describió anteriormente en Sección1; 4) una incubación BoNT/A de 24 horas, extracción y lavado de las células, una incubación de células durante 48 horas sin BoNT/A, y recolección de células como se describió anteriormente en Sección 1; y 5) una incubación BoNT/A de 24 horas, extracción y lavado de células, una incubación de células durante 72 horas sin BoNT/A, y recolección de células como se describió anteriormente en Sección 1. Luego de la recolección, se llevaron a cabo las concentraciones de proteína de los lisados celulares, la detección del producto de escisión SNAP-25 por ELISA sándwich ECL, y se calculó la EC_{50} como se describió anteriormente. Los

resultados indican que valores EC_{50} de menos de 2 pM podían lograrse con cualquiera de los tratamientos BoNT/A examinados (FIG. 5). De un modo interesante, los regímenes de tratamiento BoNT/A de 24 horas + 24 horas, 24 horas + 48 horas, y 24 horas + 73 horas generaron esencialmente los mismos valores EC_{50}, 1.0 pM, 1.1, pM y 0.9 pM respectivamente. Los valores EC_{50} generados para los regímenes de tratamiento BoNT/A de 6 horas + 18 horas y 24 horas + 0 horas fueron 1.7 pM y 1.6 pM respectivamente. Aunque la magnitud de la señal obtenida fue menor, estos resultados indican que pueden usarse tiempos de tratamiento BoNT/A entre 6 horas a 24 horas más una incubación pos-tratamiento de tres días para generar una EC_{50}, que es adecuada para detectar actividad BoNT/A y dar flexibilidad en el curso de tiempo total del análisis.

5. *Sensibilidad de un método basado en inmunología de detectar actividad BoNT/A.*

[0197] Para evaluar la sensibilidad de los métodos, basados en inmunología, de detectar actividad BoNT/A, divulgados en la presente especificación, se determinó el momento oportuno de la captación de BoNT/A por células susceptibles a intoxicación BoNT/A. Una densidad apropiada de células de una línea celular SiMa se sembraron en los pozos de placas de cultivo celular de 96 pozos recubiertos con poli-D-lisina que contenían 100 µl de un medio libre de suero con contenido de Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES y 20 µg/mL GT1b. Las células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos estándar y rutinarios, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). El medio se aspiró de cada pozo, se reemplazó con medio fresco que contenía 1 nM de un complejo BoNT/A, y las células tratadas con BoNT/A se incubaron en seis diferentes puntos de tiempo de 0 minutos (se agregó neurotoxina y luego se extrajo inmediatamente), 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos y 60 minutos. Se utilizó un control negativo de medio sin BoNT/A (0 nM). Luego de la incubación, las células se lavaron y se recolectaron como se describió anteriormente en Sección 1. Después de la recolección, se realizaron las concentraciones de proteína de los lisados celulares, detección del producto de escisión SNAP-25 por

ELISA sándwich ECL, y se calculó la EC_{50} como se describió anteriormente. Los resultados indicaron que la captación de BoNT/A por las células tomó menos de un minuto antes de producir cantidades significativas de producto de escisión SNAP-25 sobre el fondo (FIG. 6).

6. *Especificidad de un método basado en inmunología de detectar actividad BoNT/A.*

[0198] Para evaluar la especificidad de los métodos, basados en inmunología, de detectar actividad BoNT/A divulgados en la presente especificación, se determinó la capacidad de las células susceptibles a intoxicación BoNT/A de distinguir BoNT/A con precisión frente a la exclusión de BoNT/A inactivado parcialmente. Una densidad apropiada de células de una línea celular SiMa se sembraron en los pozos de placas de cultivo celular de 96 pozos recubiertos con poli-D-lisina que contenían 100 µl de un medio libre de suero con contenido de Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES y 25 µg/mL GT1b. Las células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos estándar y rutinarios, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). El medio se aspiró de cada pozo y se reemplazó con medio fresco que contenía 1) 0 (muestra no tratada), 0.03 pM, 0.1 pM, 0.31 pM, 0.93 pM, 2.78 pM, 8.33 pM y 25 pM, de un complejo BoNT/A; 2) 0, 0.14 nM, 0.41 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.11 nM, 33.33 nM y 100 nM de una BoNT/A inactiva (iBoNT/A); o 3) 0, 0.14 nM, 0.41 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.11 nM, 33.33 nM y 100 nM de un fragmento LH_N/A. La iBoNT/A contiene una mutación en el dominio de unión zinc de la cadena ligera, que inactiva completamente la actividad metaloproteasa de la neurotoxina, véase, *por ej.*, Liqing Zhou, et al., *Expression and Purification of the Light Chain of Botulinum Neurotoxin A: A Single Mutation Abolishes its Cleavage of SNAP-25 and Neurotoxicity after Reconstitution with the Heavy Chain,* Biochemistry 34: 15175-15181 (1995), que se incorpora por este medio por referencia en su totalidad. El fragmento LH_N/A carece del dominio de unión, pero contiene un dominio de traslocación intacto y cadena ligera, véase, *por ej.*, Clifford C. Shone, et al., *Recombinant Toxin Fragments,* Patente de los Estados Unidos 6,461,617, que se incorpora por este medio por referencia en su

totalidad. Luego de un tratamiento de 24 horas, las células se lavaron, se incubaron durante dos días más sin toxina, para permitir la escisión del sustrato SNAP-25, y se recolectaron como se describió anteriormente en Sección 1. Luego de la recolección, se llevaron a cabo las concentraciones de proteína de los lisados celulares, la detección del producto de escisión SNAP-25 por ELISA sándwich ECL, y se calculó la EC_{50} como se describió anteriormente. Los resultados indican que la afinidad de unión de células para iBoNT/A y LH_N/A (EC_{50} > 100 nM) son por lo menos 60.000 más bajas que la afinidad de unión para BoNT/A (EC_{50}= 1.6 pM) (FIG. 7). No se detectó producto de escisión SNAP-25 en células tratadas con iBoNT/A en todas las concentraciones analizadas. Aunque se detectó una baja cantidad de producto de escisión SNAP-25 en células tratadas con la dosis máxima de fragmento LH_N/A, esta actividad se debe a la captación no específica de este fragmento, debido a la actividad del dominio de traslocación. Por consiguiente, los resultados indican que los métodos, basados en inmunología, de detectar actividad BoNT/A, divulgados en la presente especificación, pueden medir todos los pasos involucrados en el proceso de intoxicación por los cuales una BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato SNAP-25, y abarca la unión de una BoNT/A a un receptor BoNT/A, la internalización del complejo neurotoxina/receptor, la traslocación de la cadena ligera BoNT/A de una vesícula intracelular en el citoplasma y la escisión proteolítica de una SNAP-25.

Ejemplo VI

Un Método Basado en Inmunología de Detectar Actividad BoNT/A Usando ELISA Sándwich ECL

[0199] El siguiente ejemplo ilustra métodos, basados en inmunología, de detectar actividad BoNT/A detectando un producto de escisión SNAP-25 usando un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 específico para un producto de escisión SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A usando ELISA sándwich ECL.

[0200] Para preparar un lisado de células tratadas con una BoNT/A, una densidad apropiada de células de una línea celular establecida se sembraron en los pozos de placas de cultivo de tejido de 96 pozos que contenían 100 µL de un medio libre

de suero con contenido de Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES y 25 µg/mL GT1b (véase Ejemplos I y II). Estas células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos estándar y rutinarios, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). Se aspiró el medio de las células diferenciadas de cada pozo y se reemplazó con medio fresco que contenía 0 (muestra no tratada), 0.03 pM, 0.1 pM, 0.3 pM, 0.9 pM, 2.8 pM, 8.3 pM y 25 pM de un complejo BoNT/A. Después de un tratamiento de 24 horas, las células se lavaron y se incubaron durante dos días más sin toxina. Las células se recolectaron como se describe en Ejemplo V.

[0201] Para preparar una solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25, se purificó el anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 contenido en el fluido ascítico de la línea celular de hibridoma 2E2A6, usando un protocolo de purificación de Proteína A estándar. Para preparar una solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25, un anticuerpo policlonal de conejo α-SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) se conjugó a un reactivo de marcación rutenio(II)-tris-bipiridina-(4-metilulfonato) NHS éster (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación, la purificación del anticuerpo α-SNAP-25 marcado, la determinación de la concentración y almacenamiento fueron como se describe en Ejemplo V.

[0202] Para preparar el soporte de fase sólida, que comprende el anticuerpo de captura que es específico para un producto escindido SNAP-25, se agregaron aproximadamente 5 µl de solución de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 2E2A6 (20 µg/mL en 1 x PBS) a cada pozo de una placa MSD High Bind de 96 pozos, y la solución se dejó secar al aire en un gabinete de seguridad biológica durante 2-3 horas, con el fin de evaporar el líquido de la solución. Los pozos ligados al anticuerpo de captura se bloquearon entonces y se usaron directamente para detectar la actividad BoNT/A.

[0203] Para detectar la presencia de un producto SNAP-25 escindido por análisis ELISA sándwich ECL, se aspiró la solución amortiguadora de bloqueo de las

placas almacenadas de los pozos, se agregaron 25 µl de un lisado de células tratadas con BoNT/A a cada pozo, y las placas se incubaron a 4°C de un día para otro. Los pozos de las placas se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pozo tres veces con 200 µl 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Después de lavar, se agregaron a cada pozo 25 µl de solución de anticuerpo de detección con 5 µg/mL que contenía 2% de solución amortiguadora de bloqueo Amersham en 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato), se selló la placa, y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Luego de la incubación del anticuerpo de detección, los pozos se lavaron tres veces con 200 µl 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Después de lavar, se agregaron 150 µl de 1 x solución amortiguadora de lectura (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pozo, y se leyeron las placas usando un lector de imágenes SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Los datos recolectados se analizaron y se calculó la EC_{50}, como se describe en Ejemplo V. Un resultado representativo se muestra en FIG. 8. Estos resultados indicaron que, en promedio, 1.0 pM de BoNT/A en la EC_{50} se detectó (un intervalo de alrededor de 0.3 pM a alrededor de 2.0 pM) con una relación señal/ruido para la asíntota inferior de alrededor de 15:1 a alrededor de 20:1 y una relación señal/ruido para la asíntota superior de alrededor de 20:1 a alrededor de 500:1.

Ejemplo VII

Un Método Basado en Inmunología de Detectar Actividad BoNT/A Usando ELISA Sándwich CL

[0204] El siguiente ejemplo ilustra métodos, basados en inmunología, de detectar actividad BoNT/A, detectando un producto de escisión SNAP-25, usando un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 específico para una SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, por ELISA Sándwich CL.

[0205] El lisado de células tratadas con una BoNT/A y la solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25 se prepararon como se describe en Ejemplo VI.

[0206] Para preparar una solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25, un anticuerpo policlonal α-SNAP-25 S9684 (Sigma, St. Louis, MO) se conjugó a peroxidasa de rábano (HRP), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). La reacción de conjugación se realizó agregando a 500 µl de 1 mg/mL de anticuerpos policlonales α-SNAP-25 a un frasquito que contenía peroxidasa activada liofilizada, mezclando los componentes y luego agregando 10 µl de cianoborohidruro de sodio. Esta mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en una campana de humo. Luego de extinguir la reacción, los anticuerpos marcados se purificaron usando un protocolo de columna de centrifugación estándar, y la concentración de la proteína se determinó empleando un análisis de proteína colorimétrico estándar. La absorbencia del conjugado anticuerpo policlonal α-SNAP-25/HRP se midió a 455 nm usando un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 se almacenó a 4°C hasta que se necesitara.

[0207] Para preparar el soporte de fase sólida que contiene el anticuerpo de captura α-SNAP-25, que es específico para el producto escindido SNAP-25, aproximadamente 100 µl de solución de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 2E2A6 (1 mg/mL en 1 x PBS) se agregaron a cada pozo de una placa blanca Greiner de 96 pozos, y las placas se incubaron a 4°C de un día para otro, y luego se descartó cualquier exceso de solución de anticuerpo. Los pozos ligados con anticuerpo de captura se bloquearon entonces agregando 150 µl de solución amortiguadora de bloqueo que contenía 2% de reactivo de bloqueo Amersham (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y 10% de suero de cabra (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución amortiguadora de bloqueo se descartó y las placas se secaron sobre toallas de papel invirtiéndolas y golpeándolas suavemente. Los pozos ligados con anticuerpo de captura se bloquearon entonces y se usaron directamente para detectar actividad BoNT/A.

[0208] Para detectar la presencia de un producto SNAP-25 escindido por análisis ELISA sándwich CL, 50 µl de un lisado de células tratadas con BoNT/A se agregaron a cada pozo, se selló la placa, y la placa sellada se incubó en un agitador que giraba a 500 rpm a 4°C durante 2-4 horas hasta un día para otro. Los pozos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando

cada pozo tres veces con 200 µl 1 x PBS, 0.05 % TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Luego de lavar, se agregaron a cada pozo 100 µl de 1 mg/mL de solución de anticuerpo de detección anticuerpo policlonal α-SNAP-25/HRP, que contenía 2% de reactivo de bloqueo Amersham en 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato), se selló la placa, y la placa sellada se incubó en un agitador que giraba a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de la incubación del anticuerpo de detección, los pozos se lavaron tres veces con 200 µl 1 x PBS, 0.05% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Luego de lavar, se agregaron 100 µl de una mezcla 1:1 SuperSignal ELISA Pico (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a cada pozo y las placas se leyeron usando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Los datos recolectados se analizaron y se calculó la EC_{50}, como se describe en Ejemplo V. Estos resultados indicaron que, en promedio, se detectó 1.0 pM de BoNT/A con la EC_{50} (un intervalo de alrededor de 0.3 pM a alrededor de 2.0 pM) con una relación señal/ruido para la asíntota inferior de alrededor de 15:1 a alrededor de 20:1 y una relación señal/ruido para la asíntota superior de alrededor de 20:1 a alrededor de 500:1.

Ejemplo VIII

Un Método Basado en Inmunología de Detectar Actividad BoNT/A Usando ELISA Sándwich ECL Multiplex

[0209] El siguiente ejemplo ilustra métodos multiplex, basados en inmunología, de detectar actividad BoNT/A detectando un producto de escisión SNAP-25, usando un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 específico para un producto de escisión SNAP-25 y un segundo par de anticuerpos para una proteína diferente.

1. Preparación e identificación del par anticuerpo de captura-anticuerpo de detección para una segunda proteína.

[0210] Para obtener para análisis un lisado de células no tratadas, una densidad apropiada de células de un cultivo madre de células SiMa se sembraron en un matraz T175 que contenía 40 mL de un medio de cultivo con contenido de 1X RPMI 1640, 10% FBS, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio y 100 U/100 µg de penicilina-estreptomicina. Estas células se

incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células fueron aproximadamente 70-90% confluentes. Las células se lavaron y se recolectaron lisando en solución amortiguadora de lisis Triton X-100 recién preparada (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM cloruro de sodio, 0.001 M EDTA, 1 mM EGTA y 1% Triton-X-100) a 4°C durante aproximadamente 30 minutos con agitación constante. Las células lisadas se centrifugaron a aproximadamente 3300-3330 x g durante 40 minutos a 8°C para eliminar residuos usando una centrífuga *bench-top*.

[0211] Para identificar un par apropiado de anticuerpo de captura-anticuerpo de detección para una segunda proteína, se condujo un análisis ELISA sándwich ECL en 21 combinaciones diferentes de pares de anticuerpos de captura y detección compuestas de cinco diferentes proteínas (Tabla 13). Los anticuerpos empleados fueron el anticuerpo monoclonal de ratón α-sintaxina 1A-HPC S0664 (Sigma, St. Louis, MO), el anticuerpo monoclonal de ratón α-GAPDH MAB374 (Chemicon, Temecula, CA), el anticuerpo policlonal de conejo α-sintaxina 1 S1172-1 (Sigma, St. Louis, MO), el anticuerpo policlonal de conejo α-GAPDH 2275-PC-1 (R & D Systems, Minneapolis, MN), el anticuerpo policlonal de conejo α-sintaxina 2 S5687 (Sigma, St. Louis, MO), el anticuerpo monoclonal de ratón α-sintaxina 2 humana MAB2936 (R & D Systems, Minneapolis, MN), el anticuerpo policlonal de cabra α-sintaxina de ratón AF2568 (Sigma, St. Louis, MO), el anticuerpo policlonal de conejo α-sintaxina 2 AB5596 (Sigma, St. Louis, MO), el anticuerpo policlonal de conejo α-sintaxina 1 S1172-2 (Sigma, St. Louis, MO), el anticuerpo policlonal de oveja α-h, m, r actina AF4000 (R & D Systems, Minneapolis, MN), el anticuerpo monoclonal de ratón α-beta actina A1978 (Sigma, St. Louis, MO), el anticuerpo policlonal de ratón α-beta actina A2228 (Sigma, St. Louis, MO), el anticuerpo monoclonal de ratón α-GAPDH de ratón G8795 (Sigma, St. Louis, MO), el anticuerpo policlonal de conejo α-GAPDH G9595 (Sigma, St. Louis, MO).

[0212] Para preparar la solución de anticuerpo de captura de la segunda proteína, los anticuerpos monoclonales se adquirieron como anticuerpos purificados. Para preparar la solución de anticuerpo de detección de la segunda proteína, el anticuerpo apropiado se conjugó a reactivo de marcación rutenio(II)-tris-bipiridina-(4-metilsulfonato) NHS éster (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg,

MD). La reacción de conjugación se llevó a cabo agregando 30 µl de solución patrón concentrada MSD SULFO-TAG™ reconstituida con agua destilada a 200 µl de 2 mg/mL de anticuerpos policlonales e incubando la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Los anticuerpos marcados se purificaron usando un protocolo de columna de centrifugación estándar, y se determinó la concentración de la proteína usando un análisis de proteína colorimétrico estándar. La absorbencia del conjugado anticuerpo/MSD SULFO-TAG™ se midió a 455 nm usando un espectrofotómetro para determinar la concentración en moles por litro. La solución de anticuerpo de detección se almacenó a 4°C hasta que se utilizara.

[0213] Para preparar el soporte de fase sólida que comprende el anticuerpo de captura que es específico para un producto escindido SNAP-25, aproximadamente 5 µl de solución de anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 2E2A6 (20 µg/mL en 1 x PBS) se agregaron a cada pozo de una placa MSD High Bind de 96 pozos, y se dejó secar al aire la solución en un gabinete de seguridad biológica durante 2-3 horas, con el fin de evaporar el líquido de la solución y, a continuación, las placas se sellaron y se almacenaron a 4°C hasta que se necesitaron. Los pozos ligados a anticuerpo de captura secados se bloquearon entonces agregando 150 µl de solución amortiguadora de bloqueo compuesta por 3% BSA (Pierce, Rockford, IL), 10% suero de cabra (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) y Difco 1% leche descremada (BD BioSciences Franklin Lakes, NJ) en 0.05% Tween-20 PBS a temperatura ambiente durante 1-2 horas.

[0214] Para detectar la presencia de proteína por análisis ELISA sándwich ECL, se aspiró de los pozos la solución amortiguadora de bloqueo de las placas almacenadas, se agregaron a cada pozo 25 µl de un lisado de células tratadas con BoNT/A, como se describió anteriormente, y las placas se incubaron a 4°C de un día para otro. Los pozos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pozo tres veces con 200 µl 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Luego de lavar, se agregaron a cada pozo 25 µl de 5 µg/mL de solución de anticuerpo apropiada para detección de la segunda proteína, resuspendida en la solución amortiguadora de bloqueo, como se describió anteriormente, la placa se selló, y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante alrededor de 1 hora con agitación. Luego de la

incubación del anticuerpo de detección, los pozos se lavaron tres veces con 250 µl 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Después de lavar se agregaron 150 µl de 1 x solución amortiguadora de lectura (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pozo, y las placas se leyeron usando un lector de imagen SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se calculó una relación dividiendo la señal obtenida de los lisados de células no tratadas para cada par de anticuerpos por la señal obtenida para el control de solución amortiguadora de lisis (dosis 0 nM) para cada par de anticuerpos (Tabla 13). Estos resultados indicaron que entre las veintiún combinaciones diferentes de pares de anticuerpos analizados, únicamente dos pares de anticuerpos tuvieron relaciones señal/ruido por encima de 10:1 para la dosis máxima examinada: Par No. 16 anticuerpo monoclonal de ratón α-GAPDH MAB374 y anticuerpo policlonal de conejo α-GAPDH RDS2275-PC-1; y Par 21: anticuerpo monoclonal de ratón α-GAPDH MAB374 y anticuerpo policlonal de conejo α-GAPDH G9545. El par anticuerpo monoclonal de ratón α-GAPDH MAB374 y anticuerpo policlonal de conejo α-GAPDH G9545 se seleccionó como el par anticuerpo de captura-anticuerpo de detección de la segunda proteína para el ELISA sándwich ECL multiplex.

Tabla 13. Detección Sistemática de Combinaciones de Anticuerpos de Segunda Proteína

Par de Anti-cuerpos No.	Anticuerpo de Captura	Anticuerpo de Detección	Detección de Proteína	Relación Señal/Ruido (lisado/ solución amortiguadora)
1	α-sintaxina 2 S5687 pAb	α-sintaxina 2 MAB2936 mAb	No	0.92
2	α-sintaxina 2 AF2568 pAb	α-sintaxina 2 AB5596 pAb	No	1.1
3	α-sintaxina 2 AF2568	α-sintaxina 2 S5687 pAb	No	1.11
4	α-sintaxina 2 AF2936 pAb	α-sintaxina 2 AB5596 pAb	Sí	1.63
5	α-sintaxina 2 AF2936 pAb	α-sintaxina 2 S5687 pAb	Sí	1.6
6	α-sintaxina 2 AB5596 pAb	α-sintaxina 2 S5687 pAb	No	0.82
7	α-sintaxina 2 AB5596 pAb	α-sintaxina 2 MAB2936 mAb	No	0.87
8	α-sintaxina 2 MAB2936 mAb	α-sintaxina 2 AB5596 pAb	Sí	1.2
9	α-sintaxina 2 MAB2936 mAb	α-sintaxina 2 S5687 pAb	No	1.07

10	α-sintaxina S0664 mAb	α-sintaxina 1 S1172-1 pAb	Sí	4.23
11	α-sintaxina S0664 mAb	α-sintaxina 1 S1172-2 pAb	No	1.21
12	α-sintaxina 1 S1172-1 pAb	α-sintaxina S0664 mAb	Sí	5.5
13	α-sintaxina 1 S1172-2 pAb	α-sintaxina S0664 mAb	Sí	2.5
14	α-h,m,r actina AF4000 pAb	α-beta actina A1978 mAb	No	1.04
15	α-h,m,r actina AF4000 pAb	α-beta actina A2228 mAb	No	1.08
16	α-GAPDH MAB374 mAb	α-GAPDH 2275-PC-1 pAb	Sí	20.04
17	α-GAPDH MAB374 mAb	α-GAPDH G8795 mAb	No	0.89
18	α-GAPDH 2275-PC-1 pAb	α-GAPDH MAB374 mAb	No	1.08
19	α-GAPDH 2275-PC-1 pAb	α-GAPDH G8795 mAb	Sí	1.27
20	α-GAPDH G8795 mAb	α-GAPDH 2275-PC-1 pAb	Sí	2.74
21	α-GAPDH MAB374 mAb	α-GAPDH G9545 pAb	Sí	>100

2. Un método basado en inmunología de detectar actividad BoNT/A usando ELISA sándwich ECL multiplex.

[0215] Para obtener un lisado de células tratadas con BoNT/A para análisis, una densidad apropiada de células de un cultivo madre de una línea celular SiMa se sembraron en una placa de 96 pozos de poli-D-lisina que contenía un medio libre de suero con contenido Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES. Estas células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos estándar y rutinarios, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). El medio se aspiró de cada pozo y se reemplazó con medio fresco que contenía 0 (muestra no tratada), 0.67 U/mL, 2.35 U/mL, 8.23 U/mL, 28.82 U/mL, 101 U/mL, 353 U/mL de un complejo BoNT/A. Luego de un tratamiento de 24 horas, las células se lavaron, se incubaron durante dos días más sin toxina. Las células se lavaron, se recolectaron y se procesaron como se describió anteriormente en Sección 1.

[0216] La solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25 y la solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 se prepararon como se describe en Ejemplo VII. Para preparar una solución de anticuerpo de captura α-GAPDH, se preparó el

anticuerpo monoclonal de ratón α-GAPDH MAB374 (Chemicon, Temecula, CA), como se describe en Sección 1 más arriba. Para preparar una solución de anticuerpo de detección α-GAPDH, un anticuerpo policlonal de conejo α-GAPDH G9545 (Sigma, St. Louis, MO) se conjugó a reactivo de marcación rutenio(II)-tris-bipiridina-(4-metilsulfonato) NHS éster (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). La reacción de conjugación, la purificación de anticuerpo α-SNAP-25 marcado, la determinación de la concentración y el almacenamiento fueron como se describe en Sección 1 más arriba.

[0217] Para preparar el soporte de base sólida que comprende el anticuerpo de captura α-SNAP-25 y el anticuerpo de captura α-GAPDH, aproximadamente 2.5 nL de la solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25 (45 µg/mL en 1 x PBS) y 2.5 nL de la solución del anticuerpo de captura α-GAPDH (120 µg/mL en 1 x PBS) se agregaron a cada pozo de una placa MSD High Bind de 96 pozos en un formato muliplex, usando un sistema robótico. La solución se dejó secar al aire en un gabinete de seguridad biológica durante por lo menos 2-3 horas, con el fin de evaporar a líquido la solución. Los pozos ligados al anticuerpo de captura se bloquearon entonces y se usaron directamente para detectar actividad BoNT/A y la proteína GAPDH.

[0218] Para detectar la presencia del producto de escisión SNAP-25 por análisis ELISA sándwich ECL multiplex, se aspiró de los pozos la solución amortiguadora de bloqueo de las placas, se agregaron 25 µL de un lisado de células tratadas con BoNT/A, como se describió anteriormente, a cada pozo y las placas se incubaron a 4°C de un día para otro. Los pozos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pozo tres veces con 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Luego de lavar, se agregaron a cada pozo 25 µL de 5 µg/mL de solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 y 25 µL de 5 µg/mL de solución de anticuerpo de detección α-GAPDH, como se describió anteriormente, la placa se selló, y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante alrededor de 1 hora con agitación. Luego de la incubación del anticuerpo de detección, los pozos se lavaron tres veces con 250 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Después de lavar se agregaron 150 µL de 1 x solución amortiguadora de lectura

(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pozo, y las placas se leyeron usando un lector de imagen SECTOR™ Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se analizaron los datos recolectados, y se calculó la potencia relativa a partir de los datos normalizados, como se describe en Ejemplo V, excepto que se empleó software PLA 2.0 (Stegmann Systems, GmbH, Alemania).

[0219] Como una comparación, se llevó a cabo asimismo la detección del producto de escisión SNAP-25 usando el ELISA sándwich ECL singleplex, como se describe en Ejemplo VI.

[0220] Los resultados indicaron que los datos obtenidos SNAP-25 del ELISA sándwich ECL singleplex, o a partir de los datos SNAP-25 no normalizados obtenidos del ELISA sándwich ECL multiplex, revelaron un dosis de muestra atípica, que no ajustó en la curva dosis-respuesta. No obstante, la normalización de los datos SNAP-25 contra los datos GAPDH arrojó un mejor ajuste de la curva, y la potencia fue más cercana al valor esperado.

Ejemplo IX
Un Método Basado en Inmunología de Detectar Actividad BoNT/A Usando ELISA Sándwich EC Multiplex

[0221] El siguiente ejemplo ilustra métodos basados en inmunología, multiplex, de detectar actividad BoNT/A detectando un producto de escisión SNAP-25, usando un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 específico para un producto de escisión SNAP-25, y un segundo par de anticuerpos para una proteína diferente.

[0222] El lisado de células tratadas con una BoNT/A se preparó como se describe en Ejemplo VI. La solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25, la solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 y el soporte de base sólida α-SNAP-25 se prepararon como se describe en Ejemplo VII.

[0223] Para preparar una solución de anticuerpo de captura α-GAPDH, se adquirió un anticuerpo monoclonal α-GAPDH MAB374 (Millipore, Billerica, MA), como anticuerpo purificado. Para preparar una solución de anticuerpo de detección α-GAPDH, un anticuerpo policlonal α-GAPDH G9545 (Sigma, St. Louis, MO) se

conjugó a peroxidasa de rábano (HRP), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). La reacción de conjugación, la determinación de la concentración y el almacenamiento fueron como se describe en Ejemplo VII.

[0224] Para preparar el soporte de base sólida que comprende un segundo anticuerpo de captura específico para la segunda proteína, aproximadamente 100 µL de solución de anticuerpo monoclonal, que comprendía 1 µg/mL anticuerpo monoclonal α-GAPDH MAB374, se agregaron a cada pozo de una placa blanca Greiner de 96 pozos, y las placas se incubaron a 4°C de un día para otro, y luego se descartó cualquier exceso de solución de anticuerpo. Los pozos ligados al anticuerpo de captura α-GAPDH se bloquearon entonces agregando 150 µL de solución amortiguadora de bloqueo, que contenía 2% reactivo de bloqueo Amersham (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y 10% suero de cabra (VWR, West Chester, PA) a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución amortiguadora de bloqueo se descartó, y las placas se secaron sobre toallas de papel invirtiéndolas y golpeándolas suavemente. Los pozos ligados con anticuerpo de captura se bloquearon entonces y se usaron directamente para detectar actividad BoNT/A.

[0225] Para detectar la presencia de un producto SNAP-25 escindido por análisis ELISA sándwich CL multiplex, 50 µl de lisados de células tratadas con BoNT/A se agregaron a cada pozo del soporte de base sólida del anticuerpo de captura α-SNAP-25 y el soporte de fase sólida del anticuerpo de captura α-GAPDH, se selló la placa, y la placa sellada se incubó en un agitador que giraba a 500 rpm a 4°C durante 2-4 horas hasta un día para otro. Los pozos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado celular y enjuagando cada pozo tres veces con 200 µl 1 x PBS, 0.05 % TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Luego de lavar, 100 µl de solución de anticuerpo de detección que contenía 2% de reactivo de bloqueo Amersham en 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato) y 1 mg/mL anticuerpo policlonal α-SNAP-25/HRP, se agregó a cada pozo del soporte de fase sólida del anticuerpo de captura α-SNAP-25, se selló la placa, y la placa sellada se incubó en un agitador que giraba a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Análogamente, 100 µL de una solución de anticuerpo de detección, que contenía 2% de reactivo de bloqueo Amersham en 1

x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato) y 0.25 mg/mL de anticuerpo polyclonal α-GAPDH G9545/HRP (Sigma Co., St Louis, MO), se agregaron a cada pozo del soporte de fase sólida de anticuerpo de captura α-GAPDH, la placa se selló, y la placa sellada se puso en un agitador que giraba a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de la incubación del anticuerpo de detección, los pozos se lavaron tres veces con 200 µl 1 x PBS, 0.05% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Luego de lavar, se agregaron 100 µl de una mezcla 1:1 SuperSignal ELISA Pico (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a cada pozo, y las placas se leyeron usando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Los datos recolectados se analizaron, y se calculó la EC_{50}, como se describe en Ejemplo V. Los resultados indicaron que los puntos de datos recolectados para las cantidades del complejo anticuerpo α-SNAP-25–antígeno detectadas tuvieron un mejor ajuste luego de la normalización a las cantidades de complejo anticuerpo α-GAPDH–antígeno detectadas, produciendo en esa forma una lectura más exacta. Estos resultados indicaron que, en promedio, se detectó 1.0 pM de BoNT/A con la EC_{50} (un intervalo de alrededor de 0.3 pM a alrededor de 2.0 pM) con una relación señal/ruido para la asíntota inferior de alrededor de 15:1 a alrededor de 20:1 y una relación señal/ruido para la asíntota superior de alrededor de 20:1 a alrededor de 500:1.

[0226] Un diseño similar puede emplearse para métodos basados en inmunología, multiplex, de detectar actividad BoNT/A, detectando un producto de escisión SNAP-25, usando un anticuerpo monoclonal α-SNAP-25 específico para un producto de escisión SNAP-25, que tiene un término carboxilo en el residuo P_1 del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A, usando ELISA sándwich ECL con el mismo par de anticuerpos α-GAPDH.

Ejemplo X
Método Basado en Inmunología para Detectar Cantidades Picomolares de BoNT/A

[0227] El siguiente ejemplo ilustra cómo llevar a cabo métodos basados en inmunología de detectar actividad BoNT/A, que pueden detectar cantidades picomolares del producto farmacéutico BoNT/A, tales como, *por ej.*, BOTOX®

DYSPORT®/RELOXIN®, PURTOX®, XEOMIN®, NEURONOX® o BTX-A.

1. Método basado en inmunología de detectar BoNT/A usando ELISA sándwich ECL.

[0228] Para preparar un lisado de células tratadas con una BoNT/A, aproximadamente 50.000 a 150.000 células de una línea celular establecida se sembraron en los pozos de placas de cultivo de poli-D-lisina de 96 pozos que contenían 100 µL de un medio libre de suero con contenido Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I con sales de Earle, 1 x suplemento B27, 1 x suplemento N2, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10 mM HEPES y 25 µg/mL GT1b (véase Ejemplos I y II). Estas células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos estándar y rutinarios, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 2 a 3 días). Se aspiró el medio de las células diferenciadas de cada pozo y se reemplazó con medio fresco que contenía 0 (muestra no tratada), 0.03 pM, 0.1 pM, 0.3 pM, 0.9 pM, 2.8 pM, 8.3 pM o 25 pM de un producto farmacéutico BoNT/A, reconstituido en una solución libre de cloruro de sodio; o 0 (muestra no tratada), 0.7 U/mL, 2.1 U/mL, 6.2 U/mL, 18.5 U/mL, 55.6 U/mL, 166.7 U/mL o 500 U/mL de un producto farmacéutico BoNT/A, reconstituido en un medio libre de cloruro de sodio. Debido a que el producto farmacéutico BoNT/A contiene cloruro de sodio, su adición al medio de cultivo resultó en un medio hipertónico, que era perjudicial para la viabilidad de las células. Para superar el problema de la hipertonicidad, 200 µL de medio MEM preparado sin cloruro de sodio se emplearon para reconstituir el producto farmacéutico BoNT/A, dando una concentración final de 25 pM BoNT/A (500 U/mL). La matriz se mantuvo constante para todas las concentraciones a lo largo de la curva de respuesta a la dosis, agregando cloruro de sodio al medio empleado para hacer que las diluciones equivalieran a la cantidad de excipientes presentes en la concentración máxima utilizada (25 pM o 500 U/mL). Luego de un tratamiento de 24 horas, las células se lavaron y se incubaron durante dos días más sin toxina. Para recolectar las células, el medio se aspiró, se lavó con 1 x PBS y se lisó agregando 30 µL de solución amortiguadora de lisis, que contenía 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, a cada pozo, y la placa se incubó en un agitador que giraba a 500 rpm durante 30

minutos a 4°C. La placa se centrifugó a 4.000 rpm durante 20 minutos a 4°C para sedimentar los residuos celulares, y el sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pozos recubierta con anticuerpo de captura para realizar el paso de detección.

[0229] La solución del anticuerpo de captura α-SNAP-25, la solución del anticuerpo de detección α-SNAP-25 y el soporte de fase sólida que contenía el anticuerpo de captura, que es específico para un producto escindido SNAP-25, se prepararon como se describe en Ejemplo VI.

[0230] Para detectar por análisis ELISA sándwich ECL la presencia de un producto SNAP-25 escindido, se aspiró la solución amortiguadora de bloqueo de las placas almacenadas, se agregaron 25 µL de un lisado de células tratadas con BoNT/A a cada pozo, y las placas se incubaron a 4°C durante 2 horas o 24 horas. Los pozos de las placas se lavaron tres veces aspirando el lisado de las células y enjuagando cada pozo tres veces con 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Después de lavar, 25 µL de 5 µg/mL de solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25, que contenía 2% de reactivo de bloqueo Amersham en 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato), se agregaron a cada pozo, se selló la placa, y la placa sellada se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Luego de la incubación del anticuerpo de detección α-SNAP-25, los pozos se lavaron tres veces con 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Después de lavar, las placas se procesaron, se analizaron los datos recolectados, y se calculó la EC_{50} como se describe en Ejemplo V. Estos resultados indicaron que, en promedio, se detectó 1.0 pM de BoNT/A con la EC_{50} (un intervalo de alrededor de 0.3 pM a alrededor de 2.0 pM), con una relación señal/ruido para la asíntota inferior de alrededor de 15:1 a alrededor de 20:1 y una relación señal/ruido para la asíntota superior de alrededor de 20:1 a alrededor de 500:1 (FIG. 9). Este método puede llevarse igualmente a cabo en una forma multiplex, como se describe en Ejemplo VIM.

2. Método basado en inmunología de detectar BoNT/A empleando ELISA sándwich CL.

[0231] El lisado de células tratadas con una BoNT/A y la solución del anticuerpo

de captura α-SNAP-25 se prepararon como se describe en Ejemplo VI. La solución del anticuerpo de detección α-SNAP-25 y el soporte de fase sólida, que comprendía el anticuerpo de captura que es específico para un producto escindido SNAP-25, se preparará como se describe en Ejemplo VII.

[0232] Para detectar por análisis ELISA sándwich CL la presencia de un producto SNAP-25 escindido, 25 µL de un lisado de células tratadas con BoNT/A se agregaron a cada pozo, la placa se selló, y la placa sellada se incubó en un agitador que giraba a 500 rpm a 4°C durante 2 horas o 24 horas. Los pozos de la placa se lavaron tres veces aspirando el lisado de las células y enjuagando cada pozo tres veces con 200 µL 1 x PBS, 0.05 % TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Después de lavar, 100 µL de 1 mg/mL o anticuerpo policlonal SNAP-25/solución de anticuerpo de detección HRP, que contenía 2% de reactivo de bloqueo Amersham en 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato), se agregaron a cada pozo, la placa se selló, y la placa sellada se incubó en un agitador que giraba a 650 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de la incubación del anticuerpo de detección, los pozos se lavaron tres veces con 200 µL 1 x PBS, 0.05% TWEEN-20® (polioxietilen (20) sorbitán monolaureato). Luego de lavar, 100 µL de mezcla 1:1 SuperSignal ELISA Pico (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) se agregó a cada pozo y las placas se leyeron usando un luminómetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 395 nm. Los datos recolectados se analizaron y se calculó la EC_{50}, como se describe en Ejemplo V. Este método puede llevarse igualmente a cabo en una forma multiplex, como se describe en Ejemplo VIII.

Ejemplo XI
Método Basado en Inmunología para Detectar Anticuerpos α-BoNT/A Neutralizantes

[0233] El siguiente ejemplo ilustra cómo realizar un método basado en inmunología que puede detectar la presencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes.

[0234] BoNT/A se utiliza actualmente para una amplia gama de indicaciones médicas, incluyendo hiperactividad muscular, oftalmológicas, gastrointestinales,

urológicas y cosméticas. Con un tratamiento repetido a largo plazo de BoNT/A, un paciente puede desarrollar anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes contra la toxina llevando a inmunorresistencia. Los anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes inhiben la actividad BoNT/A deteniendo la captación de la toxina en las células neuronales uniéndose al dominio de unión (H_C) y/o el dominio de traslocación (H_N) de BoNT/A. Algunos estudios han sugerido que hasta 5-10% de los pacientes tratados repetidamente por distonía con formulaciones de BoNT/A tienen inmunorresistencia debido al desarrollo de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes. El análisis establecido para determinar la presencia de los anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes en la sangre del paciente es el análisis de protección en ratón (MPA - *mouse protection assay*). Actualmente, BoNT/A se incuba con el suero de un paciente antes de la inyección a los ratones. La presencia de anticuerpos se manifestó por una respuesta disminuída a la neurotoxina en el animal. Puesto que el MPA es un análisis basado *in vivo*, sería más efectivo en costos y tiempo si se reemplazara con un análisis basado en células.

[0235] Para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes, pueden emplearse los métodos basados en inmunología de determinar actividad BoNT/A, divulgados en la presente especificación. Un modo es determinar la cantidad de producto de escisión SNAP-25 presente después del tratamiento con varias concentraciones de BoNT/A usando un método de detección Western blot, el otro modo fue usar un método de detección ELISA sándwich ECL.

[0236] Para preparar una muestra que contiene anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes y una muestra de control negativo conocida por carecer de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes, se aisló suero de diferentes individuos. Individuos que rechazaban las inmunizaciones se denominaron individuos no sometidos previamente a tratamiento. Individuos que aceptaban la inmunización se denominaron individuos inmunizados. La sangre se extrajo en un tubo de suero con un activador de coagulación (BD Biosciences, Bedford, MA). Se obtuvo suero por centrifugación de la sangre a 1000xg durante 10 minutos a 4°C. Se obtuvo el suero de dos donantes: un individuo se inmunizó contra BoNT/A mientras que el otro no se inmunizó.

[0237] Para preparar un lisado de células tratadas con una muestra que contenía BoNT/A, se sembraron células SiMa en una placa de poli-D-lisina de 96 pozos y se diferenciaron, como se describe en Ejemplo VI. Los sueros humanos se diluyeron serialmente 1:100 - 1:152.000 con incrementos de 2.5 veces usando medio libre de suero. La BoNT/A se suspendió en 0.5 mL de medio de cultivo SiMa con una concentración de 10 pM. El medio que contenía BoNT/A y anticuerpos α-BoNT/A se mezclaron e incubaron durante 15 minutos o 1 hora a temperatura ambiente. Las células se trataron con BoNT/A con suero humano durante 2 horas, seguido por una incubación de 15 horas en medio de cultivo fresco. Las células se trataron igualmente durante 15 horas sin tiempo de incubación adicional.

[0238] Para detectar por análisis Western blot la presencia de un producto SNAP-25 escindido, se aspiró el medio de cada pozo, las células se suspendieron en 50 µL de solución amortiguadora de carga SDS-PAGE y, a continuación, se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Se analizó por Western blot una alícuota de cada muestra recolectada como se describe en Ejemplo I, excepto que las muestras recolectadas se separaron por SDS-PAGE usando geles 12% 26-well Criterion (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), y el suero de anticuerpo α-SNAP-25_{197} policlonal de conejo se utilizó como el anticuerpo primario (véase Ejemplo IV). Los resultados indican que muestras de prueba resultaron en una escisión reducida de SNAP25 comparada con la muestra de control negativo, demostrando que el suero del individuo inmunizado contenía anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes.

[0239] Para detectar por ELISA sándwich ECL la presencia de un producto SNAP-25 escindido, el medio se extrajo de cada pozo y las células se lisaron, como se describe en Ejemplo V. La solución de anticuerpo de captura α-SNAP-25, la solución de anticuerpo de detección α-SNAP-25 y el soporte de fase sólida α-SNAP-25 se prepararon como se describe en Ejemplo VII. Los sobrenadantes se transfirieron al soporte de fase sólida α-SNAP-25 y se llevó a cabo un análisis ELISA sándwich ECL, como se detalla en Ejemplo V. Se analizaron los datos recolectados, y se calculó la EC_{50}, como se describe en Ejemplo V, excepto que la EC_{50} es la dilución de suero necesaria para inhibir la actividad de la BoNT/A a ½ de su máximo y la relación de señal máxima ($Signal_{Max}$) a señal mínima ($Signal_{Min}$)

se obtuvo dividiendo la señal del producto de escisión SNAP-25, obtenida con la dilución máxima de suero, por la señal obtenida con la dilución mínima.

[0240] Los resultados indican que pudo detectarse en suero humano la presencia de α-BoNT/A neutralizante. La actividad del complejo BoNT/A incubado en suero del individuo inmunizado disminuyó a medida que decreció la dilución del suero, mientras que la presencia de suero no previamente tratado no tuvo ningún impacto sobre el análisis en cualquier dilución analizada. Este análisis puede llevarse a cabo usando un producto farmacéutico BoNT/A formulado, un complejo BoNT/A no procesada, o una neurotoxina purificada.

Ejemplo XII
Método Basado en Inmunología para Detectar Actividad BoNT/A Usando Células Genomanipuladas

[0241] El siguiente ejemplo ilustra cómo introducir una molécula polinucleotídica, que codifica un receptor BoNT/A, en células de una línea celular establecida para intensificar aún más la susceptibilidad a la intoxicación BoNT/A o mejorar la capacidad de captación BoNT/A.

[0242] Para introducir el receptor BoNT/A exógeno en células que comprenden una línea celular establecida, un constructo de expresión que comprendía una molécula polinucleotídica de SEQ ID NO: 130 que codifica el FGFR2 de SEQ ID NO: 59, o una molécula polinucleotídica de SEQ ID NO: 139 que codifica el FGFR3 de SEQ ID NO: 25, se transfectó en células de una línea celular establecida por un método de lípido catiónico. Una densidad apropiada (alrededor de 5 $x10^6$ células) de células de una línea celular establecida se siembran en una placa de cultivo de tejido de 100 mm, que contenía 5 mL de medio de cultivo completo, y se cultivaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células alcanzaron una densidad apropiada para transfección. Se preparan 3 mL de solución de transfección agregando 1.5 mL de OPTI-MEM Reduced Serum Medium que contenía 60 µL de LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos a 1.5 mL de OPTI-MEM Reduced Serum Medium, que contenía 24 µg de un constructo de expresión que codifica un FGFR2 o un FGFR3, o un constructo de expresión de

control que codifica una proteína verde fluorescente (GFP - *green fluorescent protein*). Esta mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. El medio completo se reemplaza con los 3 mL de solución de transfección, y las células se incuban en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono durante aproximadamente 8 horas. El medio de transfección se reemplaza con 3 mL de medio de cultivo completo fresco y las células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono durante aproximadamente 24 horas. El medio se reemplaza con 3 mL de medio de cultivo completo que contenía aproximadamente 1mM G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono durante aproximadamente 1 semana, el medio usado se reemplaza con medio de cultivo completo fresco que contiene 0.5 mM G418. Una vez se establecen colonias resistentes al antibiótico, los clones resistentes se resiembran a nuevas placas de cultivo de 100 mm, que contienen medio de cultivo completo fresco, suplementado con aproximadamente 0.5 mM G418 hasta que estas células alcanzaron una densidad de 6 a $20x10^5$ células/mL.

[0243] Para determinar si la sobreexpresión de receptores BoNT/As mejoraba la susceptibilidad de las células a intoxicación BoNT/A o mejoraba la capacidad de captación BoNT/A, se generó una curva de respuesta a dosis usando células tratadas con diferentes dosis de un complejo BoNT/A. Para preparar un lisado de células tratadas con BoNT/A, una densidad apropiada de células de una línea celular transfectada establecida se sembraron en los pozos de placas de cultivo de tejido de 96 pozos que contenían 100 µL de un medio libre de suero apropiado (Tabla 5). Estas células se incubaron en un incubador a 37°C bajo 5% de dióxido de carbono hasta que las células se diferenciaron, como se evaluó por criterios morfológicos estándar y rutinarios, tales como detención del crecimiento y extensión de neuritas (aproximadamente 3 días). El medio de las células diferenciadas se aspiró de cada pozo y se reemplazó con medio fresco que contenía 0 (muestra no tratada), 0.01 nM, 0.04 nM, 0.12 nM, 0.37 nM, 1.1 nM, 3.3 nM y 10 nM de un complejo BoNT/A para células que comprendían una línea celular SiMa o una línea celular transfectada PC12; y 0 (muestra no tratada), 0.14 nM, 0.40 nM, 1.2 nM, 3.7 nM, 11 nM, 33 nM y 100 nM de un complejo BoNT/A para células que comprendían una línea celular transfectada Neuro-2a. Las células se trataron con medio que contenía BoNT/A durante 6 horas, seguida por

incubación con medio fresco durante 15 horas, y se recolectaron agregando 40 µL de solución amortiguadora 2 x SDS-PAGE y calentando la placa a 95°C durante 5 minutos.

[0244] Para detectar la presencia de producto de escisión SNAP-25, se analizó por Western blot una alícuota de cada muestra recolectada, como se describe en Ejemplo I, excepto que las muestras recolectadas se separaron por SDS-PAGE usando 12% 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), y se emplearon los siguientes anticuerpos primarios con una dilución 1:1.000 de suero anticuerpo α-SNAP-25 policlonal de conejo (Ejemplo IV) (AGN, anticuerpo policlonal), una dilución 1:500 de C-17 policlonal de conejo α-FGFR2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), o una dilución 1:500 de C-15 policlonal de conejo α-FGFR3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). La intensidad de la proteína de interés de cada muestra se calculó usando Image Quant (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y se calculó la EC_{50} para cada una de las líneas celulares usando software SigmaPlot.

[0245] Los resultados indican que células transfectadas con FGFR2 o FGFR3 fueron más sensibles a BoNT/A que células transfectadas con GFP y mostraron asimismo un nivel más elevado de escisión SNAP-25 (Tabla 14). Los valores EC_{50} para células que sobreexpresan FGFR2 o FGFR3 fueron inferiores a los valores EC_{50} exhibidos por células que sobreexpresan GFP, indicando que la introducción de FGFR2 o FGFR3 mejoró la susceptibilidad de las células a intoxicación BoNT/A o mejoraron la capacidad de captación BoNT/A.

Tabla 14. Efectos de Introducir Receptores BoNT/A Exógena sobre la Susceptibilidad de las Células a Intoxicación BoNT/A o Captación BoNT/A

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

[0246] La detección de la presencia de producto de escisión SNAP-25 puede realizarse asimismo usando ELISA sándwich, como se describe en Ejemplos VI-X.

Lo que se reivindica es:

1. Una composición que contiene un transportador, un conector flexible y un antígeno SNAP-25, en donde el conector flexible comprende por lo menos tres aminoácidos y el antígeno SNAP-25 comprende SEQ ID NO: 148.

2. La composición de la reivindicación 2, en donde la secuencia de aminoácidos del conector flexible y el antígeno SNAP-25 es SEQ ID NO: 38.

3. Un anticuerpo α-SNAP-25 aislado,

   en donde el anticuerpo α-SNAP-25 aislado une un epítopo que contiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25;

   en donde el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítopo que no contiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25 de menos de 1×10^1 M^{-1} s^{-1}; y

   en donde el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio para el epítopo de menos de 0.450 nM.

4. El anticuerpo α-SNAP-25 aislado de la reivindicación 3, en donde el epítopo es SEQ ID NO: 32.

5. Un anticuerpo α-SNAP-25 aislado que comprende,

   a. una región variable de cadena pesada que incluye SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80 o SEQ ID NO: 82; y

   b. una región variable de cadena ligera que incluye SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 92.

6. Un anticuerpo α-SNAP-25 aislado que comprende,

   a. una región variable de cadena pesada que incluye SEQ ID NO: 93, SEQ ID

171

NO: 121 o SEQ ID NO: 100; y

b. una región variable de cadena ligera que incluye SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110 o SEQ ID NO:115.

7. Un anticuerpo α-SNAP-25 aislado que comprende por lo menos una CDR3 V_H de SEQ ID NO: 100, una CDR3 V_H de SEQ ID NO: 101 o una CDR3 V_H de SEQ ID NO: 102.

8. Un método de detectar actividad BoNT/A, método que comprende los pasos de:

a. tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que contiene una BoNT/A, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A en alrededor de 500 pM o menos de una BoNT/A;

b. aislar de la célula tratada un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25 que tiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A;

c. contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 fijado a un soporte de fase sólida,

en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que comprende una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítopo de una SNAP-25 que no incluye una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25 de menos de 1×10^1 M^{-1} s^{-1}; y el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio para el epítopo de menos de 0.450 nM;

d. detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25 que tiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A;

en donde la detección por el complejo anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad BoNT/A.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el producto de escisión SNAP-25 es SNAP-25_{197}.

10. El método de la reivindicación 8, en donde la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno se detecta usando un ELISA sándwich.

11. El método de la reivindicación 8, en donde el método tiene una relación señal/ruido en la asíntota inferior de por lo menos 3:1 y una relación señal/ruido en la asíntota superior de por lo menos 10:1.

12. El método de la reivindicación 8, en donde la muestra comprende como máximo 100 pM de una BoNT/A

13. El método de la reivindicación 8, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A en alrededor de 100 pM o menos de una BoNT/A.

14. El método de la reivindicación 8, en donde el método se lleva a cabo en una forma singleplex o una forma multiplex.

15. Un método de determinar inmunorresistencia BoNT/A en un mamífero que comprende los pasos de:

    a. agregar una BoNT/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está examinando en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes;

    b. tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A;

    c. aislar de las células tratadas un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25 que tiene una glutamina de término-

carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A;

d. contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α-SNAP-25 fijado a un soporte de fase sólida,

en donde el anticuerpo α-SNAP-25 une un epítopo que incluye una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítopo de una SNAP-25 que no incluye una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25 de menos de 1×10^{1} M^{-1} s^{-1}; y el anticuerpo α-SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio para el epítopo de menos de 0.450 nM;

e. detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α-SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25 que tiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A;

f. repetir los pasos **b-e** con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una BoNT/A y un suero conocido por no contener anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes; y

g. comparar la cantidad del complejo anticuerpo-antígeno detectado en el paso **e** con la cantidad del complejo anticuerpo-antígeno detectado en el paso **f**,

en donde la detección de una cantidad inferior del complejo anticuerpo-antígeno detectado en el paso **e** relativa a la cantidad del complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f** es indicativa de la presencia anticuerpos α-BoNT/A neutralizantes.

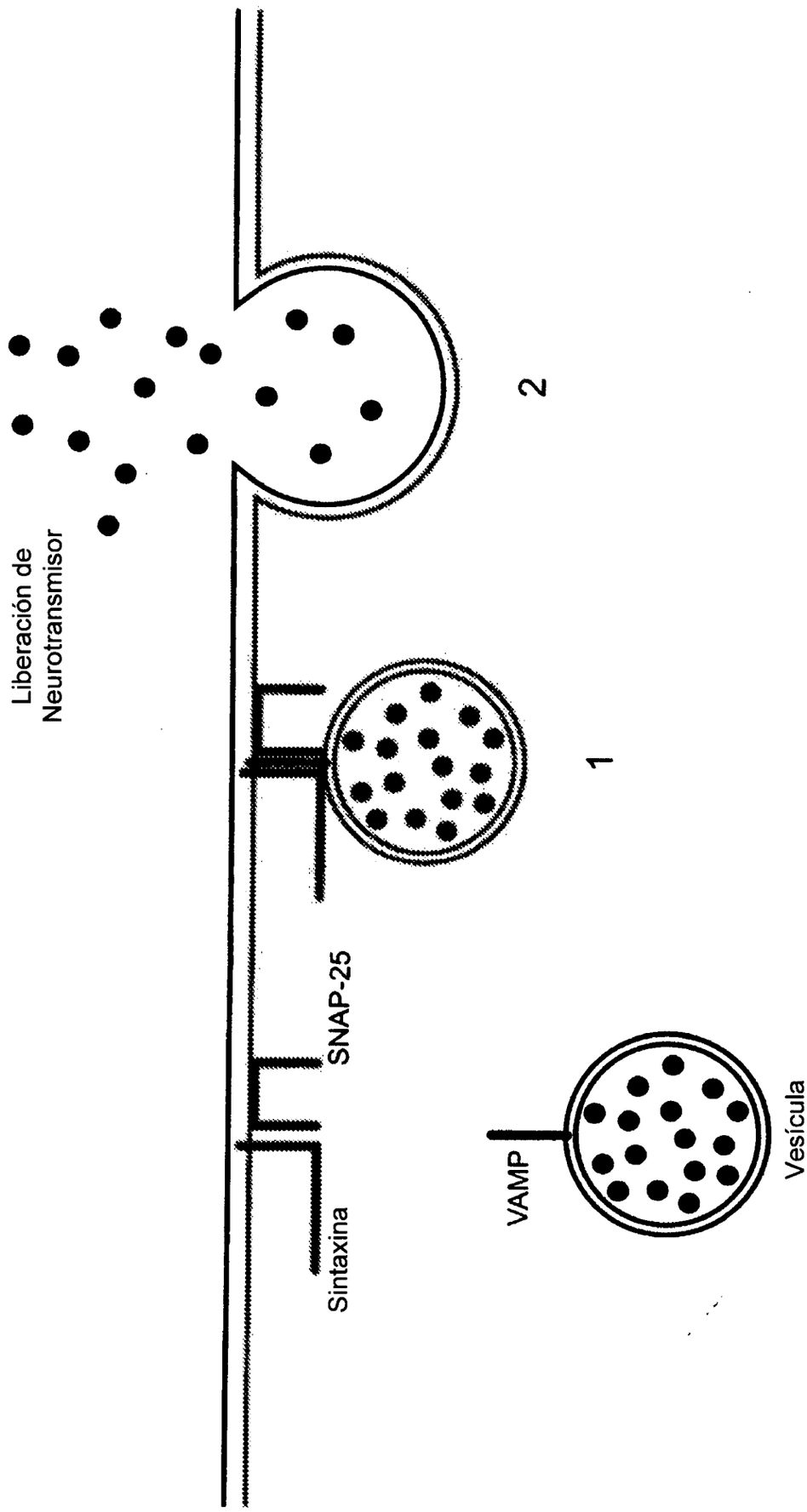

Liberación de Neurotransmisor
2
1
SNAP-25
Sintaxina
VAMP
Vesícula

FIG. 1A.

FIG. 1B.

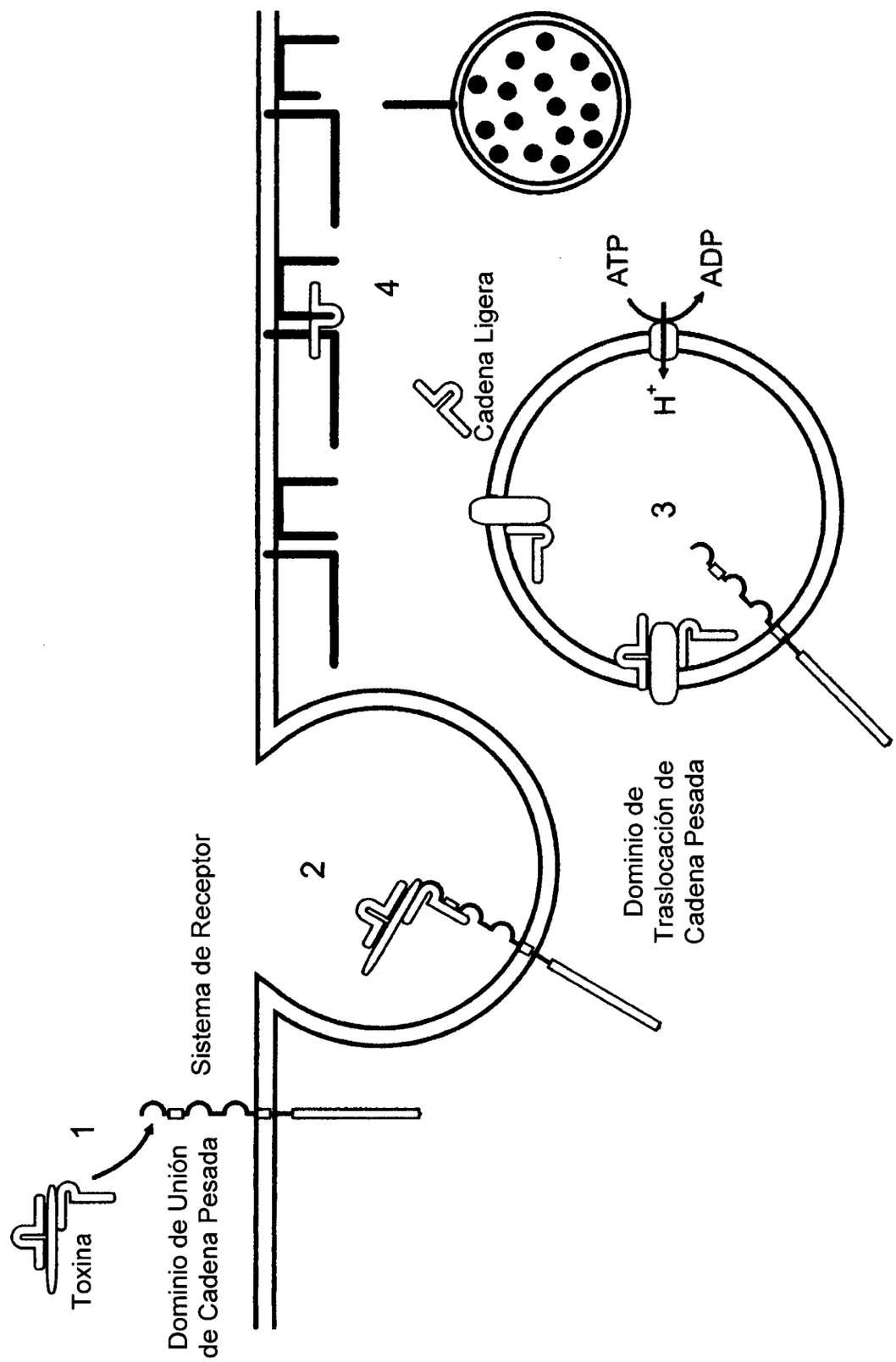
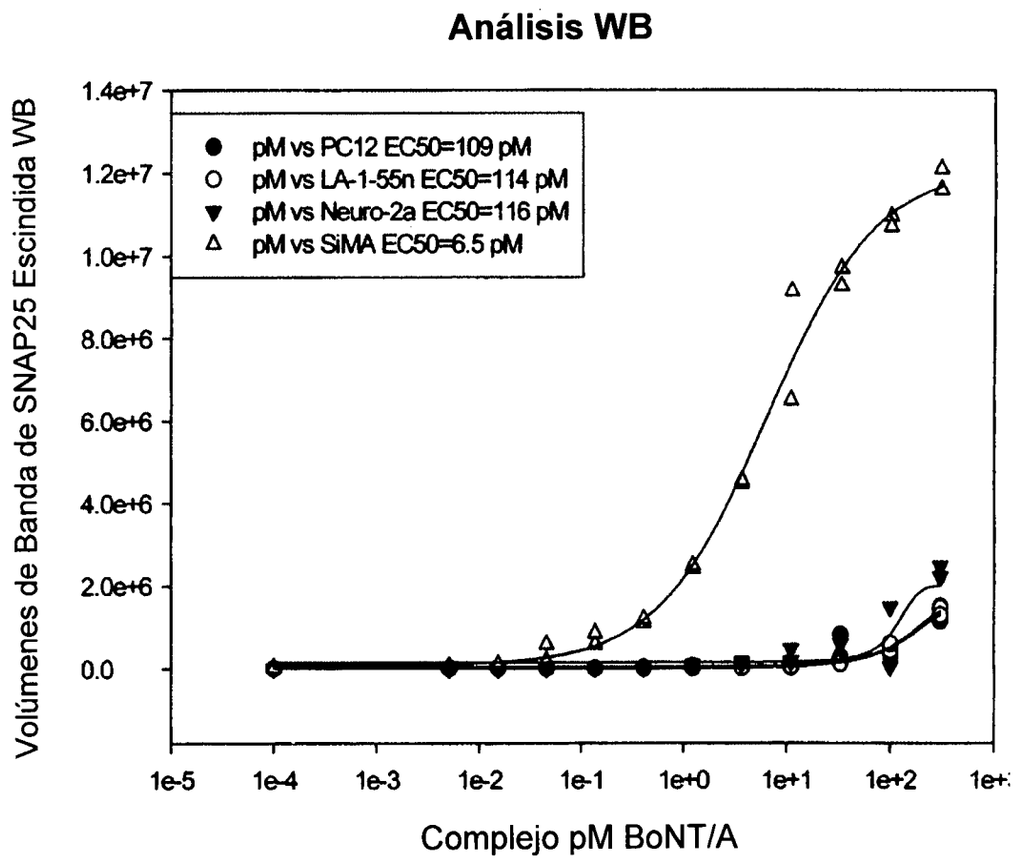

1
Toxina
Dominio de Unión de Cadena Pesada
Sistema de Receptor
2
Dominio de Traslocación de Cadena Pesada
3
4
Cadena Ligera
ATP
ADP
H+

FIG. 2.

A



B

Relación Señal/Ruido	PC12	LA-1-55n	Neuro-2a	SiMa
300pM/0pM	107	121	184	412
1.2pM/0pM	3	2	6	85

FIG. 3.

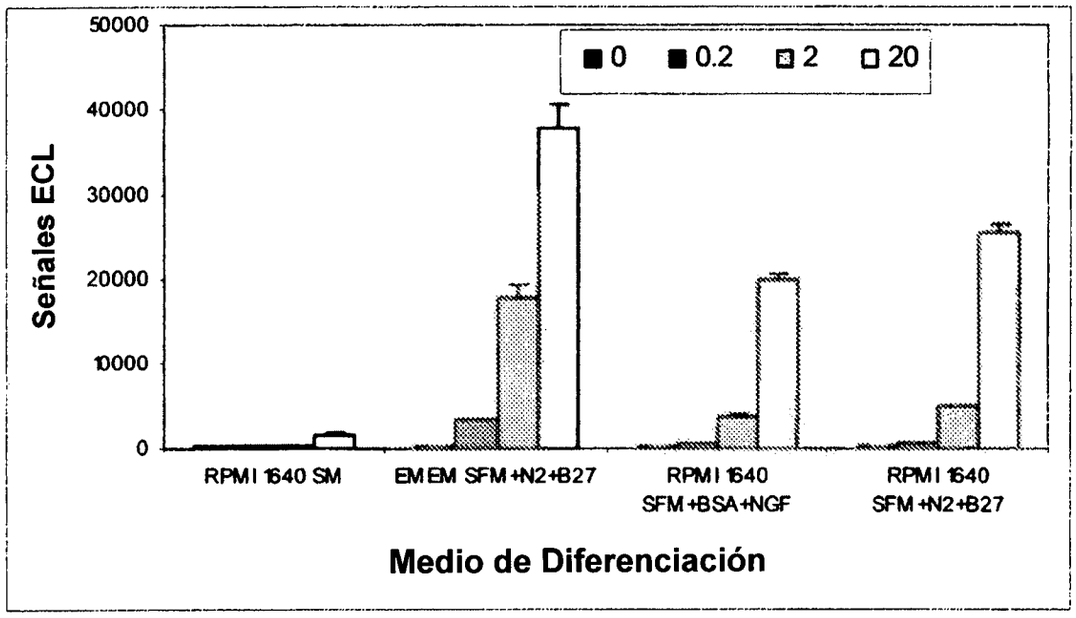

50000
40000
30000
20000
10000
0
Señales ECL
0
0.2
2
20
RPMI 1640 SM
EM EM SFM +N2+B27
RPMI 1640 SFM +BSA+NGF
RPMI 1640 SFM +N2+B27
Medio de Diferenciación

FIG. 4.

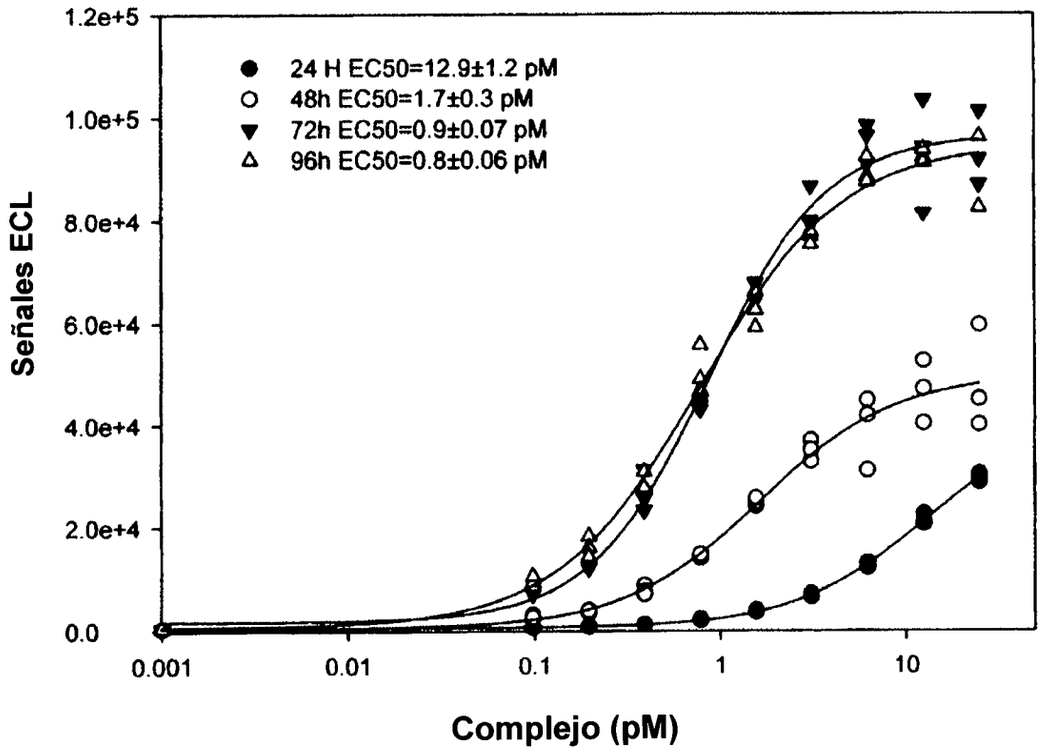

1.2e+5
1.0e+5
8.0e+4
6.0e+4
4.0e+4
2.0e+4
0.0
Señales ECL
24 H EC50=12.9±1.2 pM
48h EC50=1.7±0.3 pM
72h EC50=0.9±0.07 pM
96h EC50=0.8±0.06 pM
0.001
0.01
0.1
1
10
Complejo (pM)

FIG. 5.

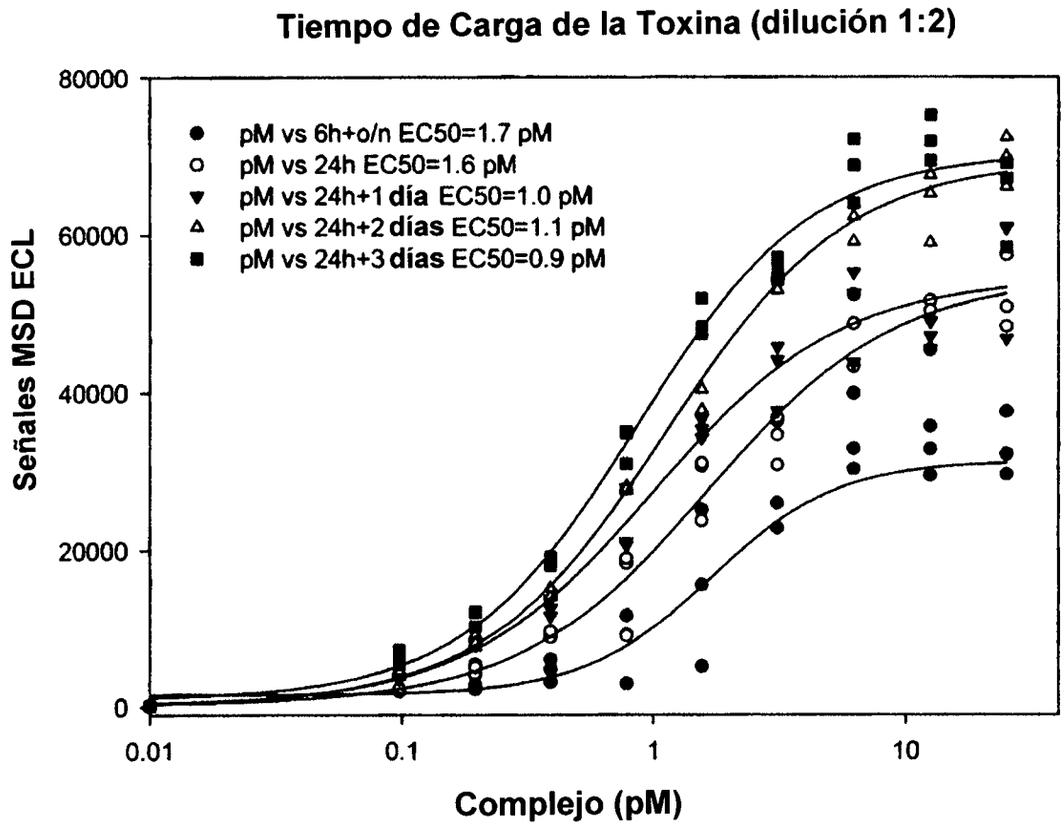

Tiempo de Carga de la Toxina (dilución 1:2)
Señales MSD ECL
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
Complejo (pM)
pM vs 6h+o/n EC50=1.7 pM
pM vs 24h EC50=1.6 pM
pM vs 24h+1 día EC50=1.0 pM
pM vs 24h+2 días EC50=1.1 pM
pM vs 24h+3 días EC50=0.9 pM

FIG. 6.

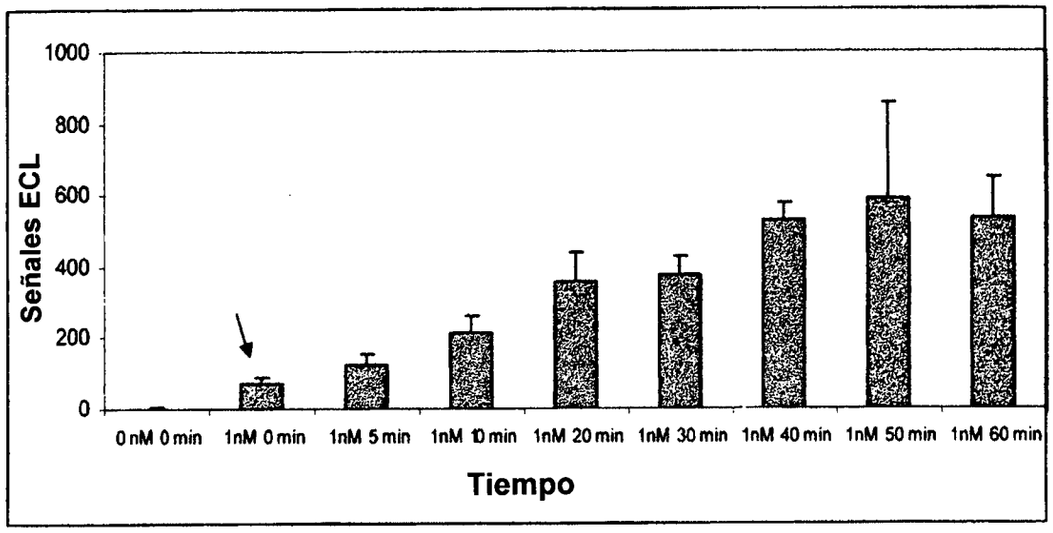

1000
800
600
400
200
0
Señales ECL
0 nM 0 min
1nM 0 min
1nM 5 min
1nM 10 min
1nM 20 min
1nM 30 min
1nM 40 min
1nM 50 min
1nM 60 min
Tiempo

FIG. 7.

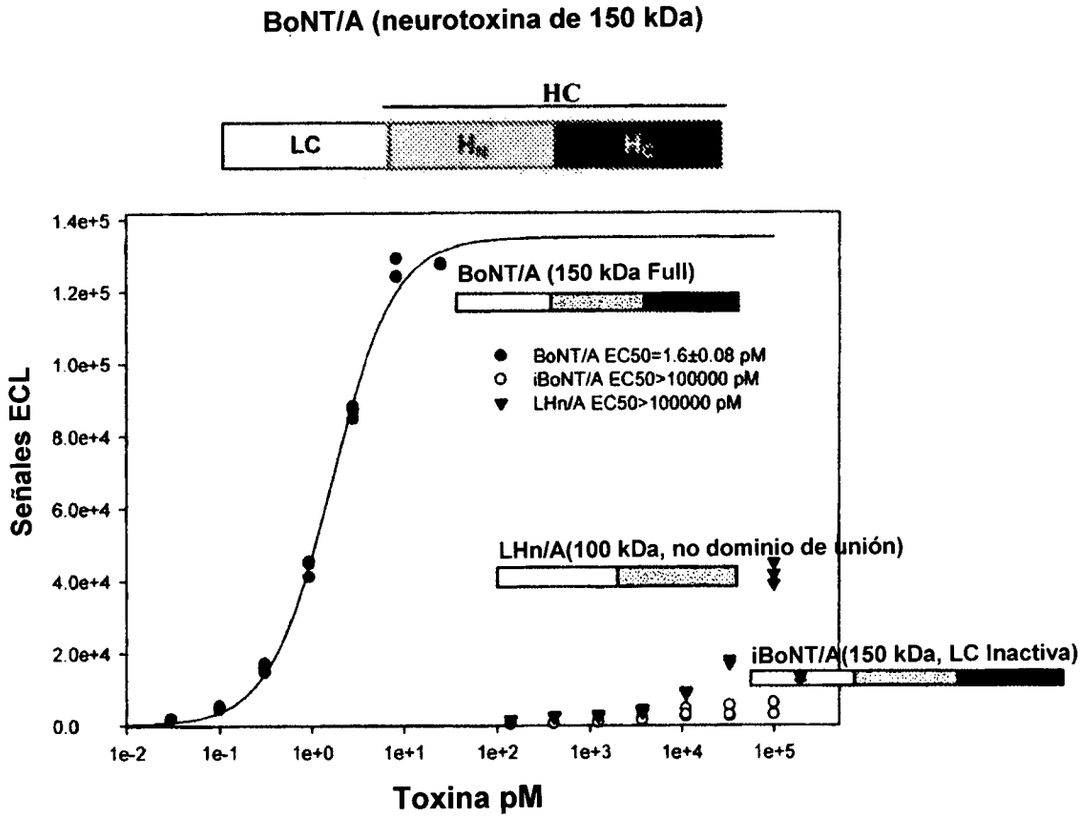

BoNT/A (neurotoxina de 150 kDa)
HC
LC
H_N
H_C
1.4e+5
1.2e+5
1.0e+5
8.0e+4
6.0e+4
4.0e+4
2.0e+4
0.0
Señales ECL
BoNT/A (150 kDa Full)
BoNT/A EC50=1.6±0.08 pM
iBoNT/A EC50>100000 pM
LHn/A EC50>100000 pM
LHn/A(100 kDa, no dominio de unión)
iBoNT/A(150 kDa, LC Inactiva)
1e-2
1e-1
1e+0
1e+1
1e+2
1e+3
1e+4
1e+5
Toxina pM

FIG. 8.

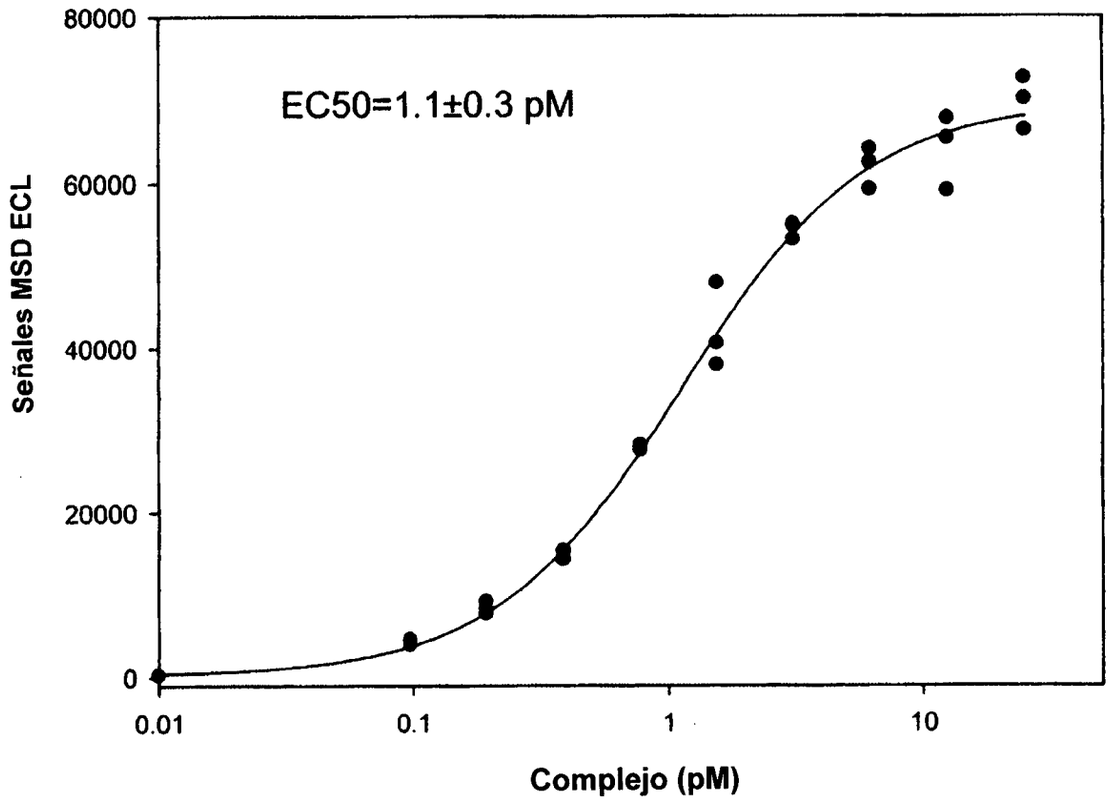

EC50=1.1±0.3 pM
Señales MSD ECL
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
Complejo (pM)

FIG.9.

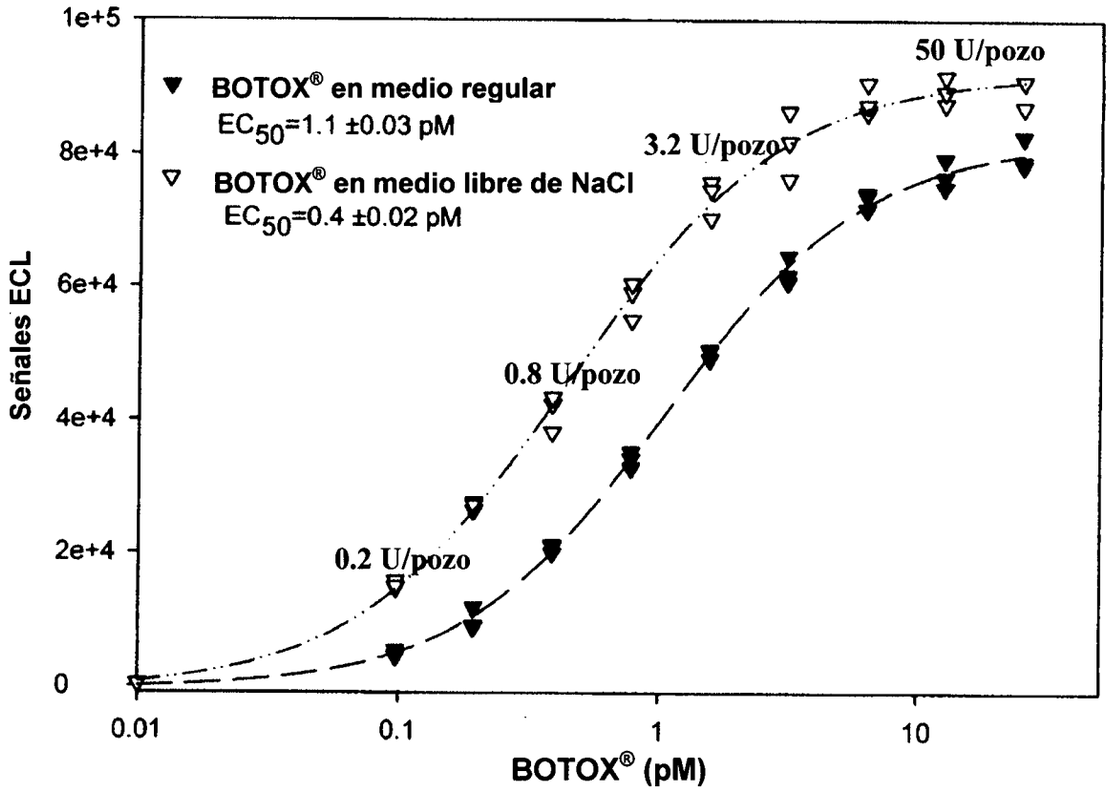
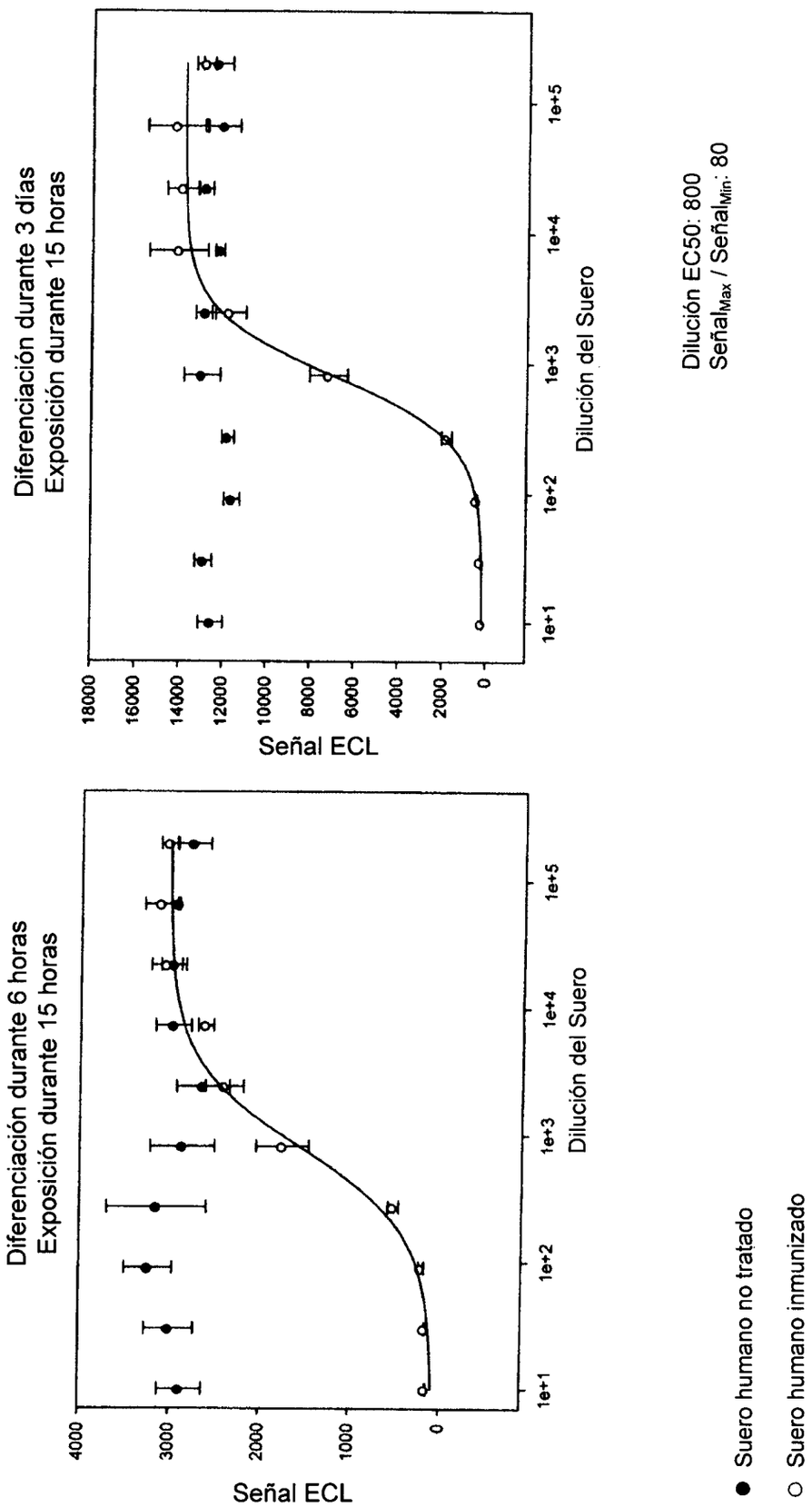

1e+5
8e+4
6e+4
4e+4
2e+4
0
Señales ECL
0.01
0.1
1
10
BOTOX® (pM)
BOTOX® en medio regular
EC50=1.1 ±0.03 pM
BOTOX® en medio libre de NaCl
EC50=0.4 ±0.02 pM
50 U/pozo
3.2 U/pozo
0.8 U/pozo
0.2 U/pozo

FIG. 10.


Diferenciación durante 3 días
Exposición durante 15 horas
Señal ECL
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
1e+1
1e+2
1e+3
1e+4
1e+5
Dilución del Suero
Diferenciación durante 6 horas
Exposición durante 15 horas
Señal ECL
4000
3000
2000
1000
0
1e+1
1e+2
1e+3
1e+4
1e+5
Dilución del Suero
Dilución EC50: 800
Señal$_{Max}$ / Señal$_{Min}$: 80
● Suero humano no tratado
○ Suero humano inmunizado

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
17 September 2009 (17.09.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/114748 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/12 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/037046

(22) International Filing Date:
13 March 2009 (13.03.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/036,723 14 March 2008 (14.03.2008) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: ALLERGAN, INC. [US/US]; 2525 Dupont Drive, T2-7H, Irvine, CA 92612 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: FERNANDEZ-SALAS, Ester [US/US]; 1710 Rocky Road, Fullerton, CA 92831 (US). WANG, Joanne [US/US]; 37 Bristlecone, Irvine, CA 92620 (US). GARAY, Patton, E. [US/US]; 5503 E. Pageantry Street, Long Beach, CA 90808 (US). WONG, Lina, S. [US/US]; 6 Ingleside, Irvine, CA 92620 (US). HODGES, D., Dianne [US/US]; 14351 Pinewood Road, Tustin, CA 92780 (US). AOKI, Kei, Roger [US/US]; 2 Ginger Lily Court, Coto De Caza, CA 92679 (US).

(74) Agents: STATHAKIS, Dean et al.; Allergan, Inc., 2525 Dupont Drive, Irvine, CA 92612 (US).

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

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

Published:

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

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

(54) Title: IMMUNO-BASED BOTULINUM TOXIN SEROTYPE A ACTIVITY ASSAYS

(57) Abstract: The present specification discloses SNAP-25 compositions, methods of making α-SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, α-SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, methods of detecting BoNT/A activity, and methods of detecting neutralizing α-BoNT/A antibodies.

WO 2009/114748 A1

Immuno-Based Botulinum Toxin Serotype A Activity Assays

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

[02] The ability of Clostridial toxins, such as, *e.g.*, Botulinum neurotoxins (BoNTs), BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C1, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F and BoNT/G, and Tetanus neurotoxin (TeNT), to inhibit neuronal transmission are being exploited in a wide variety of therapeutic and cosmetic applications, see e.g., William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin (Slack, Inc., 2004). Clostridial toxins commercially available as pharmaceutical compositions include, BoNT/A preparations, such as, e.g., BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, England), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Germany), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, South Korea), BTX-A (Biogen-tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China); and BoNT/B preparations, such as, e.g., MYOBLOC®/NEUROBLOC® (Solstice Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA). As an example, BOTOX® is currently approved in the U.S. for the treatment of cervical dystonia in adults to decrease the severity of abnormal head position and neck pain associated with cervical dystonia; for the treatment of severe primary axillary hyperhidrosis that is inadequately managed with topical agents; and for the treatment of strabismus and blepharospasm associated with dystonia, including benign essential blepharospasm or VII nerve disorders in patients 12 years of age and above.

[03] At present the mouse LD_{50} bioassay, a lethality test, remains the "gold standard" used by all pharmaceutical manufacturers to express the potency of their preparations. S. S. Arnon et al., JAMA 285: 1059-1070 (2001). In fact, the units on the pharmaceutical preparations' labels are mouse LD_{50} units and the number of animals needed to produce statistically useful LD_{50} data is large. The advantage of the mouse LD_{50} bioassay is that it measures all the steps necessary for botulinum toxin uptake (*e.g.*, toxin binding to a cell surface receptor, internalization of the toxin-receptor complex, light chain translocation into the cytoplasm, light chain cleavage of substrate), instead of merely determining the activity for only part of this intoxication process, such as, *e.g.*, in vitro assays that only measure light chain enzymatic activity. Unfortunately, the mouse LD_{50} bioassay suffers from many drawbacks including high operational cost due to the large numbers of laboratory animals required, a lack of specificity since all BoNT serotypes will cause the same measurable end-point, and the potential for inaccuracy unless large animal groups are used. In addition, animal rights groups have exerted pressure on regulatory agencies in the U.S. (FDA/NICEATM/ICCVAM) and Europe (MHRA and EDQM), and on pharmaceutical companies manufacturing botulinum neurotoxin products to reduce animal testing and more importantly replace the mouse LD_{50} bioassay for product release. The regulatory agencies are engaging pharmaceutical companies to apply the three "Rs" principle to the potency testing of botulinum neurotoxins: Reduce, Refine, Replace. D. Straughan, *Progress in Applying the Three Rs to the Potency*

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

Testing of Botulinum Toxin Type A, Altern. Lab. Anim. 34(3): 305-313 (2006). In recent years, several steps have been already taken to reduce and refine the mouse LD_{50} bioassay in order to standardize the protocol and produce more consistent data using fewer animals per assay.

[04] Thus, a simple, reliable, validated and governmental agency acceptable botulinum toxin activity assay that can evaluate the integrity of all the steps necessary in botulinum toxin uptake would be of significant value because such a non-animal based assay would alleviate the need for animal testing and all the disadvantages, costs and ethical concerns associated with this type of animal-based assay. The present specification provides novel compositions, cells, and methods for assaying the activity of a botulinum toxin A useful for various industries, such as, *e.g.*, the pharmaceutical and food industries, and provides related advantages as well. Such compositions, cells, and methods do not use live animals or tissues taken from live animals, but can evaluate all the steps necessary for neurotoxin action.

DETAILED DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

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

[06] **FIG. 2** shows a comparison of BoNT/A uptake in four cell lines by Western blot analysis. FIG. 2A shows a graph of SNAP-25 cleavage product detected based on amount of BoNT/A used to treat the cell line. The data were analyzed in SigmaPlot using a 4 parameter logistic model and EC_{50} values were obtained for each cell line. Ranking of SNAP-25 cleavage product signals detected was: SiMa>> Neuro-2a>LA1-55n> PC12. FIG. 2B shows the signal-to-noise ratios of the raw signals at 300 pM vs. 0 pM and

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

188

1.2 pM vs. 0 pM were calculated for the assay. SiMa cells generated the highest signal-to-noise ratios and the lowest EC_{50} values.

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

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

[09]FIG. 5 shows optimization of BoNT/A treatment of cells comprising an established cell line useful in an immuno-based method of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specificaiton. The results indicate an EC_{50} of less than 2 pM was achieved with any of the BoNT/A treatments tested.

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

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

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

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

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

DETAILED DESCRIPTION

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

3NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

and protease activity. As discussed further below, the novel methods and compositions can be used to analyze crude and bulk samples as well as highly purified di-chain toxins and formulated toxin products and further are amenable to automated high throughput assay formats.

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

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

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

[018] Still another aspect disclosed in the present specification provides α-SNAP-25 antibodies that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. Such α-SNAP-25 antibodies include both naturally-occurring and non-naturally-occurring antibodies, as well as, monoclonal α-SNAP-25 antibodies or polyclonal α-SNAP-25 antibodies. Monoclonal α-SNAP-25 antibodies useful as α-SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, include, without limitation, the monoclonal α-SNAP-25 antibodies produced from hybridoma cell lines 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 and 3C3E2.

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

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

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

3NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product; (e) detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising the α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; (f) repeating steps a-e with a negative control sample instead of a test sample; and (g) comparing the amount of antibody-antigen complex detected in step (e) to the amount of antibody-antigen complex detected in step (f), wherein detection of a lower amount of antibody-antigen complex detected in step (e) relative to the amount of antibody-antigen complex detected in step (f) is indicative of the presence of α-BoNT/A neutralizing antibodies. The α-SNAP-25 antibody of step d can optionally be linked to a solid phase support. The control sample in step f can also include a positive control sample, in addition to the negative control sample.

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

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

[024] The binding, translocation and enzymatic activity of these three functional domains are all necessary for toxicity. While all details of this process are not yet precisely known, the overall cellular intoxication mechanism whereby Clostridial toxins enter a neuron and inhibit neurotransmitter release is similar, regardless of serotype or subtype. Although the applicants have no wish to be limited by the

)NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

192

following description, the intoxication mechanism can be described as comprising at least four steps: 1) receptor binding, 2) complex internalization, 3) light chain translocation, and 4) enzymatic target modification (FIG. 1). The process is initiated when the HC domain of a Clostridial toxin binds to a toxin-specific receptor system located on the plasma membrane surface of a target cell. The binding specificity of a receptor complex is thought to be achieved, in part, by specific combinations of gangliosides and protein receptors that appear to distinctly comprise each Clostridial toxin receptor complex. Once bound, the toxin/receptor complexes are internalized by endocytosis and the internalized vesicles are sorted to specific intracellular routes. The translocation step appears to be triggered by the acidification of the vesicle compartment. This process seems to initiate important pH-dependent structural rearrangements that increase hydrophobicity, promote pore formation, and facilitate separation of the heavy and light chains of the toxin. Once separated, the light chain endopeptidase of the toxin is released from the intracellular vesicle into the cytosol where it appears to specifically target core components of the neurotransmitter release apparatus. These core proteins, vesicle-associated membrane protein (VAMP)/synaptobrevin, synaptosomal-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) and Syntaxin, are necessary for synaptic vesicle docking and fusion at the nerve terminal and constitute members of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein-receptor (SNARE) family. BoNT/A and BoNT/E cleave SNAP-25 in the carboxyl terminal region, releasing a nine or twenty six amino acid fragment, respectively, and BoNT/C1 also cleaves SNAP-25 near the carboxyl terminus releasing an eight amino acid fragment. The botulinum serotypes BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F and BoNT/G, and tetanus toxin, act on the conserved central portion of VAMP, and release the amino terminal portion of VAMP into the cytosol. BoNT/C1 cleaves syntaxin at a single site near the cytosolic membrane surface. The selective proteolysis of synaptic SNAREs accounts for the block of neurotransmitter release caused by Clostridial toxins in vivo. The SNARE protein targets of Clostridial toxins are common to exocytosis in a variety of non-neuronal types; in these cells, as in neurons, light chain peptidase activity inhibits exocytosis, see, e.g., Yann Humeau et al., *How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release*, 82(5) Biochimie. 427-446 (2000); Kathryn Turton et al., *Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility*, 27(11) Trends Biochem. Sci. 552-558. (2002); Giovanna Lalli et al., *The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons*, 11(9) Trends Microbiol. 431-437, (2003).

[025] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a composition for producing α-SNAP-25 antibodies that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. Other aspects of the present disclosure comprise, in part, an immune response inducing composition for producing α-SNAP-25 antibodies that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. As used herein, the term "immune response inducing composition" refers to a composition comprising a SNAP-25 antigen which, when administered to an animal, stimulates an immune response against the SNAP-25 antigen, thereby producing α-SNAP-25 antibodies that can bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A

)NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. The term "immune response" refers to any response by the immune system of an animal to an immune response inducing composition. Exemplary immune responses include, but are not limited to, cellular as well as local and systemic humoral immunity, such as, *e.g.*, CTL responses, including antigen-specific induction of CD8+ CTLs, helper T-cell responses, including T-cell proliferative responses and cytokine release, and B-cell responses including, *e.g.*, an antibody producing response. The term "inducing an immune response" refers to administration of an immune response inducing composition or a polynucleotide encoding the immune response inducing composition, where an immune response is affected, *i.*e., stimulated, initiated or induced.

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

[027] The sequence surrounding a BoNT/A cleavage site present in SNAP-25 is denoted as P_5–P_4–P_3–P_2–P_1–P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5', with P_1–P_1' representing the scissile bond. Upon cleavage by BoNT/A, the resulting cleavage products produced comprise a fragment including the P_5–P_4–P_3–P_2–P_1 sequence and a fragment including the P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5'. Thus, as used herein, the term "SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond" refers to any SNAP-25 having the P_1 residue as its carboxyl-terminal amino acid. For example, Q_{197}–R_{198} of human SNAP-25 (SEQ ID NO: 5) represents the P_1–P_1' scissile bond for the BoNT/A cleavage site. As such, "SNAP-25 having a carboxyl-terminus glutamine of the BoNT/A cleavage site scissile bond" would be any SNAP-25 cleavage product having a glutamine at its carboxyl-terminal amino acid where the glutamine represents Q_{197} of the scissile bond. As another example, K_{204}–H_{205} of *Torpedo marmorata* SNAP-25 (SEQ ID NO: 16) represents the P_1–P_1' scissile bond for the BoNT/A cleavage site. As such, "SNAP-25 having a carboxyl-terminus lysine of the BoNT/A cleavage site scissile bond" would be any SNAP-25 cleavage

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

product having a lysine at its carboxyl-terminal amino acid where the lysine represents K_{204} of the scissile bond.

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

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

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

[031] In another embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 32. In aspects of this embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148. In a further embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 38.

3NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

[032] In yet another embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 39. In aspects of this embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 or SEQ ID NO: 44. In a further embodiment, the SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprises SEQ ID NO: 45.

[033] It is envisioned that any and all SNAP-25 antigens that triggers an immune response that produces α-SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product can be useful as a SNAP-25 antigen. Thus, amino acid sequence variants comprising SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148 can be useful as a SNAP-25 antigen to trigger an immune response that produces α-SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. Thus, in an embodiment, a SNAP-25 antigen can substitute at least 1, at least 2, at least 3, at least 4, or at least 5 amino acid substitutions, deletions or additions to the SNAP-25 antigens comprising SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148. In still another embodiment, a SNAP-25 antigen can have at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity to the SNAP-25 antigens comprising SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148.

[034] It is envisioned that one or more carriers may be linked to a SNAP-25 antigen in order to enhance the immunogenicity of a SNAP-25 antigen that is immunogenic, non-immunogenic, or weakly immunogenic when not associated with the carrier. Non-limiting examples, include, *e.g.*, a keyhole limpet hemacyanin (KLH), an ovalbumin (OVA), a thyroglobulin (THY), a bovine serum albumin (BSA), a soybean trypsin inhibitor (STI), or a multiple attachment peptide (MAP). As is well known in the art, a non-antigenic or weakly antigenic antigen can be made antigenic by coupling the antigen to a carrier. Various other carrier and methods for coupling an antigen to a carrier are well known in the art. See, *e.g.*, Harlow and Lane, supra, 1998a; Harlow and Lane, supra, 1998b; and David W. Waggoner, Jr. et al., *Immunogenicity-enhancing carriers and compositions thereof and methods of using the same*, U.S. Patent Publication No. 20040057958 (Mar. 25, 2004). An epitope can also be generated by expressing the epitope as a fusion protein. Methods for expressing polypeptide fusions are well known to those skilled in the art as described, for example, in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999). As the carboxyl-terminal end of the SNAP-25

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

antigen must be the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, a carrier must be linked to the amino end of the SNAP-25 antigen.

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

[036] A flexible space comprising a peptide is at least one amino acid in length and comprises non-charged amino acids with small side-chain R groups, such as, *e.g.*, glycine, alanine, valine, leucine or serine. Thus, in an embodiment a flexible spacer can be, e.g., at least 1, at least 2, at least 3, at least 4, at least 5, at least 6, at least 7, at least 8, at least 9, or at least 10 amino acids in length. In another embodiment, a flexible spacer can be, *e.g.*, at least 1, at most 2, at most 3, at most 4, at most 5, at most 6, at most 7, at most 8, at most 9, or at most 10 amino acids in length. In still another embodiment, a flexible spacer can be, *e.g.*, between 1-3 amino acids, between 2-4 amino acids, between 3-5 amino acids, between 4-6 amino acids, or between 5-7 amino acids. Non-limiting examples of a flexible spacer include, e.g., a G-spacers such as GGG, GGGG (SEQ ID NO: 55), and GGGGS (SEQ ID NO: 56) or an A-spacers such as AAA, AAAA (SEQ ID NO: 57) and AAAAV (SEQ ID NO: 58). A flexible spacer is linked in-frame to the SNAP-25 antigen as a fusion protein.

[037] As discussed above, a flexible spacer is used, in part, to increase the overall peptide length of the SNAP-25 antigen. For example, a 5-10 amino acid SNAP-25 antigen can have its overall length increased by linking a 3-5 amino acid flexible space to the amino-end of the SNAP-25 antigen. As another example, a 5-10 amino acid SNAP-25 antigen can have its overall length increased by linking a 4-6 amino acid flexible space to the amino-end of the SNAP-25 antigen. As another example, a 5-10 amino acid SNAP-25 antigen can have its overall length increased by linking a 7-10 amino acid flexible space to the amino-end of the SNAP-25 antigen. As another example, a 7-12 amino acid SNAP-25 antigen can have its overall length increased by linking a 1-3 amino acid flexible space to the amino-end of the SNAP-25 antigen. As another example, a 7-12 amino acid SNAP-25 antigen can have its overall length increased by linking a 4-6 amino acid flexible space to the amino-end of the SNAP-25 antigen. The increased length provided by the flexible spacer allows for the selection of a small sized SNAP-25 antigen, thereby increasing the likelihood that the SNAP-25 antigen will only trigger an immune response substantially against a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, thus increasing the possibility of producing α-SNAP-25 antibodies that can distinguish a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 lacking a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

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

[039] A carrier disclosed in the present specification may also act as an adjuvant. Specific adjuvants and methods of making and using are described in, *e.g.*, Gupta et al. Vaccine, 11: 993-306, 1993; 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*, U.S. Patent Publication No. 20040057958 (Mar. 25, 2004). Additional adjuvants include any compound described in Chapter 7 (pp 141-227) of "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell, M. F. and Newman, M. J.) Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Plenum Press (New York). Examples from this compendium include Muramyl Dipeptide (MDP) and Montanide 720. Molecules such as Poly Inosine:Cytosine (Poly I:C) or plasmid DNA containing CpG motifs can also be administered as adjuvants in combination with antigens encapsulated in microparticles. In another example, the adjuvant is an agent that facilitates entry of the antigenic compound into the cytoplasm of a cell such as listeriolysin, streptolysin or a mixture thereof.

[040] Thus, in an embodiment, a SNAP-25 composition comprises a SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal glutamine linked to a carrier peptide. In aspects of this embodiment, a SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal glutamine comprises SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148. In another aspect of this embodiment, a SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 38. In

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

19B

aspects of this embodiment, the carrier peptide is a keyhole limpet hemacyanin (KLH), an ovalbumin (OVA), a thyroglobulin (THY), a bovine serum albumin (BSA), a soybean trypsin inhibitor (STI) or a multiple attachment peptide (MAP).

[041] In another embodiment, a SNAP-25 composition comprises a SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal lysine linked to a carrier peptide. In aspects of this embodiment, SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal lysine comprises SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 or SEQ ID NO: 44. In another aspect of this embodiment, a SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 45. In aspects of this embodiment, the carrier peptide is a keyhole limpet hemacyanin (KLH), an ovalbumin (OVA), a thyroglobulin (THY), a bovine serum albumin (BSA), a soybean trypsin inhibitor (STI) or a multiple attachment peptide (MAP).

[042] In yet another embodiment, a SNAP-25 composition comprises a SNAP-25 antigen having a carboxylated C-terminal glutamine linked to one or more flexible linkers and a carrier peptide wherein the flexible linkers intervene between the SNAP-25 antigen and the carrier peptide. In aspects of this embodiment, SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal glutamine comprises SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148. In another embodiment, a SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 46. In aspects of this embodiment, the carrier peptide is a keyhole limpet hemacyanin (KLH), an ovalbumin (OVA), a thyroglobulin (THY), a bovine serum albumin (BSA), a soybean trypsin inhibitor (STI) or a multiple attachment peptide (MAP). In aspects of this embodiment, the flexible linker is a G-spacer or an A-spacer.

[043] In still another embodiment, a SNAP-25 composition comprises a SNAP-25 antigen having a carboxylated C-terminal lysine linked to a flexible linker and a carrier peptide wherein the flexible linker intervenes between the SNAP-25 antigen and the carrier peptide. In aspects of this embodiment, SNAP-25 antigen having a carboxylated carboxyl-terminal lysine comprises SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 or SEQ ID NO: 44. In another aspect of this embodiment, a SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 47. In aspects of this embodiment, the carrier peptide is a keyhole limpet hemacyanin (KLH), an ovalbumin (OVA), a thyroglobulin (THY), a bovine serum albumin (BSA), a soybean trypsin inhibitor (STI) or a multiple attachment peptide (MAP). In aspects of this embodiment, the flexible linker is a G-spacer or an A-spacer.

[044] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a method for producing α-SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. An α-SNAP-25 antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product can be produced by a wide variety of methods that are well known in the art. Specific protocols for making and using antibodies as well as detecting, and measuring antibody

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

binding specificity, binding affinity and binding avidity are known in the art. *See, e.g.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998a); and USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL No. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b); Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001; and Current Protocols in Molecular Biology, 2004; David Anderson et al., *Therapeutic Polypeptides, Nucleic Acids Encoding Same, and Methods of Use*, U.S. Patent 7,034,132 (Apr. 25, 2005); and Beatriz M. Carreno et al., *Antibodies Against CTLA4*, U.S. Patent 7,034,121 (Apr. 25, 2006).

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

[046] As another non-limiting example, α-SNAP-25 monoclonal antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product can be produced using a hybridoma method. See e.g., Chapter 6 *Monoclonal Antibodies*, pp. 196-244, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; and Chapter 7 *Growing Hybridomas*, pp. 245-282, Harlow & Lane, *supra*, 1998a; and Goding, pp. 59-103, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986). In this method, a host animal, such as, e.g., a mouse, a hamster, or another appropriate host animal, is typically exposed to one or more injections of a SNAP-25 antigen disclosed in the present specification to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing α-SNAP-25 antibodies that will specifically bind to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. The antibody titer in the immunized animal can be monitored over time by standard techniques, such as with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized antigen or a cell-based activity assay. Alternatively, the lymphocytes can be immunized in vitro using a suitable cell culture line. At an appropriate time after immunization, e.g., when the antibody titers are highest, antibody-producing cells are isolated from the animal. Generally, either peripheral blood lymphocytes are used, if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

200

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

[047] Another alternative for preparing an α-SNAP-25 monoclonal antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product is by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library, such as, *e.g.*, an antibody phage display library, with a SNAP-25 peptide and isolate immunoglobulin library members that bind a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available, such as, e.g., the Recombinant Phage Antibody System (Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ); and the SurfZAP™ Phage Display Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Additionally, examples of methods and reagents useful in generating and screening antibody display library can be found in, for example, Ladner et al. U.S. Patent 5,223,409; Borrebaeck et al. U.S. Patent 5,712,089; Griffiths et al. U.S. Patent

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

201

5,885,793; Griffiths et al. U.S. Patent 5,962,255; McCafferty et al. U.S. Patent 5,969,108; Griffiths et al. U.S. Patent 6,010,884; Jespers et al. U.S. Patent 6,017,732; Borrebaeck et al. U.S. Patent 6,027,930; Johnson et al. U.S. Patent 6,140,471; McCafferty et al. U.S. Patent 6,172,197, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

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

[049] Aspects of the present disclosure comprise, in part, isolating an α-SNAP-25 antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product from the sample. Methods of isolating an such α-SNAP-25 antibodies, such as, *e.g.*, α-SNAP-25 polyclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product or α-SNAP-25 monoclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product are well known to those skilled in the art. See, e.g., Harlow and Lane, supra, 1998a; and Harlow and Lane, supra, 1998b. For example, such α-SNAP-25 polyclonal antibodies can be isolated from the sample by well known

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

202

techniques, such as, *e.g.*, affinity chromatography using protein A or protein G, which provide primarily the IgG fraction of immune serum. Subsequently, or alternatively, a specific SNAP-25 antigen can be immobilized on a column or magnetic beads to purify the α-SNAP-25 polyclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product by immunoaffinity chromatography. An α-SNAP-25 monoclonal antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product can be isolated from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, e.g., protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

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

[051] In another embodiment, a method of producing α-SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product comprises the steps (a) administering to an animal a composition comprising a SNAP-25 peptide having a carboxylated C-terminal glutamine linked to a flexible linker and a carrier peptide wherein the flexible linker intervenes between the SNAP-25 peptide and the carrier peptide; (b) collecting from the animal a sample containing an α-SNAP-25 antibody or α-SNAP-25 antibody-producing cell; and (c) isolating the α-SNAP-25 antibody from the sample. In an aspect of this embodiment, the α-SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product is a polyclonal antibody. In another aspect of this embodiment, α-SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product is a monoclonal antibody. In a further aspect of this embodiment, an α-SNAP-25 monoclonal antibody that binds an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P1 residue from the BoNT/A

3NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

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

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

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

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

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

[056] Polyclonal antibodies refer to a heterogeneous population of antibody molecules that contain at least two species of antibody capable of binding to a particular antigen. By definition, a polyclonal antibody includes two different antibodies that bind to at least two different epitopes. As used herein, the term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibodies" refer to a substantially homogeneous population of antibody molecules that contain only one species of antibody capable of binding a particular antigen *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. By definition, a monoclonal antibody binds to a single epitope. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibodies, each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they may be synthesized uncontaminated by other antibodies. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present disclosure may be made by the hybridoma method first described by Kohler et al (1975) Nature 256:495, or may be made by recombinant DNA methods (see for example: U.S. Pat. No. 4,816,567; U.S. Pat. No. 5,807,715). The

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

monoclonal antibodies may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597; for example.

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

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

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

[060] In yet another embodiment, an α-SNAP-25 antibody specifically binds an epitope comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. In an aspect of this embodiment, the epitope comprises SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148. In an aspect of this embodiment, the epitope comprises SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, or SEQ ID NO: 44.

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

[061] As discussed above, the sequence surrounding a BoNT/A cleavage site present in SNAP-25 is denoted P_5–P_4–P_3–P_2–P_1–P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5', with P_1–P_1' representing the scissile bond. Upon cleavage by BoNT/A, the resulting cleavage products produced comprise a fragment including the P_5–P_4–P_3–P_2–P_1 sequence and a fragment including the P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5'. As used herein, the term "α-SNAP-25 antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product" refers to α-SNAP-25 antibodies that selectively bind to any SNAP-25 cleavage product fragment comprising the P_5–P_4–P_3–P_2–P_1 sequence, but not to any SNAP-25 cleavage product fragment comprising the P_1'–P_2'–P_3'–P_4'–P_5' sequence or to any SNAP-25 having an intact P_1–P_1' scissile bond of a BoNT/A cleavage site. As used herein, the term "α-SNAP-25_{197} antibody" refers to an antibody that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus P_1 residue that corresponds to glutamine 197 of SEQ ID NO: 5. As used herein, the term "α-SNAP-25_{204} antibody" refers to an antibody that selectively binds to a SNAP-25 having a carboxyl-terminus P_1 residue that corresponds to lysine 204 of SEQ ID NO: 16.

[062] As used herein, the term "selectively" refers to having a unique effect or influence or reacting in only one way or with only one thing. As used herein, the term "selectively binds," when made in reference to an antibody, refers to the discriminatory binding of the antibody to the indicated target epitope such that the antibody does not substantially cross react with non-target epitopes. The minimal size of a peptide epitope, as defined herein, is about five amino acids, and a peptide epitope typically comprises at least 5, at least 6, at least 7, at least 8, at least 9, at least 10, at least 15, or at least 20 amino acids. A peptide epitope may be discontinuous, *i.e.*, it comprises amino acid residues that are not adjacent in the primary structure of the peptide but are brought together into an epitope by way of the secondary, tertiary, or quaternary structure of the peptide. Furthermore, it is also noted that an epitope might comprise a portion of a molecule other than an amino acid sequence, such as, e.g., a carbohydrate moiety, a lipid moiety like lipoproteins or glycolipids, or a chemically-modified amino acid moiety like a phosphorylated amino acid. In aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can selectively bind a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprising at least 5, at least 6, at least 7, at least 8, at least 9, at least 10, at least 15, or at least 20 amino acids. In other aspects of this embodiment, an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can selectively bind a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond comprising at most 5, at most 6, at most 7, at most 8, at most 9, at most 10, at most 15, or at most 20 amino acids.

[063] Selective binding includes binding properties such as, e.g., binding affinity, binding specificity, and binding avidity. See David J. King, *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*, pp. 240 (1998). Binding affinity refers to the length of time the antibody resides at its epitope binding site, and can be viewed as the strength with which an antibody binds its epitope. Binding affinity can be described an

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_J_>

antibody's equilibrium dissociation constant (KD), which is defined as the ratio Kd/Ka at equillibrium. Where Ka is the antibody's association rate constant and kd is the antibody's dissociation rate constant. Binding affinity is determined by both the association and the dissociation and alone neither high association or low dissociation can ensure high affinity. The association rate constant (Ka), or on-rate constant (Kon), measures the number of binding events per unit time, or the propensity of the antibody and the antigen to associate reversibly into its antibody-antigen complex. The association rate constant is expressed in M^{-1} s^{-1}, and is symbolized as follows: [Ab] x [Ag] x Kon. The larger the association rate constant, the more rapidly the antibody binds to its antigen, or the higher the binding affinity between antibody and antigen. The dissociation rate constant (Kd), or off-rate constant (Koff), measures the number of dissociation events per unit time propensity of an antibody-antigen complex to separate (dissociate) reversibly into its component molecules, namely the antibody and the antigen. The dissociation rate constant is expressed in s^{-1}, and is symbolized as follows: [Ab + Ag] x Koff. The smaller the dissociation rate constant, the more tightly bound the antibody is to its antigen, or the higher the binding affinity between antibody and antigen. The equilibrium dissociation constant (KD) measures the rate at which new antibody-antigen complexes formed equals the rate at which antibody-antigen complexes dissociate at equilibrium. The equilibrium dissociation constant is expressed in M, and is defined as Koff/Kon=[Ab] x [Ag]/[Ab + Ag], where [Ab] is the molar concentration of the antibody, [Ag] is the molar concentration of the antigen, and [Ab + Ag] is the of molar concentration of the antibody-antigen complex, where all concentrations are of such components when the system is at equilibrium. The smaller the equilibrium dissociation constant, the more tightly bound the antibody is to its antigen, or the higher the binding affinity between antibody and antigen.

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

[065] In another embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can have a disassociation rate constant of less than 1×10^{-3} s^{-1}, less than 1×10^{-4} s^{-1}, or less than 1×10^{-5} s^{-1}. In other aspects of this embodiment, the binding affinity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

208

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

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

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

[068] Binding specificity is the ability of an antibody to discriminate between a molecule containing its epitope and a molecule that does not contain that epitope. One way to measure binding specificity is to

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

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

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

[070] The binding specificity of an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can also be characterized as a ratio that such an α-SNAP-25 antibody can discriminate its SNAP-25 epitope relative to a SNAP-25 not comprising that epitope, such as, *e.g.*, a SNAP-25 epitope lacking a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond or a SNAP-25 epitope having an intact P_1–P_1'

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

[071] Binding avidity, also known as functional affinity, refers to the sum total of the functional binding strength between a multivalent antibody and its antigen. Antibody molecules can have more than one binding site (e.g., 2 for IgG, 10 for IgM), and many antigens contain more than one antigenic site. While binding avidity of an antibody depends on the binding affinities of the individual antibody binding sites, binding avidity is greater than the binding affinity as all the antibody-antigen interactions must be broken simultaneously for the antibody to dissociate completely. It is envisioned that an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can selectively bind to any and all epitopes for that antibody.

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

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148.

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

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

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

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

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

[077] The limits of quantitation (LOQ) are the lowest and the highest concentrations of analyte in a sample or specimen that can be measured with an acceptable level of accuracy and precision. The lower limit of quantitation refers to the lowest dose that a detection method can measure consistently from the background. The upper limit of quantitation is the highest dose that a detection method can measure consistently before saturation of the signal occurs. The linear range of the method is the area between the lower and the upper limits of quantitation. The linear range is calculated by subtracting lower limit of quantitation from the upper limit of quantitation. As used herein, the term "signal to noise ratio for the lower asymptote" refers to the signal detected in the method at the lower limit of detection divided by the background signal. As used herein, the term "signal to noise ratio for the upper asymptote" refers to the signal detected in the method at the upper limit of detection divided by the background signal.

[078] Thus, in an embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification can detect the LOQ of BoNT/A at an amount that is significantly different from a negative control or blank. In aspect of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 10 ng or less, 9 ng or less, 8 ng or less, 7 ng or less, 6 ng or less, 5 ng or less, 4 ng or less, 3 ng or less, 2 ng or less, 1 ng or less of a BoNT/A. In still other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 900 pg or less, 800 pg or less, 700 pg or less, 600 pg or less, 500 pg or less, 400 pg or less, 300 pg or less, 200 pg or less, 100 pg or

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

less of a BoNT/A. In further aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 90 pg or less, 80 pg or less, 70 pg or less, 60 pg or less, 50 pg or less, 40 pg or less, 30 pg or less, 20 pg or less, 10 pg or less of a BoNT/A. In other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 9 pg or less, 8 pg or less, 7 pg or less, 6 pg or less, 5 pg or less, 4 pg or less, 3 pg or less, 2 pg or less, 1 pg or less of a BoNT/A. In yet other aspects of this embodiment, the immuno-based method disclosed in the present specification has an LOQ of, *e.g.*, 0.9 pg or less, 0.8 pg or less, 0.7 pg or less, 0.6 pg or less, 0.5 pg or less, 0.4 pg or less, 0.3 pg or less, 0.2 pg or less, 0.1 pg or less of a BoNT/A.

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

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

[081] An immuno-based assay useful to practice aspect of the disclosed methods must have an accuracy of at least 50%. In aspects of this embodiment, an immuno-based assay has an accuracy of at

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

least 50%, at least 60%, at least 70%, or at least 80%. In other aspects of this embodiment, an immuno-based assay has an accuracy of at least 85%, at least 90%, or at least 95%. In other aspects of this embodiment, an immuno-based assay has an accuracy of at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99%.

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

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

[084] The ruggedness of the method is the reproducibility of the test results obtained for identical samples under normal (but variable) test conditions. Robustness of a procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small but deliberate variations in the method parameters and provides an indication of its reliability in normal usage. Thus, whereas ruggedness evaluates unavoidable changes, robustness evaluates deliberate changes. Typical parameters evaluated by ruggedness and robustness include the effects of freeze/thaw, incubation times, incubation temperature, longevity of reagent, sample preparation, sample storage, cell passage number, lots of toxin, variability between purifications, and variability between nicking reactions. Robustness parameters for cell-based assays include the cell bank (beginning, middle and end of freeze), cell passage level, cell seeding density, cell stock density (how many days in culture), cell age in flask (waiting time to seeding), incubation time, different plates, excessive amounts of serum, and source of reagents. The system suitability of the method is the determination of assay performance, including the performance of reagents and instruments, over time by analysis of a reference standard. System suitability is stressed in FDA guidance referring to the fact that equipment, electronics, assay performance, and samples to be

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

215

analyzed, constitute an integrated system. System suitability can be evaluated by testing for parallelism, which is when plotting the log dose versus the response, serial dilutions of the reference and serial dilutions of the samples should give rise to parallel curves.

[085] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a cell from an established cell line. As used herein, the term "cell" refers to any eukaryotic cell susceptible to BoNT/A intoxication by a BoNT/A or any eukaryotic cell that can uptake a BoNT/A. The term cell encompasses cells from a variety of organisms, such as, *e.g.*, murine, rat, porcine, bovine, equine, primate and human cells; from a variety of cell types such as, *e.g.*, neuronal and non-neuronal; and can be isolated from or part of a heterogeneous cell population, tissue or organism. As used herein, the term "established cell line" is synonymous with "immortal cell line," or "transformed cell line" and refers to a cell culture of cells selected for indefinite propagation from a cell population derived from an organism, tissue, or organ source. By definition, an established cell line excludes a cell culture of primary cells. As used herein, the term "primary cells" are cells harvested directly from fresh tissues or organs and do not have the potential to propagate indefinitely. An established cell line can comprise a heterogeneous population of cells or a uniform population of cells. An established cell line derived from a single cell is referred to as a clonal cell line. An established cell line can be one whose cells endogenously express all component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate and encompasses the binding of a BoNT/A to a BoNT/A receptor, the internalization of the neurotoxin/receptor complex, the translocation of the BoNT/A light chain from an intracellular vesicle into the cytoplasm and the proteolytic cleavage of a SNAP-25. Alternatively, an established cell line can be one whose cells have had introduced from an exogenous source at least one component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate and encompasses the binding of a BoNT/A to a BoNT/A receptor, the internalization of the neurotoxin/receptor complex, the translocation of the BoNT/A light chain from an intracellular vesicle into the cytoplasm and the proteolytic cleavage of a SNAP-25. Also refereed to as a genetically-engineered cell line, cells from such an established cell line may, *e.g.*, express an exogenous FGFR2, an exogenous FGFR3, an exogenous SV2, an exogenous SNAP-25, or any combination thereof.

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

)NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

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

[087] Thus in an embodiment, cells from an established cell line are susceptible to BoNT/A intoxication. In aspects of this embodiment, cells from an established cell line are susceptible to BoNT/A intoxication by, *e.g.*, about 500 pM or less, about 400 pM or less, about 300 pM or less, about 200 pM or less, or about 100 pM or less of a BoNT/A. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are susceptible to BoNT/A intoxication by, *e.g.*, about 90 pM or less, about 80 pM or less, about 70 pM or less, about 60 pM or less, about 50 pM or less, about 40 pM or less, about 30 pM or less, about 20 pM or less A, or about 10 pM or less of a BoNT/A. In still other aspects, cells from an established cell line are susceptible to BoNT/A intoxication by, *e.g.*, about 9 pM or less, about 8 pM or less, about 7 pM or less, about 6 pM or less, about 5 pM or less, about 4 pM or less, about 3 pM or less, about 2 pM or less, or about 1 pM or less of a BoNT/A. In yet other aspects, cells from an established cell line are susceptible to BoNT/A intoxication by, *e.g.*, about 0.9 pM or less, about 0.8 pM or less, about 0.7 pM or less, about 0.6 pM or less, about 0.5 pM or less, about 0.4 pM or less, about 0.3 pM or less, about 0.2 pM, or about 0.1 pM or less of a BoNT/A. As used herein, the term "about" when qualifying a value of a stated item, number, percentage, or term refers to a range of plus or minus ten percent of the value of the stated item, percentage, parameter, or term.

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

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

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

[090] As used herein, the term "naturally occurring BoNT/A" refers to any BoNT/A produced by a naturally-occurring process, including, without limitation, BoNT/A isoforms produced from a post-translational modification, an alternatively-spliced transcript, or a spontaneous mutation, and BoNT/A subtypes, such as, *e.g.*, a BoNT/A1 subtype, BoNT/A2 subtype, BoNT/A3 subtype, BoNT/A4 subtype, and BoNT/A5 subtype. A naturally occurring BoNT/A includes, without limitation, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 amino acids from SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4. Commercially available pharmaceutical compositions of a naturally-occurring BoNT/A includes, without limitation, BOTOX® (Allergan, Inc., Irvine, CA), DYSPORT®/RELOXIN®, (Ipsen Ltd., Slough, England), PURTOX® (Mentor Corp., Santa Barbara, CA), XEOMIN® (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Germany), NEURONOX® (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, South Korea), BTX-A.

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

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

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4. In other aspects of this embodiment, the BoNT/A activity being detected is from BOTOX®, DYSPORT®/RELOXIN®, PURTOX®, XEOMIN®, NEURONOX®, or BTX-A.

[093] In another embodiment, the BoNT/A activity being detected is from a non-naturally occurring BoNT/A. In other aspects of this embodiment, the BoNT/A activity being detected is from a non-naturally occurring BoNT/A variant having, e.g., at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4. In other aspects of this embodiment, the BoNT/A activity being detected is from a non-naturally occurring BoNT/A variant having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4. In yet other aspects of this embodiment, the BoNT/A activity being detected is from a non-naturally occurring BoNT/A variant having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4.

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

[095] As used herein, the term "naturally occurring SNAP-25" refers to any SNAP-25 produced by a naturally-occurring process, including, without limitation, SNAP-25 isoforms produced from a post-translational modification, an alternatively-spliced transcript, or a spontaneous mutation, and SNAP-25 subtypes. A naturally occurring SNAP-25 includes, without limitation, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24.

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

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

[098] In another embodiment, a SNAP-25 is a non-naturally occurring SNAP-25. In other aspects of this embodiment, the SNAP-25 is a non-naturally occurring SNAP-25 having, e.g., at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4. In other aspects of this embodiment, the SNAP-25 is a non-naturally occurring SNAP-25 having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO:

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

220

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

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

[0100] As used herein, the term "exogenous SNAP-25" refers to a SNAP-25 expressed in a cell through the introduction of an external source of SNAP-25 or an external source of genetic material encoding a SNAP-25 by human manipulation. The expression of an exogenous SNAP-25 may be with or without environmental stimulation such as, *e.g.*, cell differentiation. As a non-limiting example, cells from an established cell line can express an exogenous SNAP-25 by transient or stably transfection of a SNAP-25. As another non-limiting example, cells from an established cell line can express an exogenous SNAP-25 by protein transfection of a SNAP-25. An exogenous SNAP-25 can be a naturally-occurring SNAP-25 or variants thereof, or a non-naturally occurring SNAP-25 or variants thereof.

[0101] Thus in an embodiment, cells from an established cell line express an endogenous SNAP-25. In aspects of this embodiment, the endogenous SNAP-25 expressed by cells from an established cell line is a naturally-occurring SNAP-25. In other aspects of this embodiment, the endogenous SNAP-25 expressed by cells from an established cell line is SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24. In yet aspects of this embodiment, the endogenous SNAP-25 expressed by cells from an established cell line is a naturally occurring SNAP-25, such as, *e.g.*, a SNAP-25 isoform or a SNAP-25 subtype. In other aspects of this embodiment, the endogenous SNAP-25 expressed by cells from an established cell line is a naturally occurring SNAP-25 having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24.

[0102] In another embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express an exogenous SNAP-25. In an aspect of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally-occurring SNAP-25. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express the naturally-occurring SNAP-25 of SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally occurring SNAP-25, such as, *e.g.*, a SNAP-25 isoform or a SNAP-25 subtype. In still other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally occurring SNAP-25 having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24.

[0103] In another aspect of the embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring SNAP-25. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring SNAP-25 having, e.g., at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring SNAP-25 having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring SNAP-25 having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

222

more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, or SEQ ID NO: 24.

[0104] Assays that detect the cleavage of a BoNT/A substrate after exposure to a BoNT/A can be used to assess whether a cell is expressing an endogenous or exogenous SNAP-25. In these assays, generation of a SNAP-25 cleavage-product would be detected in cells expressing a SNAP-25 after BoNT/A treatment. Non-limiting examples of specific Western blot analysis, as well as well-characterized reagents, conditions and protocols are readily available from commercial vendors that include, without limitation, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, and Stratagene, Inc., La Jolla, CA. It is understood that these and similar assays for SNAP-25 cleavage can be useful in identifying cells expressing an endogenous or an exogenous SNAP-25.

[0105] As non-limiting examples, Western blot analysis using an antibody that recognizes BoNT/A SNAP-25-cleaved product or both the cleaved and uncleaved forms of SNAP-25 can be used to assay for uptake of BoNT/A. Examples of α-SNAP-25 antibodies useful for these assays include, without limitation, α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), mouse α-SNAP-25 monoclonal antibody Cl 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody Cl 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody SP12 (Abcam, Cambridge, MA), α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum (Abcam, Cambridge, MA), and α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum S9684 (Sigma, St Louis, MO).

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

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

its receptor, or the higher the binding affinity between BoNT/A and BoNT/A receptor. In aspects of this embodiment, the disassociation constant of BoNT/A for a BoNT/A receptor is at least two orders of magnitude less, at least three orders of magnitude less, at least four orders of magnitude less, or at least five orders of magnitude less than that of BoNT/A for any other receptor. In other aspects of this embodiment, the binding affinity of a BoNT/A that preferentially interacts with a BoNT/A receptor can have an equilibrium disassociation constant (KD) of, *e.g.*, of 500 nM or less, 400 nM or less, 300 nM or less, 200 nM, or less 100 nM or less. In other aspects of this embodiment, the binding affinity of a BoNT/A that preferentially interacts with a BoNT/A receptor can have an equilibrium disassociation constant (KD) of, *e.g.*, of 90 nM or less, 80 nM or less, 70 nM or less, 60 nM, 50 nM or less, 40 nM or less, 30 nM or less, 20 nM, or less 10 nM or less. As used herein, the term "elicits a BoNT/A intoxication response" refers to the ability of a BoNT/A receptor to interact with a BoNT/A to form a neurotoxin/receptor complex and the subsequent internalization of that complex into the cell cytoplasm.

[0107] As used herein, the term "naturally occurring BoNT/A receptor" refers to any BoNT/A receptor produced by a naturally-occurring process, including, without limitation, BoNT/A receptor isoforms produced from a post-translational modification, an alternatively-spliced transcript, or a spontaneous mutation, and BoNT/A receptor subtypes. A naturally occurring BoNT/A receptor includes, without limitation, a fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), a fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3), a synaptic vesicle glycoprotein 2 (SV2), and a complex ganglioside like GT1b, such as those described in Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays*, U.S. Patent Publication 2008/0003240; Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays*, U.S. Patent Publication 2008/0182799; Min Dong et al., *SV2 is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A*, Science (2006); S. Mahrhold et al, *The Synaptic Vesicle Protein 2C Mediates the Uptake of Botulinum Neurotoxin A into Phrenic Nerves*, 580(8) FEBS Lett. 2011-2014 (2006), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. A naturally occurring FGFR2 includes, without limitation, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, and SEQ ID NO: 70, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, and SEQ ID NO: 70. A naturally occurring FGFR3 includes, without limitation, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, and SEQ ID NO: 27, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, and SEQ ID NO: 27. A naturally occurring SV2 includes, without limitation, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, and SEQ ID NO: 31, or one that substitutes, deletes or adds, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, and SEQ ID NO: 31.

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

[0109] As used herein, the term "non-naturally occurring BoNT/A receptor" refers to any BoNT/A receptor whose structure was modified with the aid of human manipulation, including, without limitation, a BoNT/A receptor produced by genetic engineering using random mutagenesis or rational design and a BoNT/A receptor produced by in vitro chemical synthesis. Non-limiting examples of non-naturally occurring BoNT/A receptors are described in, *e.g.*, Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays*, U.S. Patent Publication 2008/0003240; Ester Fernandez-Salas, et al., *Botulinum Toxin Screening Assays*, U.S. Patent Publication 2008/0182799, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. A non-naturally occurring BoNT/A receptor may substitute, delete or add, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more amino acids from SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70.

[0110] Thus in an embodiment, a BoNT/A receptor is a naturally occurring BoNT/A receptor such as, e.g., FGFR2, FGFR3 or SV2. In aspects of this embodiment, the BoNT/A receptor is a BoNT/A receptor isoform or a BoNT/A receptor subtype. In aspects of this embodiment, the naturally occurring BoNT/A receptor is the naturally occurring BoNT/A receptor of SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In other aspects of this embodiment, the BoNT/A receptor is a naturally occurring BoNT/A receptor having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70.

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

3NSDOCID: <WO____2009114748A1 I_>

225

amino acid identity with SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In other aspects of this embodiment, the BoNT/A receptor is a non-naturally occurring BoNT/A receptor having, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In yet other aspects of this embodiment, the BoNT/A receptor is a non-naturally occurring BoNT/A receptor having, *e.g.*, 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70.

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

[0113] As used herein, the term "exogenous BoNT/A receptor" refers to a BoNT/A receptor expressed in a cell through the introduction of an external source of BoNT/A receptor or an external source of genetic material encoding a BoNT/A receptor by human manipulation. The expression of an exogenous BoNT/A receptor may be with or without environmental stimulation such as, e.g., cell differentiation or promoter activation. As a non-limiting example, cells from an established cell line can express one or more exogenous BoNT/A receptors by transient or stably transfection of a polynucleotide molecule encoding a BoNT/A receptor, such as, e.g., a FGFR2, a FGFR3, or a SV2. As another non-limiting example, cells from an established cell line can express one or more exogenous BoNT/A receptors by protein transfection of the BoNT/A receptors, such as, e.g., a FGFR2, a FGFR3, or a SV2. An exogenous

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

[0114] Thus in an embodiment, cells from an established cell line express an endogenous BoNT/A receptor. In aspects of this embodiment, the endogenous BoNT/A receptor expressed by cells from an established cell line is a naturally-occurring BoNT/A receptor. In other aspects of this embodiment, the endogenous BoNT/A receptor expressed by cells from an established cell line is SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In yet aspects of this embodiment, the endogenous BoNT/A receptor expressed by cells from an established cell line is a naturally occurring BoNT/A receptor, such as, *e.g.*, a BoNT/A receptor isoform or a BoNT/A receptor subtype. In other aspects of this embodiment, the endogenous BoNT/A receptor expressed by cells from an established cell line is a naturally occurring BoNT/A receptor having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70.

[0115] In another embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express an exogenous BoNT/A receptor. In an aspect of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally-occurring BoNT/A receptor. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express the naturally-occurring BoNT/A receptor of SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally occurring BoNT/A receptor, such as, *e.g.*, a BoNT/A receptor isoform or a BoNT/A receptor subtype. In still other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a naturally occurring BoNT/A receptor having, e.g., at least 70% amino acid identity, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70.

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

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring BoNT/A receptor having, e.g., at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring BoNT/A receptor having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more non-contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70. In yet other aspects of this embodiment, cells from an established cell line are transiently or stably engineered to express a non-naturally occurring BoNT/A receptor having, e.g., 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, 20 or more, 30 or more, 40 or more, 50 or more, or 100 or more contiguous amino acid substitutions, deletions, or additions relative to SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, or SEQ ID NO: 70

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

[0118] Cells that express one or more endogenous or exogenous BoNT/A receptors can be identified by routine methods including direct and indirect assays for toxin uptake. Assays that determine BoNT/A binding or uptake properties can be used to assess whether a cell is expressing a BoNT/A receptor. Such assays include, without limitation, cross-linking assays using labeled BoNT/A, such as, e.g., [125I] BoNT/A, [125I], see, e.g., Noriko Yokosawa et al., *Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines*, 57(1) Infect. Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa et al., *Binding*

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

228

of botulinum type Cl, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes, 29(2) Toxicon 261-264 (1991); and Tei-ichi Nishiki et al., *Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes*, 269(14) J. Biol. Chem. 10498-10503 (1994). Other non-limiting assays include immunocytochemical assays that detect BoNT/A binding using labeled or unlabeled antibodies, see, e.g., Atsushi Nishikawa et al., *The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells*, 319(2) Biochem. Biophys. Res. Commun. 327-333 (2004) and immunoprecipitation assays, see, e.g., Yukako Fujinaga et al., *Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes*, 150(Pt 5) Microbiology 1529-1538 (2004), that detect bound toxin using labeled or unlabeled antibodies. Antibodies useful for these assays include, without limitation, antibodies selected against BoNT/A, antibodies selected against a BoNT/A receptor, such as, e.g., FGFR2, FGFR3, or SV2, and/or antibodies selected against a ganglioside, such as, e.g., GD1a, GD1b, GD3, GQ1b, or GT1b. If the antibody is labeled, the binding of the molecule can be detected by various means, including Western blot analysis, direct microscopic observation of the cellular location of the antibody, measurement of cell or substrate-bound antibody following a wash step, flow cytometry, electrophoresis or capillary electrophoresis, employing techniques well-known to those of skill in the art. If the antibody is unlabeled, one may employ a labeled secondary antibody for indirect detection of the bound molecule, and detection can proceed as for a labeled antibody. It is understood that these and similar assays that determine BoNT/A uptake properties or characteristics can be useful in identifying cells expressing endogenous or exogenous or BoNT/A receptors.

[0119] Assays that monitor the release of a molecule after exposure to BoNT/A can also be used to assess whether a cell is expressing one or more endogenous or exogenous BoNT/A receptors. In these assays, inhibition of the molecule's release would occur in cells expressing a BoNT/A receptor after BoNT/A treatment. Well known assays include methods that measure inhibition of radio-labeled catecholamine release from neurons, such as, e.g., [3H] noradrenaline or [3H] dopamine release, see e.g., A Fassio et al., *Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F*, 90(3) Neuroscience 893-902 (1999); and Sara Stigliani et al., *The sensitivity of catecholamine release to botulinum toxin C1 and E suggests selective targeting of vesicles set into the readily releasable pool*, 85(2) J. Neurochem. 409-421 (2003), or measures catecholamine release using a fluorometric procedure, see, e.g., Anton de Paiva et al., *A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly*, 268(28) J. Biol. Chem. 20838-20844 (1993); Gary W. Lawrence et al., *Distinct exocytotic responses of intact and permeabilised chromaffin cells after cleavage of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) or synaptobrevin by botulinum toxin A or B*, 236(3) Eur. J. Biochem. 877-886 (1996); and Patrick Foran et al., *Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release*, 35(8) Biochemistry 2630-2636 (1996). Other non-limiting examples include assays that measure inhibition of hormone release from endocrine cells,

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

such as, e.g., anterior pituitary cells or ovarian cells. It is understood that these and similar assays for molecule release can be useful in identifying cells expressing endogenous or exogenous or BoNT/A receptors.

[0120] Assays that detect the cleavage of a BoNT/A substrate after exposure to a BoNT/A can also be used to assess whether a cell is expressing one or more endogenous or exogenous BoNT/A receptors. In these assays, generation of a BoNT/A substrate cleavage-product, or disappearance of the intact BoNT/A substrate, would be detected in cells expressing a BoNT/A receptor after BoNT/A treatment. Non-limiting examples of specific Western blot analysis, as well as well-characterized reagents, conditions and protocols are readily available from commercial vendors that include, without limitation, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI, and Stratagene, Inc., La Jolla, CA. It is understood that these and similar assays for BoNT/A substrate cleavage can be useful in identifying cells expressing endogenous or exogenous BoNT/A receptors.

[0121] As non-limiting examples, Western blot analysis using an antibody that recognizes BoNT/A SNAP-25-cleaved product or both the cleaved and uncleaved forms of SNAP-25 can be used to assay for uptake of BoNT/A. Examples of α-SNAP-25 antibodies useful for these assays include, without limitation, SMI-81 α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), CI 71.1 mouse α-SNAP-25 monoclonal antibody (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), CI 71.2 α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), SP12 α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody (Abcam, Cambridge, MA), α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum S9684 (Sigma, St. Louis, MO), and α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum (Abcam, Cambridge, MA).

[0122] Aspects of the present disclosure provide cells that through genetic manipulation or recombinant engineering are made to expresses an exogenous SNAP-25 and/or one or more exogenous BoNT/A receptors. Cells useful to express an exogenous SNAP-25 and/or one or more exogenous BoNT/A receptors through genetic manipulation or recombinant engineering include neuronal cells and non-neuronal cells that may or may not express an endogenous SNAP-25 and/or one or more endogenous BoNT/A receptors. It is further understood that such genetically manipulated or recombinantly engineered cells may express an exogenous SNAP-25 and one or more exogenous BoNT/A receptors under control of a constitutive, tissue-specific, cell-specific or inducible promoter element, enhancer element or both. It is understood that any cell is useful as long as the cell can be genetically manipulated or recombinantly engineered to expresses an exogenous SNAP-25 and/or one or more exogenous BoNT/A receptors and is capable of undergoing BoNT/A intoxication.

[0123] Methods useful for introducing into a cell an exogenous polynucleotide molecule encoding a component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate, such as, e.g., a SNAP-25, a FGFR2, a FGFR3, or a SV2, include, without limitation, chemical-mediated delivery methods, such as, e.g., calcium phosphate-mediated, diethyl-aminoethyl (DEAE) dextran-mediated, lipid-mediated, polyethyleneimine (PEI)-mediated, polylysine-mediated and polybrene-mediated; physical-mediated delivery methods, such as, e.g., biolistic particle delivery, microinjection, protoplast fusion and electroporation; and viral-mediated delivery methods, such as, e.g., retroviral-mediated transfection, see e.g., *Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells*, pp. 16.1-16.62 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001); Alessia Colosimo et al., *Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells*, 29(2) Biotechniques 314-318, 320-322, 324 (2000); Philip Washbourne & A. Kimberley McAllister, *Techniques for Gene Transfer into Neurons*, 12(5) Curr. Opin. Neurobiol. 566-573 (2002); and Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, pp 9.16.4-9.16.11 (2000), each of which is incorporated by reference in its entirety. One skilled in the art understands that selection of a specific method to introduce a polynucleotide molecule into a cell will depend, in part, on whether the cell will transiently or stably contain a component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate. Non-limiting examples of polynucleotide molecule encoding a component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate as as follows: FGFR2 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, or SEQ ID NO: 138; FGFR3 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, or SEQ ID NO: 141; SV2 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, or SEQ ID NO: 144; and SNAP-25 polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 145, or SEQ ID NO: 146.

[0124] Chemical-mediated delivery methods are well-known to a person of ordinary skill in the art and are described in, e.g., Martin Jordan & Florian Worm, *Transfection of Adherent and Suspended Cells by Calcium Phosphate*, 33(2) Methods 136-143 (2004); Chun Zhang et al., *Polyethylenimine Strategies for Plasmid Delivery to Brain-Derived Cells*, 33(2) Methods 144-150 (2004), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. Such chemical-mediated delivery methods can be prepared by standard procedures and are commercially available, see, e.g., CellPhect Transfection Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); Mammalian Transfection Kit, Calcium phosphate and DEAE Dextran, (Stratagene, Inc., La Jolla, CA); Lipofectamine™ Transfection Reagent (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA); ExGen 500 Transfection kit (Fermentas, Inc., Hanover, MD), and SuperFect and Effectene Transfection Kits (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

[0125] Physical-mediated delivery methods are well-known to a person of ordinary skill in the art and are described in, e.g., Jeike E. Biewenga et al., *Plasmid-Mediated Gene Transfer in Neurons using the Biolistics Technique*, 71(1) J. Neurosci. Methods. 67-75 (1997); John O'Brien & Sarah C. R. Lummis, *Biolistic and Diolistic Transfection: Using the Gene Gun to Deliver DNA and Lipophilic Dyes into Mammalian Cells*, 33(2) Methods 121-125 (2004); M. Golzio et al., *In Vitro and In Vivo Electric Field-*

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

Mediated Permeabilization, Gene Transfer, and Expression, 33(2) Methods 126-135 (2004); and Oliver Greschet al., *New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells*, 33(2) Methods 151-163 (2004), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0126] Viral-mediated delivery methods are well-known to a person of ordinary skill in the art and are described in, *e.g.*, Chooi M. Lai et al., *Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors*, 21(12) DNA Cell Biol. 895-913 (2002); Ilya Frolov et al., *Alphavirus-Based Expression Vectors: Strategies and Applications*, 93(21) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 11371-11377 (1996); Roland Wolkowicz et al., *Lentiviral Vectors for the Delivery of DNA into Mammalian Cells*, 246 Methods Mol. Biol. 391-411 (2004); A. Huser & C. Hofmann, *Baculovirus Vectors: Novel Mammalian Cell Gene-Delivery Vehicles and Their Applications*, 3(1) Am. J. Pharmacogenomics 53-63 (2003); Tiziana Tonini et al., *Transient Production of Retroviral- and Lentiviral-Based Vectors for the Transduction of Mammalian Cells*, 285 Methods Mol. Biol. 141-148 (2004); Manfred Gossen & Hermann Bujard, *Tight Control of Gene Expression in Eukaryotic Cells by Tetracycline-Responsive Promoters*, U.S. Patent No. 5,464,758; Hermann Bujard & Manfred Gossen, *Methods for Regulating Gene Expression*, U.S. Patent No. 5,814,618; David S. Hogness, *Polynucleotides Encoding Insect Steroid Hormone Receptor Polypeptides and Cells Transformed With Same*, U.S. Patent No. 5,514,578; David S. Hogness, *Polynucleotide Encoding Insect Ecdysone Receptor*, U.S. Patent 6,245,531; Elisabetta Vegeto et al., *Progesterone Receptor Having C. Terminal Hormone Binding Domain Truncations*, U.S. Patent No. 5,364,791; Elisabetta Vegeto et al., *Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy*, U.S. Patent No. 5,874,534, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. Such viral-mediated delivery methods can be prepared by standard procedures and are commercially available, see, e.g., ViraPower™ Adenoviral Expression System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) and ViraPower™ Adenoviral Expression System Instruction Manual 25-0543 version A, Invitrogen, Inc., (Jul. 15, 2002); and AdEasy™ Adenoviral Vector System (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) and AdEasy™ Adenoviral Vector System Instruction Manual 064004f, Stratagene, Inc. Furthermore, such viral delivery systems can be prepared by standard methods and are commercially available, see, e.g., BD™ Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems (BD Biosciences-Clonetech, Palo Alto, CA) and BD™ Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems User Manual, PT3001-1, BD Biosciences Clonetech, (Mar. 14, 2003), GeneSwitch™ System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) and GeneSwitch™ System A Mifepristone-Regulated Expression System for Mammalian Cells version D, 25-0313, Invitrogen, Inc., (Nov. 4, 2002); ViraPower™ Lentiviral Expression System (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) and ViraPower™ Lentiviral Expression System Instruction Manual 25-0501 version E, Invitrogen, Inc., (Dec. 8, 2003); and Complete Control® Retroviral Inducible Mammalian Expression System (Stratagene, La Jolla, CA) and Complete Control® Retroviral Inducible Mammalian Expression System Instruction Manual, 064005e.

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

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

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

[0129] As mentioned above, an exogenous component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate, such as, *e.g.*, a SNAP-25, a FGFR2, a FGFR3, or a SV2 disclosed in the present specification can be introduced into a cell. Any and all methods useful for introducing such an exogenous component with a delivery agent into

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

232

a cell population can be useful with the proviso that this method transiently introduces the exogenous component disclosed in the present specification in at least 50% of the cells within a given cell population. Thus, aspects of this embodiment can include a cell population in which, e.g., at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, or at least 90% of the given cell population transiently contains an exogenous component necessary for the cells to undergo the overall cellular mechanism whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate, such as, *e.g.*, a SNAP-25, a FGFR2, a FGFR3, or a SV2 disclosed in the present specification. As used herein, the term "delivery agent" refers to any molecule that enables or enhances internalization of a covalently-linked, non-covalently-linked or in any other manner associated with a polypeptide into a cell. Thus, the term "delivery agent" encompasses, without limitation, proteins, peptides, peptidomimetics, small molecules, polynucleotide molecules, liposomes, lipids, viruses, retroviruses and cells that, without limitation, transport a covalently or non-covalently linked molecule to the cell membrane, cell cytoplasm or nucleus. It further is understood that the term "delivery agent" encompasses molecules that are internalized by any mechanism, including delivery agents which function via receptor mediated endocytosis and those which are independent of receptor mediated endocytosis.

[0130] A delivery agent can also be an agent that enables or enhances cellular uptake of a covalently linked component, like FGFR2, FGFR3, SV2, or SNAP-25, such as, *e.g.*, by chemical conjugation or by genetically produced fusion proteins. Methods that covalently link delivery agents and methods of using such agents are described in, e.g., Steven F. Dowdy, *Protein Transduction System and Methods of Use Thereof*, International Publication No WO 00/34308; Gérard Chassaing & Alain Prochiantz, *Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules*, U.S. Patent No. 6,080,724; Alan Frankel et al., *Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiert*, U.S. Patent No. 5,674,980; Alan Frankel et al., *TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates*, U.S. Patent No. 5,747,641; Alan Frankel et al., *TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins*, U.S. Patent No. 5,804,604; Peter F. J. O'Hare et al., *Use of Transport Proteins*, U.S. Patent No. 6,734,167; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, U.S. Patent No. 5,807,746; Yao-Zhong Lin & Jack J. Hawiger, *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, U.S. Patent No. 6,043,339; Yao-Zhong Lin et al., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, U.S. Patent No. 6,248,558; Yao-Zhong Lin et al., Sequence and Method for Genetic *Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, U.S. Patent No. 6,432,680; Jack J. Hawiger et al., *Method for Importing Biologically Active Molecules into Cells*, U.S. Patent No. 6,495,518; Yao-Zhong Lin et al., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, U.S. Patent No. 6,780,843; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, U.S. Patent No. 6,306,993; Jonathan B. Rothbard & Paul A Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, U.S. Patent No. 6,495,663; and Pamela B. Davis et al., *Fusion Proteins for Protein Delivery*, U.S. Patent No. 6,287,817; each of which is incorporated by reference in its entirety.

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

[0131] A delivery agent can also be an agent that enables or enhances cellular uptake of a non-covalently associated component, like FGFR2, FGFR3, SV2c, or SNAP-25. Methods that function in the absence of covalent linkage and methods of using such agents are described in, e.g., Gilles Divita et al, *Peptide-Mediated Transfection Agents and Methods of Use*, U.S. Patent No. 6,841,535; Philip L Felgner and Olivier Zelphati, *Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use*, U.S. Patent Publication No. 2003/0008813; and Michael Karas, *Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids*, U.S. Patent Publication 2004/0209797, each of which is incorporated by reference in its entirety. Such peptide delivery agents can be prepared and used by standard methods and are commercially available, see, e.g. the CHARIOT™ Reagent (Active Motif, Carlsbad, CA); BIO-PORTER® Reagent (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA), BIO TREK™ Protein Delivery Reagent (Stratagene, La Jolla, CA), and PRO-JECT™ Protein Transfection Reagent (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

[0132] Aspects of the present disclosure comprise, in part, a sample comprising a BoNT/A. As used herein, the term "sample comprising a BoNT/A" refers to any biological matter that contains or potentially contains an active BoNT/A. A variety of samples can be assayed according to a method disclosed in the present specification including, without limitation, purified, partially purified, or unpurified BoNT/A; recombinant single chain or di-chain toxin with a naturally or non-naturally occurring sequence; recombinant BoNT/A with a modified protease specificity; recombinant BoNT/A with an altered cell specificity; bulk BoNT/A; a formulated BoNT/A product, including, *e.g.*, BOTOX®, DYSPORT®/RELOXIN®, XEOMIN®, PURTOX®, NEURONOX®, BTX-A and; cells or crude, fractionated or partially purified cell lysates from, *e.g.*, bacteria, yeast, insect, or mammalian sources; blood, plasma or serum; raw, partially cooked, cooked, or processed foods; beverages; animal feed; soil samples; water samples; pond sediments; lotions; cosmetics; and clinical formulations. It is understood that the term sample encompasses tissue samples, including, without limitation, mammalian tissue samples, livestock tissue samples such as sheep, cow and pig tissue samples; primate tissue samples; and human tissue samples. Such samples encompass, without limitation, intestinal samples such as infant intestinal samples, and tissue samples obtained from a wound. As non-limiting examples, a method of detecting picomolar amounts of BoNT/A activity can be useful for determining the presence or activity of a BoNT/A in a food or beverage sample; to assay a sample from a human or animal, for example, exposed to a BoNT/A or having one or more symptoms of botulism; to follow activity during production and purification of bulk BoNT/A; to assay a formulated BoNT/A product used in pharmaceutical or cosmetics applications; or to assay a subject's blood serum for the presence or absence of neutralizing α-BoNT/A antibodies.

[0133] Thus, in an embodiment, a sample comprising a BoNT/A is a sample comprising any amount of a BoNT/A. In aspects of this embodiment, a sample comprising a BoNT/A comprises about 100 ng or less, about 10 ng or less, about 1 ng or less, about 100 pg or less, about 10 pg or less, or about 1 pg or less of a BoNT/A. In other aspects of this embodiment, a sample comprising a BoNT/A comprises about 1 μM or

)NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

[0134] Aspects of the present disclosure comprise, in part, isolating from the treated cell a SNAP-25 component comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. As used herein, the term "SNAP-25 component comprising a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond" refers to a cellular component containing the SNAP-25 cleavage product. It is envisioned that any method suitable for enriching or isolating a SNAP-25 component can be useful, including, without limitation, cell lysing protocols, spin-column purification protocols, immunoprecipitation, affinity purification, and protein chromatography.

[0135] Aspects of the present disclosure comprise, in part, an α-SNAP-25 antibody linked to a solid phase support. As used herein, the term "solid-phase support" is synonymous with "solid phase" and refers to any matrix that can be used for immobilizing an α-SNAP-25 antibody disclosed in the present specification. Non-limiting examples of solid phase supports include, e.g., a tube; a plate; a column; pins or "dipsticks"; a magnetic particle, a bead or other spherical or fibrous chromatographic media, such as, e.g., agarose, sepharose, silica and plastic; and sheets or membranes, such as, e.g., nitrocellulose and polyvinylidene fluoride (PVDF). The solid phase support can be constructed using a wide variety of materials such as, *e.g.*, glass, carbon, polystyrene, polyvinylchloride, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, diazocellulose, or starch. The solid phase support selected can have a physical property that renders it readily separable from soluble or unbound material and generally allows unbound materials, such as, e.g., excess reagents, reaction by-products, or solvents, to be separated or otherwise removed (by, *e.g.*, washing, filtration, centrifugation, etc.) from solid phase support-bound assay component. Non-limiting examples of how to make and use a solid phase supports are described in, e.g., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, *supra*, (2001); and Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, (2004), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0136] Aspects of the present disclosure comprise, in part, detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. It is envisioned that any detection system can be used to practice aspects of this disclosed immuno-based method, with the provision that the signal to noise ratio can distinguish to a statistically significant degree the signal from the antibody-antigen complex from the background signal. Non-limiting examples of immuno-based detection systems include immunoblot analysis, like Western blotting and dot-blotting, immunoprecipitation analysis, enzyme-linked immunosorbent analysis (ELISA), and sandwich ELISA. The detection of the signal can be achieved using autoradiography with imaging or phosphorimaging (AU), chemiluminescense (CL), electrochemiluminescence (ECL), bioluminescence (BL), fluorescence,

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

resonance energy transfer, plane polarization, colormetric, or flow cytometry (FC). Descriptions of immuno-based detection systems are disclosed in, e.g., Michael M.Rauhut, Chemiluminescence, In Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3rd ed, John Wiley and Sons, 1985); A. W. Knight, *A Review of Recent Trends in Analytical Applications of Electrogenerated Chemiluminescence*, Trends Anal. Chem. 18(1): 47-62 (1999); K. A. Fahnrich, et al., *Recent Applications of Electrogenerated Chemiluminescence in Chemical Analysis*, Talanta 54(4): 531-559 (2001); *Commonly Used Techniques in Molecular Cloning*, pp. A8.1-A8-55 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001); *Detection Systems*, pp. A9.1-A9-49 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3rd ed. 2001); Electrogenerated Chemiluminescence, (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0137] A sandwich ELISA (or sandwich immunoassay) is a method based on two antibodies, which bind to different epitopes on the antigen. A capture antibody having a high binding specificity for the antigen of interest, is bound to a solid surface. The antigen is then added followed by addition of a second antibody referred to as the detection antibody. The detection antibody binds the antigen to a different epitope than the capture antibody. The antigen is therefore 'sandwiched' between the two antibodies. The antibody binding affinity for the antigen is usually the main determinant of immunoassay sensitivity. As the antigen concentration increases the amount of detection antibody increases leading to a higher measured response. To quantify the extent of binding different reporter systems can be used, such as, e.g., an enzyme attached to the secondary antibody and a reporter substrate where the enzymatic reaction forms a readout as the detection signal. The signal generated is proportional to the amount of target antigen present in the sample. The reporter substrate used to measure the binding event determines the detection mode. A spectrophotometric plate reader is used for colorimetric detection. Chemiluminescent and electrochemiluminescence substrates have been developed which further amplify the signal and can be read on a luminescent reader. The reporter can also be a fluorescent readout where the enzyme step of the assay is replaced with a fluorophore and the readout is then measured using a fluorescent reader. Reagents and protocols necessary to perform an ECL sandwich ELISA are commercially available, including, without exception, MSD sandwich ELISA-ECL detection platform (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

[0138] Thus, in an embodiment, detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody that selectively binds to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond can be performed using an immuno-blot analysis, an immunoprecipitation analysis, an ELISA, or a sandwich ELISA. In aspects of this embodiment, the detection is performed using a AU, CL, ECL, or BL immuno-blot analysis, a AU, CL, ECL, BL, or FC immunoprecipitation analysis, a AU, CL, ECL, BL, or FC ELISA, or a AU, CL, ECL, BL, or FC sandwich ELISA.

3NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

[0139] Aspects of the present disclosure can be practiced in a singleplex or multiplex fashion. An immuno-based method of detecting BoNT/A activity practiced in a single-plex fashion is one that only detects the presence of an antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. An immuno-based method of detecting BoNT/A activity practiced in a multiplex fashion is one that concurrently detects the presence of two or more antibody-antigen complexes; one of which is the antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond; and the other(s) of which is antibody-antigen complex to a second, third, fourth,etc. different protein. A second protein can be used, *e.g.*, as an internal control to minimize sample to sample variability by normalizing the amount of α-SNAP-25/SNAP-25 antibody-antigen complex detected to the amount of antibody-antigen complex detected for the second protein. As such, the second protein is usually one that is consistently expressed by the cell, such as a house-keeping protein. Non-limiting examples of a useful second protein, include, *e.g.*, a Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), Syntaxin, cytokines. Methods of performing an immuno-based assay in a multiplex fashion are described in, e.g., U. B. Nielsen and B. H. Geierstanger, *Multiplexed Sandwich Assays in Microarray Format*, J. Immunol. Methods. 290(1-2): 107-120 2004); R. Barry and M, Soloviev, *Quantitative Protein Profiling using Antibody Arrays*, Proteomics, 4(12): 3717-3726 (2004); M. M. Ling et al., *Multiplexing Molecular Diagnostics and Immunoassays using Emerging Microarray Technologies*, Expert Rev Mol Diagn. 7(1): 87-98 (2007); S. X. Leng et al., *ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research*, J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63(8): 879-884 (2008), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0140] Thus, in one embodiment, an immuno-based method of detecting BoNT/A activity practiced in a single-plex fashion by only detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. In another embodiment, immuno-based method of detecting BoNT/A activity practiced in a multiplex fashion by concurrently detecting the presence of an antibody-antigen complex comprising an α-SNAP-25 antibody and a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond and at least one other antibody-antigen complex to a protein other than SNAP-25, such as, *e.g.*, GAPDH or Syntaxin.

[0141] Aspects of the present disclosure provide, in part, a method of determining BoNT/A immunoresistance. As used herein, the term "BoNT/A immunoresistance" means a mammal that does not fully respond to a BoNT/A therapy, or shows a reduced beneficial effect of a BoNT/A therapy because the immune response of that mammal, either directly or indirectly, reduces the efficacy of the therapy. A non-limiting example of reduced efficacy would be the presence in a mammal of at least one neutralizing α-BoNT/A antibody that binds to a BoNT/A toxin in a manner that reduces or prevents the specificity or activity of the toxin. As used herein, the term "BoNT/A therapy" means a treatment, remedy, cure,

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

healing, rehabilitation or any other means of counteracting something undesirable in a mammal requiring neuromodulation using a BoNT/A toxin or administering to a mammal one or more controlled doses of a medication, preparation or mixture of a BoNT/A toxin that has medicinal, therapeutic, curative, cosmetic, remedial or any other beneficial effect. BoNT/A therapy encompasses, without limitation, the use of any naturally occurring or modified fragment thereof, in any formulation, combined with any carrier or active ingredient and administered by any route of administration. An exemplary, well-known BoNT/A therapy is a BOTOX® therapy.

[0142] Aspects of the present disclosure provide, in part, a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α-BoNT/A neutralizing antibodies. As used herein, the term "test sample" refers to any biological matter that contains or potentially contains at least one α-BoNT/A antibody. An α-BoNT/A antibody can be a neutralizing anti-BoNT/A antibody or a non-neutralizing anti-BoNT/A antibody. As used herein, the term "neutralizing anti-BoNT/A antibodies" means any α-BoNT/A antibody that will, under physiological conditions, bind to a region of a BoNT/A toxin in such a manner as to reduce or prevent the toxin from exerting its effect in a BoNT/A therapy. As used herein, the term "non-neutralizing α-BoNT/A antibodies" means any α-BoNT/A antibody that will, under physiological conditions, bind to a region of a BoNT/A toxin, but not prevent the toxin from exerting its effect in a BoNT/A therapy. It is envisioned that any and all samples that can contain α-BoNT/A antibodies can be used in this method, including, without limitation, blood, plasma, serum and lymph fluid. In addition, any and all organisms capable of raising α-BoNT/A antibodies against a BoNT/A toxin can serve as a source for a sample including, but not limited to, birds and mammals, including mice, rats, goats, sheep, horses, donkeys, cows, primates and humans. Non-limiting examples of specific protocols for blood collection and serum preparation are described in, e.g., Marjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, BLOOD COLLECTION IN HEALTHCARE (F.A. Davis Company, 2001); and Diana Garza & Kathleen Becan-McBride, PHLEBOTOMY HANDBOOK: BLOOD COLLECTION ESSENTIALS (Prentice Hall, 6th ed., 2002). These protocols are routine procedures well within the scope of one skilled in the art and from the teaching herein. A test sample can be obtained from an organism prior to exposure to a BoNT/A toxin, after a single BoNT/A treatment, after multiple BoNT/A toxin treatments, before onset of resistance to a BoNT/A therapy, or after onset of resistance to a BoNT/A therapy.

[0143] Aspects of the present disclosure provide, in part, a control sample. As used herein, the term "control sample" means any sample in which the presence or absence of the test sample is known and includes both negative and positive control samples. With respect to neutralizing α-BoNT/A antibodies, a negative control sample can be obtained from an individual who had never been exposed to BoNT/A and may include, without limitation, a sample from the same individual supplying the test sample, but taken before undergoing a BoNT/A therapy; a sample taken from a different individual never been exposed to BoNT/A; a pooled sample taken from a plurality of different individuals never been exposed to BoNT/A. With respect to neutralizing α-BoNT/A antibodies, a positive control sample can be obtained from an individual manifesting BoNT/A immunoresistance and includes, without limitation, individual testing

3NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

23B

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

[0144] It is further foreseen that α-BoNT/A antibodies can be purified from a sample. Anti-BoNT/A antibodies can be purified from a sample, using a variety of procedures including, without limitation, Protein A/G chromatography and affinity chromatography. Non-limiting examples of specific protocols for purifying antibodies from a sample are described in, e.g., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1998); USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL: PORTABLE PROTOCOL NO. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998); and MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, *supra*, (2001), which are hereby incorporated by reference. In addition, non-limiting examples of antibody purification methods as well as well-characterized reagents, conditions and protocols are readily available from commercial vendors that include, without limitation, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; and Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA. These protocols are routine procedures well within the scope of one skilled in the art.

[0145] Thus, in an embodiment, a sample comprises blood. In aspect of this embodiment, the sample comprises mouse blood, rat blood, goat blood, sheep blood, horse blood, donkey blood, cow blood, primate blood or human blood. In another embodiment, a sample comprises plasma. In an aspect of this embodiment, a test sample comprises mouse plasma, rat plasma, goat plasma, sheep plasma, horse plasma, donkey plasma, cow plasma, primate plasma or human plasma. In another embodiment, a sample comprises serum. In an aspect of this embodiment, the sample comprises mouse serum, rat serum, goat serum, sheep serum, horse serum, donkey serum, cow serum, primate serum and human serum. In another embodiment, a sample comprises lymph fluid. In aspect of this embodiment, a sample comprises mouse lymph fluid, rat lymph fluid, goat lymph fluid, sheep lymph fluid, horse lymph fluid, donkey lymph fluid, cow lymph fluid, primate lymph fluid or human lymph fluid. In yet another embodiment, a sample is a test sample. In yet another embodiment, a sample is a control sample. In aspects of this embodiment, a control sample is a negative control sample or a positive control sample.

[0146] Aspects of the present disclosure provide, in part, comparing the amount of SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond detected in step (d) to the amount of SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond detected in step (e). In an embodiment, the amount of SNAP-25 cleavage product in the test sample is higher as compared to the amount of SNAP-25 cleavage product in the control sample. In an aspect of this embodiment, a higher amount of SNAP-25 cleavage product in the test sample as compared to a positive control sample indicates a reduction in or lack of BoNT/A immunoresistance in the mammal. In another aspect of this embodiment, an equivalent amount of SNAP-25 cleavage product in the test sample as compared to a negative control sample indicates a reduction in or lack of BoNT/A immunoresistance in the mammal. In another embodiment, the amount of SNAP-25 cleavage product in

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

the test sample is lower as compared to the amount of SNAP-25 cleavage product in the control sample. In an aspect of this embodiment, a lower or equivalent amount of SNAP-25 cleavage product in the test sample as compared to a positive control sample indicates an increase in or presence of BoNT/A immunoresistance in the mammal. In another aspect of this embodiment, a lower amount of SNAP-25 cleavage product in the test sample as compared to a negative control sample indicates an increase in or presence of BoNT/A immunoresistance in the mammal.

[0147] It is envisioned that any and all assay conditions suitable for detecting the present of a neutralizing α-BoNT/A antibody in a sample are useful in the methods disclosed in the present specification, such as, e.g., linear assay conditions and non-linear assay conditions. In an embodiment, the assay conditions are linear. In an aspect of this embodiment, the assay amount of a BoNT/A is in excess. In another aspect of this embodiment, the assay amount of a BoNT/A is rate-limiting. In another aspect of this embodiment, the assay amount of a test sample is rate-limiting.

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

1. A composition comprising a carrier linked to a flexible linker linked to SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

2. The composition of 1, wherein the the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond is glutamine or lysine.

3. The composition of 1, wherein the SNAP-25 antigen comprises SEQ ID NO: 147.

4. The composition of 1, wherein the flexible linker and the SNAP-25 antigen amino acid sequence is SEQ ID NO: 38 or SEQ ID NO: 46.

5. An isolated α-SNAP-25 antibody, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody binds an eptiope comprising a carboxyl-terminus at the P_1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product.

6. The isolated α-SNAP-25 antibody of 5, wherein the α-SNAP-25 antibody has an association rate constant for an epitope not comprising a carboxyl-terminus glutamine of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product of less than 1×10^1 M^{-1} s^{-1}; and wherein the α-SNAP-25 antibody has an equilibrium disassociation constant for the epitope of less than 0.450 nM.

7. The isolated α-SNAP-25 antibody of 5, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody has a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, and SEQ ID NO: 82; and a light chain

3NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

290

variable region comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, and SEQ ID NO: 92.

8. The isolated α-SNAP-25 antibody of 5, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 93, the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 94, the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 95, the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 118, the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 119, or the V_H CDR1 of SEQ ID NO: 120.

9. The isolated α-SNAP-25 antibody of 5, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 96, the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 97, the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 98, the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 99, the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 121, the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 122, or the V_H CDR2 of SEQ ID NO: 123.

10. The isolated α-SNAP-25 antibody of 5, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_H CDR3 of SEQ ID NO: 100, the V_H CDR3 of SEQ ID NO: 101, the V_H CDR3 of SEQ ID NO: 102, or the V_H CDR3 of SEQ ID NO: 124.

11. The isolated α-SNAP-25 antibody of 5, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 103, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 104, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 105, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 106, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 107, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 125, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 126, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 127, the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 128, or the V_L CDR1 of SEQ ID NO: 129.

12. The isolated α-SNAP-25 antibody of 5, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_L CDR2 of SEQ ID NO: 108, the V_L CDR2 of SEQ ID NO: 109, the V_L CDR2 of SEQ ID NO: 110, the V_L CDR2 of SEQ ID NO: 111, or the V_L CDR2 of SEQ ID NO: 112.

13. The isolated α-SNAP-25 antibody of 5, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises at least the V_L CDR3 of SEQ ID NO: 113, the V_L CDR3 of SEQ ID NO: 114, the V_L CDR3 of SEQ ID NO: 115, the V_L CDR3 of SEQ ID NO: 116, or the V_L CDR3 of SEQ ID NO: 117.

14. The isolated α-SNAP-25 antibody of 5, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 121 and SEQ ID NO: 100; and a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110 and SEQ ID NO: 115.

15. The isolated α-SNAP-25 antibody of 5, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody selectively binds the SNAP-25 epitope of SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148.

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

16. The isolated α-SNAP-25 antibody of 5, wherein the isolated α-SNAP-25 antibody selectively binds the SNAP-25 epitope of SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, or SEQ ID NO: 44.

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

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

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

20. A method of detecting BoNT/A activity, the method comprising the steps of: a) treating a cell from an established cell line with a sample comprising a BoNT/A, wherein the cell from an established cell line

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

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

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

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

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

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

α-SNAP-25 antibody and the SNAP-25 cleavage product; f) repeating steps b-e with a negative control sample instead of a test sample, the negative control sample comprising a BoNT/A and a serum known not to contain α-BoNT/A neutralizing antibodies; and g) comparing the amount of antibody-antigen complex detected in step e to the amount of antibody-antigen complex detected in step f, wherein detection of a lower amount of antibody-antigen complex detected in step e relative to the amount of antibody-antigen complex detected in step f is indicative of the presence of α-BoNT/A neutralizing antibodies.

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

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

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

antibody-antigen complex detected in step f relative to the amount of antibody-antigen complex detected in step g is indicative of the presence of α-BoNT/A neutralizing antibodies.

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

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

28. A method of determining BoNT/A immunoresistance in a mammal comprising the steps of: a) adding a BoNT/A to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α-BoNT/A neutralizing antibodies; b) treating a cell from an established cell line with the test sample,

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

29. The method of 17-22 and 23-25, wherein the cell is susceptible to BoNT/A intoxication by about 500 pM or less, by about 400 pM or less, by about 300 pM or less, by about 200 pM or less, by about 100 pM or less of a BoNT/A.

30. The method of 20-22 and 26-28, wherein the cell can uptake about 500 pM or less, by about 400 pM or less, by about 300 pM or less, by about 200 pM or less, by about 100 pM or less of BoNT/A.

31. The method of 17-22, wherein the sample comprises about 100 ng or less, about 10 ng or less, about 1 ng or less, 100 fg or less, 10fg or less, or 1 fg or less of a BoNT/A

32. The method of 17-22, wherein the sample comprises about 100 nM or less, about 10 nM or less, about 1 nM or less, about 100 pM or less, about 10 pM or less, about 1 pM or less, about 100 fM or less, about 10 fM or less, or about 1 fM or less of a BoNT/A.

33. The method of 17-28, wherein the α-SNAP-25 antibody is the isolated α-SNAP-25 antibody of 5-16.

34. The method of 17-28, wherein the presence of an antibody-antigen complex is detected by an immuno-blot analysis, an immunoprecipitation analysis, an ELISA, or a sandwich ELISA

35. The method of 17-28, wherein the immuno-based method has a signal-to-noise ratio for the lower asymptote of at least 3:1, at least 5:1, at least 10:1, at least 20:1, at least 50:1, or at least 100:1.

36. The method of 17-28, wherein the immuno-based method has a signal-to-noise ratio for the higher asymptote of at least 10:1, at least 20:1, at least 50:1, at least 100:1, at least 200:1, at least 300:1, at least 400:1, at least 500:1, or at least 600:1.

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

37. The method of 17-28, wherein the immuno-based method can detect the EC_{50} activity of, e.g., at least 100 ng, at least 50 ng, at least 10 ng, at least 5 ng, at least 100 pg, at least 50 pg, at least 10 pg, at least 5 pg, at least 100 fg, at least 50 fg, at least 10 fg, or at least 5 fg.

38. The method of 17-28, wherein the immuno-based method can detect the EC_{50} activity of, e.g., at least 10 nM, at least 5 nM, at least 100 pM, at least 50 pM, at least 10 pM, at least 5 pM, at least 100 fM, at least 50 fM, at least 10 fM, at least 5 fM, or at least 1 fM.

39. The method of 17-28, wherein the immuno-based method has an LOD of, *e.g.*, 10 pg or less, 9 pg or less, 8 pg or less, 7 pg or less, 6 pg or less, 5 pg or less, 4 pg or less, 3 pg or less, 2 pg or less, 1 pg or less of a BoNT/A

40. The method of 17-28, wherein the immuno-based method has an LOD of, *e.g.*, 100 fM or less, 90 fM or less, 80 fM or less, 70 fM or less, 60 fM or less, 50 fM or less, 40 fM or less, 30 fM or less, 20 fM or less, or 10 fM or less of a BoNT/A.

41. The method of 17-28, wherein the immuno-based method has an LOQ of, *e.g.*, 10 pg or less, 9 pg or less, 8 pg or less, 7 pg or less, 6 pg or less, 5 pg or less, 4 pg or less, 3 pg or less, 2 pg or less, 1 pg or less of a BoNT/A

42. The method of 17-28, wherein the immuno-based method has an LOQ of, *e.g.*, 100 fM or less, 90 fM or less, 80 fM or less, 70 fM or less, 60 fM or less, 50 fM or less, 40 fM or less, 30 fM or less, 20 fM or less, or 10 fM or less of a BoNT/A.

43. The method of 17-28, wherein the immuno-based method can distinguish a fully-active BoNT/A from a partially-active BoNT/A having 70% or less, 60% or less, 50% or less, 40% or less, 30% or less, 20% or less, or 10% or less the activity of a fully-active BoNT/A.

EXAMPLES

Example I

Screening of Candidate Cell Lines

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

1. Growth of Stock Culture of candidate cell lines.

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

[0150] To grow the cell lines, a suitable density of cells from the cell line being tested were plated in a 162 cm^2 tissue culture flask containing 30 mL of a suitable growth medium (see Table 1), and grown in a 37 °C incubator under 5% or 10% carbon dioxide until cells reached the desired density.

Table 1. Media Used in Cell Line Screening.

Cell Line	Serum Growth Media Composition
Kelly SiMa	RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-Glutamine
NB69	RPMI 1640, 15% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin
CHP-126	RPMI 1640, 20% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin
N4TG3	RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 100 µM 6-thioguanine
MHH-NB-11	RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids
PC12	RPMI 1640, 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 10% equine serum, 2 mM GlutaMAX™, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 1% Penicillin-Streptomycin
N18TG2	DMEM (11885-084, Gibco), 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 100 µM 6-thioguanine
N1E-115 N18 ND8/34 NG108-15 NG115-401L NS20Y SK-N-SH	90 % DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM Glutamine, 2 mM glucose
SK-N-DZ SK-N-F1	90% DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 4 mM Glutamine, 4 mM glucose, 0.1 mM non-essential amino acids, 1.5 g/L $NaHCO_3$
BE(2)-C BE(2)-M17 CHP-212 LA-1-55n LA-N-1 MC-1XC SK-N-BE(2) SH-SY5Y	EMEM(11090-081, Gibco), Ham's F12 (11765-054, Gibco), 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM Glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids,
NB4 1A3	Ham's F10 (12471-017, Gibco), 2.5% heat-inactivated fetal bovine serum, 15% heat-inactivated horse serum, 2 mM Glutamine
Neuro-2a	EMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM Glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 1.5 g/L $NaHCO_3$, 1 mM Sodium pyruvate

2. Single-dose screening of candidate cell lines using 1 nM BoNT/A.

[0151] One parameter tested to improve the sensitivity of a cell-based assay was to identify suitable cell lines that exhibited a good capacity to uptake a Clostridial neurotoxin and adhere to a substrate surface. Initially, cell lines were tested for their ability to uptake 1 nM BoNT/A and their ability to attach to a surface. To determine whether a cell line was able to uptake 1 nM BoNT/A, a suitable density of cells from a stock culture of the cell line being tested was plated into the wells of 24-well tissue culture plates containing 1 mL of an appropriate serum growth medium (Table 1). The cells were grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until cells reached the desired density (approximately 18 to 24 hours).

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

The growth media was aspirated from each well and replaced with either 1) fresh growth media containing no toxin (untreated cell line) or 2) fresh growth media containing 1 nM of a BoNT/A complex (treated cell line). After an overnight incubation, the cells were washed by aspirating the growth media and rinsing each well with 200 µl of 1 x PBS. To harvest the cells, the 1 x PBS was aspirated, the cells were lysed by adding 50 µl of 2 x SDS Loading Buffer, the lysate was transferred to a clean test tube and the sample was heated to 95 °C for 5 minutes.

[0152] To detect for the presence of both uncleaved SNAP-25 substrate and cleaved SNAP-25 products, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot. In this analysis, a 12 µl aliquot of the harvested sample was separated by MOPS polyacrylamide gel electrophoresis using NuPAGE® Novex 12% Bis-Tris precast polyacrylamide gels (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) under denaturing, reducing conditions. Separated peptides were transferred from the gel onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) by Western blotting using a Trans-Blot® SD semi-dry electrophoretic transfer cell apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). PVDF membranes were blocked by incubating at room temperature for 2 hours in a solution containing Tris-Buffered Saline (TBS) (25 mM 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol hydrochloric acid (Tris-HCl)(pH 7.4), 137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride), 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate), 2% Bovine Serum Albumin (BSA), 5% nonfat dry milk. Blocked membranes were incubated at 4 °C for overnight in TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate), 2% BSA, and 5% nonfat dry milk containing either 1) a 1:5,000 dilution of an α-SNAP-25 mouse monoclonal antibody as the primary antibody (SMI-81; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD); or 2) a 1:5,000 dilution of S9684 α-SNAP-25 rabbit polyclonal antiserum as the primary antibody (Sigma, St. Louis, MO). Both α-SNAP-25 mouse monoclonal and rabbit polyclonal antibodies can detect both the uncleaved SNAP-25 substrate and the SNAP-25 cleavage product, allowing for the assessment of overall SNAP-25 expression in each cell line and the percent of SNAP-25 cleaved after BoNT/A treatment as a parameter to assess the amount of BoNT/A uptake. Primary antibody probed blots were washed three times for 15 minutes each time in TBS, TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Washed membranes were incubated at room temperature for 2 hours in TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate), 2% BSA, and 5% nonfat dry milk containing either 1) a 1:10,000 dilution of goat polyclonal anti-mouse immunoglobulin G, heavy and light chains (IgG, H+L) antibody conjugated to horseradish peroxidase (Zymed, South San Francisco, CA) as a secondary antibody; or 2) a 1:10,000 dilution of goat polyclonal anti-rabbit immunoglobulin G, heavy and light chains (IgG, H+L) antibody conjugated to horseradish peroxidase (Zymed, South San Francisco, CA) as a secondary antibody. Secondary antibody-probed blots were washed three times for 15 minutes each time in TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Signal detection of the labeled SNAP-25 products were visualized using the ECL Plus™ Western Blot Detection System (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and the membrane was imaged and the percent of cleaved quantified with a Typhoon 9410 Variable Mode Imager and Imager Analysis software (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The choice of pixel size (100 to 200 pixels) and PMT voltage

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

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

Table 2. Single-Dose Screening of Candidate Cell Lines Using 1 nM BoNT/A.

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

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

250

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

Example II

Evaluation of Growth Conditions on Neurotoxin Uptake in Candidate Cell Lines

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

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

[0155] To determine whether cell differentiation improved neurotoxin uptake, cell lines exhibiting uptake of 1 nM BoNT/A were transferred into serum-free medium to induced differentiation. A suitable density of cells from a stock culture of the cell line being tested was plated into the wells of 24-well tissue culture plates containing 1 mL of a serum-free medium containing Minimum Essential Medium with 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES, 1 mM Sodium Pyruvate, 100 units/mL Penicillin, and 100 µg/mL Streptomycin. These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 2 to 3 days). As a control, a suitable density of cells from a stock culture of the cell line being tested was plated into the wells of 24-well tissue culture plates containing 1 mL of an appropriate growth medium (Table 1). These undifferentiated control cells were grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until cells reach the desired density (approximately 18 to 24 hours). The media from both differentiated and undifferentiated control cultures was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.1 nM, 0.3 nM, or 1 nM of a BoNT/A complex. After an overnight incubation, the cells were washed and harvested as described in Example I.

[0156] To detect for the presence of cleaved SNAP-25 products, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that harvested samples are separated by SDS-PAGE using 12 % 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the rabbit polyclonal α-SNAP-25_{197} antibody serum was used as the primary antibody (see Example IV). Table 3 indicates the cell lines that exhibited a SNAP-25 cleavage product when treated with 0.1 nM BoNT/A. Of the cell lines tested, only the SiMa and Neuro-2a cell lines exhibited an uptake of 0.1 nM BoNT/A in the undifferentiated state. However, besides SiMa and Neuro-2a, the cell lines N18, LA1-55n, PC12, and SH-SY5Y all exhibited an uptake of 0.1 nM BoNT/A in the differentiated state.

Table 3. Effects of Cell Differentiation on Neurotoxin Uptake of Candidate Cell Lines.

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

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

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

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

252

into the wells of 24-well tissue culture plates containing serum-free medium as described above, with or without 25 µg/mL GT1b (Alexis Biochemicals, San Diego, CA). These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria as described above. The media was aspirated from each well and replaced with fresh serum-free media containing either 0 (untreated sample), 1.9 pM, 3.7 pM, 7.4 pM, 14.8 pM, 29.7 pM, 59.4 pM, 118.8 pM, 237.5 pM, 574 pM, 950 pM, and 1900 pM of a BoNT/A complex. The cell lines were incubated at two different times, 24 hours and 48 hours. After toxin incubation, the cells were washed and harvested as described in Example I.

[0158] To detect for the presence of cleaved SNAP-25 products, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that harvested samples are separated by SDS-PAGE using 12% 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the rabbit polyclonal α-SNAP-25_{197} antibody serum was used as the primary antibody (see Example IV). Table 4 indicates the effects of gangliosides treatment on the ability of differentiated cell lines to uptake BoNT/A. These results indicate the lowest concentration of BoNT/A that will produce a detectable band of SNAP-25 cleavage product in the Western blot.

Table 4. Effects of GangliosideTreatment on Neurotoxin Uptake of Candidate Cell Lines.

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

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

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

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

induced differentiation. A suitable density of cells from a stock culture of the cell line being tested was plated into the wells of 24-well tissue culture plates containing 1 mL of various test serum-free medium. Parameters tested were 1) the effect of different basal media on BoNT/A uptake (MEM and RPMI 1649); 2) the effect of the presence or absence of neurotrophic factors on BoNT/A uptake (N2 supplement and B27 supplement); 3) the effect of the presence or absence of differentiation factors on BoNT/A uptake (retinoic acid and nerve growth factor); and 4) the effect of the presence or absence of serum on BoNT/A uptake (serum-free media and reduced serum media). As a control, a suitable density of cells from a stock culture of the cell line being tested was plated into the wells of 24-well tissue culture plates containing 1 mL of a control serum-free media (Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES, 1 mM Sodium Pyruvate, 100 units/mL Penicillin, and 100 µg/mL Streptomycin). These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 2 to 3 days). The media was aspirated from each well and replaced with fresh serum-free media containing either 0 (untreated sample), 0.005 pM, 0.015 pM, 0.05 pM,, 0.14 pM, 0.42 pM, 1.2 pM, 3.7 pM, 11 pM, 33 pM, 100 pM and 300 pM of a BoNT/A complex. In addition, the differentiated cells were treated with BoNT/A for 24 hrs followed by a media change and 48 hrs incubation in fresh media without toxin to allow for the accumulation of SNAP-25 cleavage product. The cells were then washed and harvested as described in Example I.

Table 5. Serum Free Media Used for Differentiating Cell Lines.

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

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

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

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

Table 6. Effects of Optimized Serum-Free Media on Neurotoxin Uptake of Candidate Cell Lines.

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

Example III

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

[0161] The following example illustrates how to make α-SNAP-25 monoclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

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

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

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

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

[0163] A similar strategy based on other SNAP-25 antigens disclosed in the present specification is used to develop α-SNAP-25 monoclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. For example, the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 45 can be conjugated to KLH instead of the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 38. As another example, the amino acids 186-197 of human SNAP-25 from the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 38 can be replaced with SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, or SEQ ID NO: 44.

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

[0164] To determine the presence of an α-SNAP-25 monoclonal antibody that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, comparative ELISA and cell-based cleavage assay were performed using the extracted mouse serum. For comparative ELISA, two fusion proteins were constructed: BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ of SEQ ID NO: 48 and the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ of SEQ ID NO: 49. BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ comprised a naturally-biotinylated 16 amino acid BirA peptide of SEQ ID NO: 50 amino-terminally linked to a SNAP-25 peptide comprising amino acids 134-197 of SEQ ID NO: 5. BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ comprised a naturally-biotinylated 16 amino acid BirA peptide of SEQ ID NO: 50 amino-terminally linked to a SNAP-25 peptide comprising amino acids 134-206 of SEQ ID NO: 5. These two substrates were suspended in 1 x PBS at a concentration of 10 µg/mL BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ and the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$. The BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ and the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ were coated onto separate plates by adding approximately 100 µl of the appropriate Substrate Solution and incubating the plates at room temperature for one hour. Washed plates were incubated at 37 °C for one hour in 0.5% BSA in 1 x TBS

3NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

containing a 1:10 to 1:100 dilution of an antibody-containing serum derived from one of the six immunized mice (Mouse 1, Mouse 2, Mouse 3, Mouse 4, Mouse 5, and Mouse 6). Primary antibody probed plates were washed four times for 5 minutes each time in 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Washed plates were incubated at 37 °C for 1 hour in 1 x TBS containing a 1:10,000 dilution of goat polyclonal anti-mouse IgG antibody conjugated to Horseradish peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) as a secondary antibody. Secondary antibody-probed plates were washed four times in 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Chromogenic detection of the labeled SNAP-25 products were visualized by chromogenic detection using ImmunoPure TMB substrate kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). The development of a yellow color in the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ coated plates, but not the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ coated plates, indicated that the α-SNAP-25 antibody preferentially recognized the SNAP-25_{197} cleavage product. The resulted indicated that of the six mice used for immunization, three mice (Mouse 2, Mouse 3, and Mouse 4) had higher titers and more specificity towards a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

[0165] These results were confirmed using an ELISA light chain activity assay. A 96-well Reacti-Bind Streptavidin coated plates (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) were prepared by adding approximately 100 µl of the following Substrate Solution: Rows A-C were coated with 100 µL of BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ at twelve different concentrations; Rows D-H were coated with 100 µL of BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ at 10 µg/mL. The plates were washed by aspirating the Substrate Solution and rinsing each well three times with 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Dilutions of BoNT/A were pre-reduced at 37 °C for 20 minutes in BoNT/A Incubation Buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 1% fetal bovine serum, 10 µM $ZnCl_2$, 10 mM dithiothrietol) and 100 µl of the pre-reduced BoNT/A was added to the substrate-coated plates and incubated at 37 °C for 90 minutes. BoNT/A treated plates were washed by aspirating the BoNT/A Incubation Buffer and rinsing each plate three times with 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Washed plates were incubated at 37 °C for one hour in 0.5% BSA in 1 x TBS containing a 1:10 to 1:100 dilution of the antibody-containing serum being tested. Primary antibody probed plates were washed four times for 5 minutes each time in 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Washed plates were incubated at 37 °C for 1 hour in 1 x TBS containing a 1:10,000 dilution of goat polyclonal anti-mouse IgG antibody conjugated to Horseradish peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) as a secondary antibody. Secondary antibody-probed plates were washed four times in 200 µl TBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). Chromogenic detection of the labeled SNAP-25 products were visualized by chromogenic detection using ImmunoPure TMB substrate kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). The development of a yellow color, which correlated with the presence of the SNAP-25_{197} cleavage product was detected in BoNT/A treated samples, but not untreated controls, using antibody-containing serum derived from all six immunized mice (Mouse 1, Mouse 2, Mouse 3, Mouse 4, Mouse 5, and Mouse 6). Thus, the comparative ELISA analysis indicated that of the mice used for immunization,

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

three mice (Mouse 2, Mouse 3, and Mouse 4) had higher titers and more specificity towards a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

[0166] For cell-based cleavage assay, a suitable density of PC12 cells were plated into 60 mm^2 tissue culture plates containing 3 mL of an appropriate serum medium (Table 1). The cells were grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until cells reached the appropriate density. A 500 µL transfection solution was prepared by adding 250 µL of OPTI-MEM Reduced Serum Medium containing 15 µL of LipofectAmine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) incubated at room temperature for 5 minutes to 250 µL of OPTI-MEM Reduced Serum Medium containing 10 µg of a pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (SEQ ID NO: 51). The pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct comprises a pQBI-25 expression vector (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA) whose promoter elements are functionally linked to a polynucleotide encoding the GFP-BoNT/A light chain of SEQ ID NO: 52. This transfection mixture was incubated at room temperature for approximately 20 minutes. The media was replaced with fresh unsupplemented media and the 500 µL transfection solution was added to the cells. The cells were then incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for approximately 6 to 18 hours. The cells were washed and harvested as described in Example II. To detect for the presence of the cleaved SNAP-25_{197} product, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example II, except that the primary antibody used was a 1:1,000 dilution of the antibody-containing serum and the secondary antibody used was a 1:20,000 of mouse α-IgG Horseradish Peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). A single band corresponding to the SNAP-25_{197} cleavage product was detected in BoNT/A treated samples, but not untreated controls, using antibody-containing serum derived from three mice (Mouse 2, Mouse 3, and Mouse 4). Thus, the cell-based cleavage assay indicated that of the mice used for immunization, three mice (Mouse 2, Mouse 3, and Mouse 4) had higher titers and more specificity towards a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

3. *Production of hybridomas.*

[0167] To make hybridomas producing α-SNAP-25 monoclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, the spleen from Mouse 2 was harvested three days subsequent to a final "booster" immunization and the spleen cells were fused with myeloma cells P3-X63 Ag8.653 using standard hybridoma protocols. These cells were plated into five 96-well plates and hybrids were selected using HAT medium. Within 8-14 days after fusion, the first screening of the approximately 480 parent clones was carried out using comparative ELISA with the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-197}$ and the BirA-HisTag®-SNAP-$25_{134-206}$ peptides coated in two separate plates. The comparative ELISA provided a quick screen method to identify hybridomas producing antibodies specific for the cleaved SNAP-25_{197}. The top 18 clones were subjected to further screening using the cell-based cleavage assay described above and immunostaining of LC/A transfected cells. (Table 7).

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

25B

Table 7. Analysis of Supernatants Containing α-SNAP-25 Monoclonal Antibody						
Clone	Comparative ELISA				Cell-Based Assay	
	OD SNAP-25_{197}	OD SNAP-25_{206}	$Ratio_{197/206}$	$Ratio_{206/197}$	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}
1D3	1.805	0.225	8.02	0.13	+++	–
1F12	0.365	0.093	3.92	0.25	–	–
1G10	0.590	0.137	4.31	0.23	++	–
1H1	0.335	0.121	2.77	0.36	–	–
1H8	0.310	0.302	1.03	0.97	+	–
2C9	0.139	0.274	0.51	1.97	–	–
2E2	0.892	0.036	24.78	0.04	++	–
2E4	0.228	0.069	3.30	0.30	+	–
2F11	1.095	1.781	0.61	1.63	–	–
3C1	1.268	0.053	23.92	0.04	++	–
3C3	0.809	0.052	15.56	0.06	++	–
3E1	0.086	0.155	0.55	1.80	0	–
3E8	2.048	0.053	38.64	0.03	+++	–
3G2	0.053	0.158	0.34	2.98	–	–
4D1	0.106	0.218	0.49	2.06	–	–
4G6	0.061	0.159	0.38	2.61	–	–
5A5	0.251	0.106	2.37	0.42	+	–
5F11	0.243	0.061	3.98	0.25	–	–

[0168] Clones 1D3, 1G10, 2E2, 3C1, 3C3, and 3E8 were further cloned by limiting dilution because the conditioned media produced by these clones comprised α-SNAP-25 antibodies with a preferential binding specificity having a $ratio_{197/206}$ of at least 4:1 for the SNAP-25_{197} cleavage product relative to the SNAP-25_{206} uncleaved substrate and detected the SNAP-25_{197}-cleavage product using the cell-based cleavage assay and the immunostaining of PC12 cells transfected with GFP-LC/A. Similarly clones 2C9, 2F11, 3G2, 4D1 and 4G6 were further cloned by limiting dilution because the conditioned media produced by these clones comprised α-SNAP-25 antibodies with a preferential binding specificity having a $ratio_{206/197}$ of at least 1.5:1 for the SNAP-25_{206} uncleaved substrate relative to the SNAP-25_{197} cleavage product and detected the SNAP-25_{206}-uncleaved substrate using the cell-based cleavage assay. These single-cell derived clones were screened again using comparative ELISA, cell-based cleavage, and immunostaining to confirm their affinity and specificity, and the antibodies were isotyped using standard procedures. Ascites were produced from clones 1D3B8 (IgM.k), 1G10A12 (IgG3.k), 2C9B10 (IgG3.k), 2E2A6 (IgG3.k), 2F11B6 (IgM.k), 3C1A5 (IgG2a.k), and 3C3E2 (IgG2a.k). Clone 3E8 stopped producing antibodies during the cloning process and could not be further evaluated.

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

[0169] To evaluate binding specificity of an α-SNAP-25 monoclonal antibody that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, ascites from clones 1D3B8, 1G10A12, 2C9B10, 2E2A6, 2F11B6, 3C1A5, and 3C3E2 were used to

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

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

[0170] For the cell-based activity assay, binding specificity was determined by analyzing the ability of α-SNAP-25 antibody-containing ascites to detect the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product by Western blot analysis. A suitable density of PC12 cells were plated into 60 mm^2 tissue culture plates containing 3 mL of an appropriate serum medium, grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until an appropriate cell density was reached, and transfected with the either a transfection solution lacking the pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (untransfected cells) or a transfection solution containing the pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (transfected cells) as described above. The cells were washed and harvested as described in Example I. To detect for the presence of both the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that the primary antibody used was a 1:100 dilution of the α-SNAP-25 monoclonal antibody-containing ascites and the secondary antibody used was a 1:20,000 of α-mouse IgG conjugated to Horseradish Peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). In addition, three commercially available mouse α-SNAP-25 monoclonal antibodies were tested. SMI-81 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), an α-SNAP-25 antibody the manufacturer indicates detects both the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product, was used at a 15,000 dilution according to the manufacturer's recommendations. MC-6050 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), an α-SNAP-25 antibody the manufacturer indicates detects both the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product, was used at a 1:100 dilution according to the manufacturer's recommendations. MC-6053 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV), an α-SNAP-25 antibody the manufacturer indicates detects only the cleaved SNAP-25_{197} product, was used at a 1:100 dilution according to the manufacturer's recommendations.

[0171] Table 8 indicates the α-SNAP-25 antibody-containing ascites that detected only the SNAP-25_{197} cleavage product. The cell-based cleavage assay indicated that ascites produced from clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, and 3C3E2 synthesize an α-SNAP-25 monoclonal antibody having high binding specificity for the SNAP-25_{197} cleavage product that allows for the selective recognition of this cleavage product relative to the SNAP-25_{206} uncleaved substrate. Commercial antibody SMI-81 detected the SNAP-25_{206} uncleaved substrate, but only poorly recognized the SNAP-25_{197} cleavage product (Table 8). Surprisingly, commercial antibody MC-6050 only detected the SNAP-25_{206} uncleaved substrate, and failed to recognize the SNAP-25_{197} cleavage product (Table 8). Even more surprisingly, commercial antibody MC-6050 only detected the SNAP-25_{206} uncleaved substrate, and failed to recognize the SNAP-25_{197} cleavage product, even though the manufacturer advertises that this antibody selectively detects the SNAP-25_{197} cleavage product (Table 8). Thus, this analysis indicates that while 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, and 3C3E2 exhibit suitable selectivity for the SNAP-25_{197} cleavage product, 1G10A12 and 2F11B6 do not. In addition, commercial antibodies SMI-81, MC-6050 and MC-6053 all are unsuitable for

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

the immuno-based methods disclosed in the present application because all failed to selectivity detect the SNAP-25_{197} cleavage product.

[0172] For immunocytochemistry analysis, binding specificity was determined by analyzing the ability of α-SNAP-25 antibody-containing ascites to detect the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product by immunostaining. *See e.g.*, Ester Fernandez-Salas et al., *Plasma Membrane Localization Signals in the Light Chain of Botulinum Neurotoxin*, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 101(9): 3208-3213 (2004). A suitable density of PC12 cells were plated, grown, and transfected with either a transfection solution lacking the pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (untransfected cells) or a transfection solution containing the pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (transfected cells) as described above. The cells were washed in 1 x PBS and fixed in 5 mL of PAF at room temperature for 30 minutes. Fixed cells were washed in phosphate buffered saline, incubated in 5 mL of 0.5% Triton® X-100 (polyethylene glycol octylphenol ether) in 1 x PBS, washed in 1 x PBS, and permeabilized in 5 mL of methanol at -20 °C for six minutes. Permeabilized cells were blocked in 5 mL of 100 mM glycine at room temperature for 30 minutes, washed in 1 x PBS, and blocked in 5 mL of 0.5% BSA in 1 x PBS at room temperature for 30 minutes. Blocked cells were washed in 1 x PBS and incubated at room temperature for two hours in 0.5% BSA in 1 x PBS containing a 1:10 dilution of an ascites from a clonal hybridoma cell line being tested. Primary antibody probed cells were washed three times for 5 minutes each time in 1 x PBS. Washed cells were incubated at room temperature for 2 hours in 1 x PBS containing a 1:200 dilution of goat polyclonal anti-mouse immunoglobulin G, heavy and light chains (IgG, H+L) antibody conjugated to ALEXA® FLUOR 568 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) as a secondary antibody. Secondary antibody-probed cells were washed three times for 5 minutes each time in 1 x PBS. Washed cells were prepared for microscopic examination by mounting in VECTASHIELD® Mounting Media (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and coverslipped. Images of signal detection were obtained with a Leica confocal microscope using appropriate laser settings. Table 8 indicates that the α-SNAP-25 antibody-containing ascites that specifically detected the SNAP-25_{197}-cleavage product. The immunocytochemistry analysis indicated that ascites produced from clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, and 3C3E2 synthesize an α-SNAP-25 monoclonal antibody having high binding specificity for the SNAP-25_{197} cleavage product that allows for the preferential recognition of this cleavage product relative to the SNAP-25_{206} uncleaved substrate.

[0173] For immunoprecipitation analysis, binding specificity was determined by analyzing the ability of Protein A (HiTrap™ Protein A HP Columns, GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ), purified α-SNAP-25 monoclonal antibodies to precipitate the uncleaved SNAP-25_{206} substrate and the cleaved SNAP-25_{197} product. *See* e.g., Chapter 8 *Storing and Purifying Antibodies*, pp. 309-311, Harlow & Lane, *supra*, 1998a. A suitable density of PC12 cells were plated, grown, and transfected with either a transfection solution containing a pQBI-25/GFP expression construct (control cells; SEQ ID NO: 53) or a transfection solution containing the pQBI-25/GFP-BoNT/A-LC expression construct (experimental cells) as described above. The pQBI-25/GFP expression construct comprises an expression vector whose

NSDOCID: <WO____ 2009114748A1_I_>

promoter elements are functionally linked to a polynucleotide encoding GFP of SEQ ID NO: 54. After an overnight incubation, the cells were washed by aspirating the growth media and rinsing each well with 200 µl 1 x PBS. To harvest the cells, the PBS was aspirated, the cells were lysed by adding an Immunoprecipitation Lysis Buffer comprising 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGDT, 10% glycerol, 1% Triton® X-100 (polyethylene glycol octylphenol ether) and a 1 x COMPLETE™ Protease inhibitor cocktail (Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN) and incubating at 4 °C for one hour. The lysed cells were centrifuged at 3,000 x *g* at 4 °C for 10 minutes to remove cellular debris and the supernatant transferred to a clean tube and diluted to a protein concentration of approximately 1 mg/mL. Approximately 5 µg of purified monoclonal antibody was added to 0.5 mL of diluted supernatant and incubated at 4 °C for two hours. After primary antibody incubation, approximately 50 µl of immobilized Protein G (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) was added to the diluted supernatant and incubated at 4 °C for one hour. The incubated supernatant was washed three times for 30 minutes each time by adding 0.5 mL of Immunoprecipitation Lysis Buffer, centrifuging at 300 x *g* at 4 °C for one minute to pellet the immobilized Protein G, and decanting the supernatant. After washing, the pellet was resuspended in 30 µl of 1 x SDS Loading Buffer and the sample was heated to 95 °C for 5 minutes. To detect for the presence of both the uncleaved $SNAP\text{-}25_{206}$ substrate and the cleaved $SNAP\text{-}25_{197}$ product, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that the primary antibody used was a 1:1,000 dilution of the α-SNAP-25 polyclonal antibody serum (see Example IV) and the secondary antibody used was a 1:20,000 of rabbit α-IgG Horseradish Peroxidase (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Table 8 indicates the α-SNAP-25 antibody-containing ascites that specifically pulled down the $SNAP\text{-}25_{197}$-cleavage product by immunoprecipitation analysis. The immunoprecipitation analysis indicated that ascites produced from clones 2E2A6 and 3C1A5 synthesize an α-SNAP-25 monoclonal antibody having high binding specificity for the $SNAP\text{-}25_{197}$ cleavage product that allows for the preferential recognition of this cleavage product relative to the $SNAP\text{-}25_{206}$ uncleaved substrate.

Table 8. Analysis of Clone Ascites Containing α-SNAP-25 Monoclonal Antibody

Clone	Cell-Based Assay		Immunocytochemistry		Immunoprecipitation	
	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$	$SNAP\text{-}25_{197}$	$SNAP\text{-}25_{206}$
1D3B8	++	–	++	-	Not Tested	Not Tested
1G10A12	++	++	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested
2C9B10	++	–	++	-	Not Tested	Not Tested
2E2A6	++	–	++	-	++	–
2F11B6	+	+	+	+	Not Tested	Not Tested
3C1A5	++	–	++	–	++	–
3C3E2	+	–	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested
MC-6050	–	+	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested
MC-6053	–	+	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested
SMI-81	-/+	++	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested

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

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

[0175] To determine the binding affinity of an α-SNAP-25 monoclonal antibody showing high binding specificity for either the SNAP-25_{197} cleavage product or the SNAP-25_{206} uncleaved substrate, binding affinity assays were performed on a BIAcore 3000 instrument using carboxymethyl dextran (CM5) sensor chips (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Runs were conducted at 25 °C with HBS-EP buffer comprising 10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM sodium chloride, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) surfactant P20 at a flow rate of 10 µl/min. SNAP-25 peptides comprising amino acids 134-197 of SEQ ID NO: 5 (SNAP-$25_{134-197}$) or amino acids 134-206 of SEQ ID NO: 5 (SNAP-$25_{134-206}$) were covalently attached to the surface of the CM5 sensor chips using standard amine coupling. Briefly, the CM5 chips were activated by a 7 minute injection of a mixture of 0.2 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and 0.05 M N-hydroxysuccimide; the SNAP-25 peptides were then injected in 10 mM sodium acetate (pH 4.0) for 20 min at a flow rate of 10 µL/min; and unreacted succimide esters were blocked by a 7-min injection of 1 M ethanolamine hydrochloride, pH 8.5. The immobilized amount of SNAP-$25_{134-197}$ or SNAP-$25_{134-206}$ on the chip was reflected by a 100-150 increase in response units (about 0.10-0.15 ng/mm^2). Antibody samples comprising either ascites or purified monoclonal antibodies produced from clones 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, and 3C3E2, as well as, commercially available α-SNAP-25 antibodies were passed over the surface of the CM5 chips allowing an association time of 10 min and a dissociation time of 20 min. The surfaces were regenerated between runs by a 1 minute injection of 10 mM glycine-HCl (pH 2.5) at a flow rate of 15 µL/min. Sensorgram curves were fitted to a 1:1 kinetic binding model with the BIAevaluation 3.0 software.

[0176] The results indicate that both 2E2A6 and 3C1A5 were highly specific for cleaved SNAP-25_{197} product over SNAP-25 uncleaved substrate (Table 9). When compared to the binding affinities of MC-6050 and MC-6053, 1D3B6 had an approximately 10-fold higher equilibrium disassociation constant for the SNAP-25 cleavage product relative to these commercial antibodies (Table 9). Interestingly, 2E2A6 had only a slightly lower equilibrium disassociation constant for the SNAP-25 cleavage product relative to these commercial antibodies (0.405 nM versus 0.497 and 0.508)(Table 9). As neither of these commercial α-SNAP-25 antibodies selectively recognized the SNAP-25 cleavage product (Table 8), an equilibrium disassociation constant lower than about 0.5 nM appears, in part, critical to achieve such selectivity. Similarly, when compared to the binding affinities of MC-6050 and MC-6053, 2E2A6 had an about at least one-fold slower off rate/dissociation constant (6.74×10^{-5} versus 8.82×10^{-4} s^{-1} and 1.18×10^{-3} s^{-1}) (Table 9). This further suggests that an off rate/dissociation constant lower than about 8.82×10^{-4} appears, in part, critical to achieve selective binding for the SNAP-25 cleavage product. This result is consistent with 1D3B8, which had an off rate/dissociation constant of 5.78×10^{-5} s^{-1} (Table 9).

Table 9. Analysis of Binding Affinity α-SNAP-25 Monoclonal Antibodies

SPR Parameter	1D3B8		2E2A6*	
	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}[a]	SNAP-25_{197}	SNAP-25_{206}[b]
Ka (M^{-1} s^{-1})	1.06×10^{6}	—	1.70×10^{6} (1.66×10^{5})	— (—)
Kd (s^{-1})	5.78×10^{-5}	—	1.53×10^{-4} (6.74×10^{-5})	— (—)

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

* Two independent runs were conducted for this antibody with two different chips.

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

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

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

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

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

[0177] To determine the epitope of an isolated α-SNAP-25 monoclonal antibody that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, the polynucleotide molecule encoding the variable heavy (V_H) and variable light (V_L) chains of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by hybridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5 and 3C3E2 were sequenced. mRNA was extracted and purified from each hybridoma using standard protocols and reversed transcribed into cDNA using either an oligo dT anti-sense primer or a gene-specific (murine IgG1 CH and kappa CL) anti-sense primer. Specific murine and human constant domain primers were used to amplify the cDNA by PCR after cDNA production to determine the isotype of the antibody. Degenerate V_H and V_L primers were used to amplify the variable domains from the cDNA. For 5'RACE, a homopolymeric dCTP tail was added to the 3' end of the cDNA. The heavy and light chains were then amplified with an oligo dG sense primer and a gene specific (CH/KC) anti-sense primer. PCR products included the sequence of the signal peptide, variable domains and constant domains up to the anti-sense primer. The PCR products were gel purified to remove small fragments, and cloned into a blunt or TA vector for sequencing. Five independent clones for each chain were sequenced and alignments of V_H and VL chains and consensus sequences were determined (Table 10). Methods used to determine the V_H and V_L amino acid sequences are described in, *e.g.*, Roger A. Sabbadini, et al., *Novel Bioactive Lipid Derivatives and Methods of Making and Using Same*, U.S. Patent Publication 2007/0281320; and Peter

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

Amersdorfer, et al., *Molecular Characterization of Murine Humoral Immune Response to Botulinum Neurotoxin Type A Binding Domain as Assessed by Using Phage Antibody Libraries*, 65(9) Infect. Immun. 3743-3752, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. In addition, commercial services are available to sequence the variable heavy (V_H) and variable light (V_L) chains of an antibody and identify the CDR regions, see, *e.g.*, Fusion Antibodies Ltd., Northern Ireland.

[0178] The polynucleotide sequence comprising the V_H and V_L chains of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by the hybridomas disclosed in the present specification is as follows: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 71), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO: 73), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 75), 3C1A5 V_H variant 1 (SEQ ID NO: 77), 3C1A5 V_H variant 2 (SEQ ID NO: 79), 3C3E2 V_H (SEQ ID NO: 81); 1D3B8 V_L (SEQ ID NO: 83), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 85), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 87), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 89), and 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 91). The amino acid sequence comprising the V_H and V_L chains of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by the hybridomas disclosed in the present specification is as follows: 1D3B8 V_H (SEQ ID NO: 72), 2C9B10 V_H (SEQ ID NO: 74), 2E2A6 V_H (SEQ ID NO: 76), 3C1A5 V_H variant 1 (SEQ ID NO: 78), 3C1A5 V_H variant 2 (SEQ ID NO: 80), 3C3E2 V_H (SEQ ID NO: 82); 1D3B8 V_L (SEQ ID NO: 84), 2C9B10 V_L (SEQ ID NO: 86), 2E2A6 V_L (SEQ ID NO: 88), 3C1A5 V_L (SEQ ID NO: 90), and 3C3E2 V_L (SEQ ID NO: 92). The amino acid sequences comprising the V_H and V_L CDR domains of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by the hybridomas 1D3B8, 2C9B10, 2E2A6, 3C1A5, and 3C3E2 are given in Table 10.

Table 10. CDR Sequences of V_H and V_L domains from α-SNAP-25 Monoclonal Antibodies

CDR	Sequence	Identified In	SEQ ID NO:
V_H CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5 variant 2	93
V_H CDR 1	TFTNYVIH	3C1A5 variant 1 3C3E2	94
V_H CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V_H CDR 2	YLFPGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5 variant 2	97
V_H CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C1A5 variant 1 3C3E2	98
V_H CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V_H CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5 variant 2	100
V_H CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101
V_H CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C1A5 variant 1 3C3E2	102
V_L CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
V_L CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
V_L CDR 1	RASKSVSTSGYSYMH	2E2A6	105
V_L CDR 1	KASQDIKSYLS	3C1A5	106

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

V_L CDR 1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
V_L CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
V_L CDR 2	NAKSLAE	2C9B10	109
V_L CDR 2	LVSNLES	2E2A6	110
V_L CDR 2	YATSLAD	3C1A5	111
V_L CDR 2	YASQSIS	3C3E2	112
V_L CDR 3	FQGSHVPPT	1D3B8	113
V_L CDR 3	QHHYGTPYT	2C9B10	114
V_L CDR 3	QHIRELTRS	2E2A6	115
V_L CDR 3	LQHGESPFT	3C1A5	116
V_L CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

[0179] Non-limiting examples of amino acid sequences comprising V_H CDR domain variants of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by the hybridomas disclosed in the present specification include V_H CDR1 variant SEQ ID NO: 118 for 1D3B8; V_H CDR1 variant SEQ ID NO: 119 for 2C9B10, 2E2A6 and 3C1A5 V_H variant 2; V_H CDR1 variant SEQ ID NO: 120 for 3C1A5 V_H variant 1 and 3C3E2; V_H CDR2 variant SEQ ID NO: 121 for 1D3B8 and 2E2A6; V_H CDR2 variant SEQ ID NO: 122 for 2C9B10 and 3C1A5 V_H variant 2; V_H CDR2 variant SEQ ID NO: 123 for 3C1A5 V_H variant 1, and 3C3E2; V_H CDR3 variant MDY for 1D3B8 and 2C9B10; V_H CDR3 variant MGY for 2E2A6 and 3C1A5 V_H variant 2; and V_H CDR3 variant SEQ ID NO: 124 for 3C1A5 V_H variant 1 and 3C3E2. Non-limiting examples of amino acid sequences comprising V_L CDR domain variants of the α-SNAP-25 monoclonal antibody produced by the hybridomas disclosed in the present specification include V_L CDR1 variant SEQ ID NO: 125 for 1D3B8; V_L CDR1 variant SEQ ID NO: 126 for 2C9B10; V_L CDR1 variant SEQ ID NO: 127 for 2E2A6; V_L CDR1 variant SEQ ID NO: 128 for 3C1A5; V_L CDR1 variant SEQ ID NO: 129 for 3C3E2; V_L CDR2 variant KVS for 1D3B8; V_L CDR2 variant NAK for 2C9B10; V_L CDR2 variant LVS for 2E2A6; V_L CDR2 variant YAT for 3C1A5; and V_L CDR2 variant YAS for 3C3E2.

Example IV

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

[0180] The following example illustrates how to make α-SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 epitope having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

[0181] To develop α-SNAP-25 polyclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product, the 10-residue peptide CGGGRIDEANQ (SEQ ID NO: 46) was designed as a SNAP-25 cleavage product antigen. This peptide comprising a N-terminal Cysteine residue for conjugation to KLH, a G-spacer flexible spacer (GGG) linked to amino acids 191-197 of human SNAP-25 (SEQ ID NO: 5) and has a carboxylated C-terminal glutamine. Blast searches revealed that this peptide has high homology only to

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

SNAP-25 and almost no possible cross-reactivity with other proteins in neuronal cells. The sequence was also carefully scrutinized by utilizing computer algorithms to determine hydropathy index, protein surface probability, regions of flexibility, and favorable secondary structure, followed by proper orientation and presentation of the chosen peptide sequence. The peptide was synthesized and conjugated to Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) to increase immunogenicity. Before the animals were immunized, naïve rabbits were first screened against cell lysates from candidate cell lines in a Western blot in order to identify animals that had no immunoreactivity to the proteins present in the cell lysates. Two pre-screened rabbits were immunized with this peptide, and after three immunizations in about eight weeks, the rabbits were bled for testing. The blood was allowed to clot by incubating at 4 °C for 60 minutes. The clotted blood was centrifuged at 10,000x g at 4 °C for 10 minutes to pellet the cellular debris. The resulting serum sample was dispensed into 50 µL aliquots and stored at -20 °C until needed.

[0182] A similar strategy based on other SNAP-25 antigens disclosed in the present specification is used to develop α-SNAP-25 polyclonal antibodies that bind an epitope comprising a carboxyl-terminus at the P1 residue from the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product. For example, the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 47 can be conjugated to KLH instead of the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 46. As another example, the amino acids 191-197 of human SNAP-25 from the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 38 can be replaced with SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 147, or SEQ ID NO: 148.

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

[0183] To determine the presence of α-SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, comparative ELISA and cell-based cleavage assays were performed using the extracted rabbit serum as described in Example III. The serum from both rabbits contained α-SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond. The α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibodies were designated as NTP 22 and NTP 23.

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

[0184] To purify α-SNAP-25 polyclonal antibodies that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, NTP 22 and NTP 23 antibodies from rabbit serum were purified using affinity columns containing the SNAP-25 antigen of SEQ ID NO: 46.

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

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

[0185] To evaluate binding specificity of an α-SNAP-25 polyclonal antibody that can selectively bind to a SNAP-25 antigen having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond, purified NTP 22 and NTP 23 α-SNAP-25 polyclonal antibodies were used to detect cleavage product using the cell-based activity assay, immunnocytochemistry and immunoprecipitation as described in Example III. The cell-based cleavage assay, immunocytochemistry analysis and immunoprecipitation analysis all indicated that NTP 22 and NTP 23 α-SNAP-25 polyclonal antibodies did not cross-react with uncleaved SNAP-25. Thus both NTP 22 and NTP 23 have high binding specificity for the SNAP-25_{197} cleavage product that allows for the preferential recognition of this cleavage product relative to the SNAP-25_{206} uncleaved substrate. Affinity for the antigens can be determined using SPR in the BiAcore as described in Example III.

Example V

Component and Condition Preparation for a Sandwich ELISA

[0186] The following example illustrates how to identify and prepare the components and conditions necessary to perform a sandwich ELISA useful for conducting immuno-based methods of detecting BoNT/A activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using a α-SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond.

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

[0187] To obtain a BoNT/A treated cell lysate for analysis, a suitable density of cells from a stock culture of Neuro-2a was seeded into a T175 flask containing 50 mL of a serum-free medium containing Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES. These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 2 to 3 days). As a control, a suitable density of cells from a stock culture of Neuro-2a was seeded into a T175 flask containing 50 mL of an appropriate growth medium (Table 1). These undifferentiated control cells were grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until 50% confluence was reached (approximately 18 hours). The media from both differentiated and undifferentiated control cultures was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample) or 10 nM of a BoNT/A complex. After an overnight incubation, the cells were washed and the cells harvested by lysing in freshly prepared Triton X-100 Lysis Buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100) at 4°C for 30 minutes with constant agitation. Lysed cells were centrifuged at 4000 rpm for 20 min at 4°C to eliminate debris using a bench-top centrifuge. The protein concentrations of cell lysates were measured by Bradford assay.

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

2. Preparation and identification of sandwich ELISA components.

[0188] To identify an appropriate capture antibody-detection antibody pair an ECL sandwich ELISA analysis was conducted on twenty-six different combinations of capture and detection antibody pairs comprising eleven different α-SNAP-25 capture antibodies and seven different α-SNAP-25 detection antibodies (Table 12). The α-SNAP-25 antibodies used were 2E2A6 and 3C1A5 α-SNAP-25 mouse monoclonal antibodies disclosed in the present specification, SMI-81, MC-6050, and MC-6053 α-SNAP-25 mouse monoclonal antibodies disclosed in the present specification, NTP 23 α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibodies disclosed in the present specification, S9684 α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibodies (Sigma, St. Louis, MO), H-50 α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), C-18 α-SNAP-25 goat polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), N-19 α-SNAP-25 goat polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), and SP12 α-SNAP-25 mouse polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

[0189] To prepare the capture antibody solution, the α-SNAP-25 monoclonal antibodies contained in the ascites from hybridoma cell lines 2E2A6 and 3C1A5 as well as the α-SNAP-25 MC-6050 and MC-6053 monoclonal antibodies were purified using a standard Protein A purification protocol. All other α-SNAP-25 antibodies were purchased as purified antibodies.

[0190] To prepare the detection antibody solution, the appropriate α-SNAP-25 antibody was conjugated to Ruthenium(II)-tris-bipyridine-(4-methysulfonate) NHS ester labeling reagent (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). The conjugation reaction was performed by adding 30 µL of distilled water reconstituted MSD SULFO-TAG™ stock solution to 200 µL of 2 mg/mL α-SNAP-25 polyclonal antibodies and incubating the reaction at room temperature for 2 hours in the dark. The labeled antibodies were purified using a standard spin column protocol and the protein concentration determined using a standard colorimetric protein assay. The absorbance of the α-SNAP-25 antibody/MSD, SULFO-TAG™ conjugate was measured at 455 nm using a spectrophotometer to determine the concentration in moles per liter. The detection antibody solution was stored at 4 °C until needed.

[0191] To prepare the solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleavage product, approximately 5 µL of the appropriate α-SNAP-25 monoclonal antibody solution (20 µg/mL in 1 x PBS) is added to each well of a 96-well MSD High Bind plate and the solution is allowed to air dry in a biological safety cabinet for 2-3 hours in order to liquid evaporate the solution. The capture antibody-bound wells were then blocked by adding 150 µL of Blocking Buffer comprising 2% Amersham Blocking Reagent (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) and 10% goat serum (VWR, West Chester, PA) at room temperature for 2 hours. Blocked plates were sealed and stored at 4 °C until needed.

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

[0192] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 cleavage product by ECL sandwich ELISA analysis, the Blocking Buffer from stored plates was aspirated from the wells, 25 µL of a lysate from cells treated with BoNT/A, as described above, was added to each well and the plates were incubated at 4 °C for overnight. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 µl of 5 µg/mL detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate) was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated at room temperature at room temperature for 1 hour with shaking. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 150 µL of 1 x Read Buffer (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) was added to each well and the plates were read using a SECTOR™ Imager 6000 Image Reader (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). A ratio was calculated by dividing the signal obtained at the 10 nM dose for each antibody-pair by the signal obtained at the 0 nM dose for each antibody-pair (Table 12). These results indicated that among the twenty-six different combinations of antibody pairs tested, only three antibody pairs had signal-to-noise ratios above 10:1 for the higher dose tested: Pair No. 1 (2E2A6 mouse mAb and S9684 rabbit pAb), Pair No. 4 (3C1A5 mouse mAb and S9684 rabbit pAb), and Pair No. 18 (S9684 rabbit pAb and 2E2A6 mouse mAb). Antibody Pair 1 was chosen for further assay development.

Table 12. Screening of α-SNAP-25 Antibody Combinations

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

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

19	S9684 rabbit pAb	C-18 goat pAb	No	No	0.7:1
20	S9684 rabbit pAb	SMI-81mouse mAb	Yes	Yes	1.2:1
21	SMI-81 mouse mAb	S9684 rabbit pAb	Yes	Yes	1.1:1
22	SMI-81 mouse mAb	N-19 goat pAb	Yes	Yes	1.0:1
23	SMI-81 mouse mAb	C-18 goat pAb	No	No	0.8:1
24	SP12 mouse pAb	C-18 goat pAb	No	No	1.0:1
25	MC-6050 mouse mAb	S9684 rabbit pAb	Yes	Yes	5.0:1
26	MC-6053 mouse mAb	S9684 rabbit pAb	Yes	Yes	7.1:1

3. Optimization of cell differentiation conditions.

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

[0194] To determine an optimal differentiation medium, a suitable density of cells from a SiMa cell line was plated into the wells of Collagen IV coated 24-well cell culture plates containing 1 mL of one of the following medias and differentiation supplements: 1) RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-Glutamine, and 25 µg/mL GT1b); 2) RPMI-1640, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, and 25 µg/mL GT1b; 3) Minimum Essential Medium, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, and 25 µg/mL GT1b; and 4) RPMI-1640, 10% BSA, 1 x N2 supplement, 1 x NGF supplement, and 25 µg/mL GT1b. Cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 3 days). The media was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.2 pM, 2 pM, or 20 pM of a BoNT/A complex. After an overnight treatment, the cells were washed, incubated for an additional two days without toxin to allow for the cleavage of the SNAP-25 substrate, and harvested as described above in Section 1. The protein concentrations of cell lysates were measured by Bradford assay. Detection of the presence of cleaved SNAP-25 product by ECL sandwich ELISA analysis was performed as described above using Antibody Pair 1. As discussed in Example I, undifferentiated cells did not take up toxin as effectively as differentiated cells. The most effective differentiation medium for increasing BoNT/A uptake and consequently SNAP-25 cleavage medium 3 (MEM+N2+B27), followed by medium 2 (RPMI-1640+N2+B27), and medium 4 (RPMI-1640 +N2+NGF+BSA) (FIG. 3). Cells cultured in medium 2 resulted in more cleavage of the SNAP-25 as compared to the other media.

[0195] To determine an optimal differentiation time, a suitable density of cells from a SiMa cell line was plated into the wells of poly-D-lysine coated 96-well cell culture plates containing 100 µL of a serum-free medium containing Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES and 25 µg/mL

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

4. **Optimization of *BoNT/A treatment time.***

[0196] To determine the optimal length of time cells form a cell line need to be treated with a BoNT/A, various lengths of BoNT/A treatment times were tested. A suitable density of cells from a SiMa cell line was plated into the wells of poly-D-lysine coated 96-well cell culture plates containing 100 µL of a serum-free medium containing Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES and 25 µg/mL GT1b. Cells were plated and incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 3 days). The media was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.1 pM, 0.2 pM, 0.4 pM, 0.8 pM, 1.6 pM, 3.1 pM, 6.3 pM, 12.5 pM, or 25 pM of a BoNT/A complex in RPMI 1640 growth medium in triplicate to generate a full dose-response. Five different BoNT/A treatment length regimens were performed: 1) a 6 hrs BoNT/A treatment, removal and washing of cells, an incubation of cells for 18 hr without BoNT/A, and harvesting of cells as described above in Section 1; 2) a 24 hrs BoNT/A treatment, removal and washing of cells, and harvesting of cells as described above in Section 1; 3) a 24 hrs BoNT/A treatment, removal and washing of cells, an incubation of cells for 24 hr without BoNT/A, and harvesting of cells as described above in Section 1; 4) a 24 hrs BoNT/A incubation, removal and washing of cells, an incubation of cells for 48 hr without BoNT/A, and harvesting of cells as described above in Section 1; and 5) a 24 hrs BoNT/A incubation, removal and washing of cells, an incubation of cells for 72 hr without BoNT/A, and harvesting of cells as described above in Section 1. After harvesting, the protein concentrations of cell

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

292

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

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

[0197] To evaluate the sensitivity of the immuno-based methods of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification, the timing of BoNT/A uptake by cells susceptible to BoNT/A intoxication was determined. A suitable density of cells from a SiMa cell line was plated into the wells of poly-D-lysine coated 96-well cell culture plates containing 100 µL of a serum-free medium containing Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES and 20 µg/mL GT1b. Cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 3 days). The media was aspirated from each well, replaced with fresh media containing 1 nM of a BoNT/A complex, and the BoNT/A treated cells were incubated at six different time points of 0 min (neurotoxin added and then immediately removed), 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, and 60 min. A negative control of media with no BoNT/A (0 nM) was used. After incubation, the cells were washed and harvested as described above in Section 1. After harvesting, the protein concentrations of cell lysates, detection of SNAP-25 cleavage product by ECL sandwich ELISA performed, and the EC_{50} calculated as described above. The results indicated that uptake of BoNT/A by the cells took less than one minute before producing significant amounts of SNAP-25 cleavage product over background (FIG. 6).

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

[0198] To evaluate the specificity of the immuno-based methods of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification, the capacity of cells susceptible to BoNT/A intoxication to accurately distinguish BoNT/A to the exclusion of partially inactivated BoNT/A was determined. A suitable density of cells from a SiMa cell line was plated into the wells of poly-D-lysine coated 96-well cell culture plates containing 100 µL of a serum-free medium containing Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES and 25 µg/mL GT1b. Cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

and neurite extension (approximately 3 days). The media was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 1) 0 (untreated sample), 0.03 pM, 0.1 pM, 0.31 pM, 0.93 pM, 2.78 pM, 8.33 pM, and 25 pM, of a BoNT/A complex; 2) 0, 0.14 nM, 0.41 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.11 nM, 33.33 nM, and 100 nM of an inactive BoNT/A (iBoNT/A); or 3) 0, 0.14 nM, 0.41 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.11 nM, 33.33 nM, and 100 nM of an LH_N/A fragment. The iBoNT/A contains a mutation in the zinc binding domain of the light chain that completely inactivates the metalloprotease activity of the neurotoxin, see, e.g., Liqing Zhou, et al., *Expression and Purification of the Light Chain of Botulinum Neurotoxin A: A Single Mutation Abolishes its Cleavage of SNAP-25 and Neurotoxicity after Reconstitution with the Heavy Chain*, Biochemistry 34: 15175-15181 (1995), which is hereby incorporated by reference in its entirety. The LH_N/A fragment lacks the binding domain, but contains an intact translocation domain and light chain, see, e.g., Clifford C. Shone, et al., *Recombinant Toxin Fragments*, U.S. Patent 6,461,617, which is hereby incorporated by reference in its entirety. After 24 hrs treatment, the cells were washed, incubated for an additional two days without toxin to allow for the cleavage of SNAP-25 substrate, and harvested as described above in Section 1. After harvesting, the protein concentrations of cell lysates, detection of SNAP-25 cleavage product by ECL sandwich ELISA performed, and the EC_{50} calculated as described above. The results indicate that the binding affinity of cells for iBoNT/A and LH_N/A (EC_{50} > 100 nM) are at least 60,000 lower than the binding affinity for BoNT/A (EC_{50}= 1.6 pM) (FIG. 7). No SNAP-25 cleavage product was detected in cells treated with iBoNT/A at all concentrations tested. Although a low amount of SNAP-25 cleavage product was detected in cells treated with the highest dose of the LH_N/A fragment, this activity is due to non-specific uptake of this fragment due to the activity of the translocation domain. Thus, the results indicate that the immuno-based methods of detecting BoNT/A activity disclosed in the present specification can measure all the steps involved in the intoxication process whereby a BoNT/A proteolytically cleaves a SNAP-25 substrate and encompasses the binding of a BoNT/A to a BoNT/A receptor, the internalization of the neurotoxin/receptor complex, the translocation of the BoNT/A light chain from an intracellular vesicle into the cytoplasm and the proteolytic cleavage of a SNAP-25.

Example VI

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

[0199] The following example illustrates immuno-based methods of detecting BoNT/A activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using a α-SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond using ECL sandwich ELISA.

[0200] To prepare a lysate from cells treated with a BoNT/A, a suitable density of cells from an established cell line was plated into the wells of 96-well tissue culture plates containing 100 µL of a serum-free medium containing Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES and 25 µg/mL GT1b (see Examples I and II). These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide

3NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

[0201] To prepare the α-SNAP-25 capture antibody solution, the α-SNAP-25 monoclonal antibody contained in the ascites from hybridoma cell line 2E2A6 was purified using a standard Protein A purification protocol To prepare the α-SNAP-25 detection antibody solution, α-SNAP-25 rabbit polyclonal antibody S9684 (Sigma, St. Louis, MO) was conjugated to Ruthenium(II)-tris-bipyridine-(4-methysulfonate) NHS ester labeling reagent (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). The conjugation reaction, purification of labeled α-SNAP-25 antibody, concentration determination and storage were as described in Example V.

[0202] To prepare the solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleaved product, approximately 5 µL of α-SNAP-25 monoclonal antibody 2E2A6 solution (20 µg/mL in 1 x PBS) was added to each well of a 96-well MSD High Bind plate and the solution is allowed to air dry in a biological safety cabinet for 2-3 hours in order to liquid evaporate the solution. The capture antibody-bound wells were then blocked and used directly to detect BoNT/A activity.

[0203] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by ECL sandwich ELISA analysis, the Blocking Buffer from stored plates was aspirated from the wells, 25 µL of a lysate from cells treated with BoNT/A was added to each well and the plates were incubated at 4 °C for overnight. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 µl of 5 µg/mL detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate) was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated at room temperature at room temperature for 1 hour with shaking. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 150 µL of 1 x Read Buffer (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) was added to each well and the plates were read using a SECTOR™ Imager 6000 Image Reader (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). The collected data was analyzed and the EC_{50} calculated as described in Example V. A representative result is shown in FIG. 8. These results indicated that on average 1.0 pM of BoNT/A at the EC_{50} was detected (a range of about 0.3 pM to about 2.0 pM) with a signal-to-noise ratio for the lower asymptote of about 15:1 to about 20:1 and a signal-to-noise ratio for the upper asymptote of about 20:1 to about 500:1.

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

Example VII

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

[0204] The following example illustrates immuno-based methods of detecting BoNT/A activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using a α-SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond by CL sandwich ELISA.

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

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

[0207] To prepare the solid phase support comprising the α-SNAP-25 capture antibody that is specific for the SNAP-25 cleaved product, approximately 100 µL of α-SNAP-25 monoclonal antibody 2E2A6 solution (1 mg/mL in 1 x PBS) was added to each well of a 96-well Greiner white plate and the plates were incubated at 4 °C overnight, and then any excess antibody solution was discarded. The capture antibody-bound wells were then blocked by adding 150 µl of Blocking Buffer comprising 2% Amersham Blocking Reagent (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) and 10% goat serum (VWR, West Chester, PA) at room temperature for 1 hour. The blocking buffer was discarded and the plates were blotted dry on paper towels by inverting and tapping. The capture antibody-bound wells were then blocked and used directly to detect BoNT/A activity.

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

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate) was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated on a shaker rotating at 650 rpm at room temperature for 1 hour. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 200 µl 1 x PBS, 0.05% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 100 µl of SuperSignal ELISA Pico 1:1 mixture (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) was added to each well and the plates were read using a luminometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 395 nm. The collected data was analyzed and the EC_{50} calculated as described in Example V. These results indicated that on average 1.0 pM of BoNT/A at the EC_{50} was detected (a range of about 0.3 pM to about 2.0 pM) with a signal-to-noise ratio for the lower asymptote of about 15:1 to about 20:1 and a signal-to-noise ratio for the upper asymptote of about 20:1 to about 500:1.

Example VIII

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

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

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

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

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

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

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

[0212] To prepare the second protein capture antibody solution, the monoclonal antibodies were purchased as purified antibodies. To prepare the second protein detection antibody solution, the appropriate antibody was conjugated to Ruthenium(II)-tris-bipyridine-(4-methysulfonate) NHS ester labeling reagent (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). The conjugation reaction was performed by adding 30 µL of distilled water reconstituted MSD SULFO-TAG™ stock solution to 200 µL of 2 mg/mL polyclonal antibodies and incubating the reaction at room temperature for 2 hours in the dark. The labeled antibodies were purified using a standard spin column protocol and the protein concentration determined using a standard colorimetric protein assay. The absorbance of the antibody/MSD SULFO-TAG™ conjugate was measured at 455 nm using a spectrophotometer to determine the concentration in moles per liter. The detection antibody solution was stored at 4 °C until needed.

[0213] To prepare the solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleaved product, approximately 5 µL of α-SNAP-25 monoclonal antibody 2E2A6 solution (20 µg/mL in 1 x PBS) was added to each well of a 96-well MSD High Bind plate and the solution is allowed to air dry in a biological safety cabinet for 2-3 hours in order to liquid evaporate the solution, and then the plates were sealed and stored at 4 °C until needed. The dried capture antibody-bound wells were then blocked by adding 150 µL of Blocking Buffer comprising of 3% BSA (Pierce, Rockford, IL) 10% goat serum (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA), and Difco 1% skim milk (BD BioSciences Franklin Lakes, NJ) in 0.05% Tween-20 PBS at room temperature for 1-2 hours.

[0214] To detect the presence of protein by ECL sandwich ELISA analysis, the Blocking Buffer from stored plates was aspirated from the wells, 25 µL of a lysate from cells treated with BoNT/A, as described above, was added to each well and the plates were incubated at 4 °C for overnight. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 µL of 5 µg/mL the appropriate second protein detection antibody solution, resuspended in the blocking buffer as described above, was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated at room temperature for about 1 hour with shaking. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 250 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 150 µL of 1 x Read Buffer (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) was added to each well and the plates were read using a SECTOR™ Imager 6000 Image Reader (Meso Scale Discovery,

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

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

Table 13. Screening of Second Protein Antibody Combinations

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

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

[0215] To obtain a BoNT/A treated cell lysate for analysis, a suitable density of cells from a stock culture of a SiMa cell line were seeded into a poly-D-lysine 96-well plate containing a serum-free medium containing Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES. These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 3 days). The media

\SDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

[0216] The α-SNAP-25 capture antibody solution and the α-SNAP-25 detection antibody solution, were prepared as described in Example VII. To prepare the α-GAPDH capture antibody solution, the α-GAPDH monoclonal antibody mouse MAB374 (Chemicon, Temecula, CA) was prepared as described in Section 1 above. To prepare the α-GAPDH detection antibody solution, α-GAPDH rabbit polyclonal antibody G9545 (Sigma, St. Louis, MO) was conjugated to Ruthenium(II)-tris-bipyridine-(4-methysulfonate) NHS ester labeling reagent (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). The conjugation reaction, purification of labeled α-SNAP-25 antibody, concentration determination and storage were as described in Section 1 above.

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

[0218] To detect the presence of SNAP-25 cleavage product by multiplex ECL sandwich ELISA analysis, the Blocking Buffer from stored plates was aspirated from the wells, 25 µL of a lysate from cells treated with BoNT/A, as described above, was added to each well and the plates were incubated at 4 °C for overnight. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 µL of 5 µg/mL the α-SNAP-25 detection antibody solution and 25 µL of 5 µg/mL the α-GAPDH detection antibody solution, as described above, was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated at room temperature for about 1 hour with shaking. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 250 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 150 µL of 1 x Read Buffer (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) was added to each well and the plates were read using a SECTOR™ Imager 6000 Image Reader (Meso Scale Discovery; Gaithersburg, MD). The collected data was analyzed and the relative potency from the normalized data is calculated as described in Example V, except that PLA 2.0 software (Stegmann Systems, GmbH, Germany) was used.

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

280

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

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

Example IX

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

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

[0222] The lysate from cells treated with a BoNT/A was prepared as described in Example VI. The α-SNAP-25 capture antibody solution, the α-SNAP-25 detection antibody solution, and the α-SNAP-25 solid phase support were prepared as described in Example VII.

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

[0224] To prepare the solid phase support comprising a second capture antibody specific for the second protein, approximately 100 µL of monoclonal antibody solution comprising 1 µg/mL α-GAPDH monoclonal antibody MAB374 was added to each well of a 96-well Greiner white plate and the plates were incubated at 4 °C overnight, and then any excess antibody solution was discarded. The α-GAPDH capture antibody-bound wells were then blocked by adding 150 µl of Blocking Buffer comprising 2% Amersham Blocking Reagent (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) and 10% goat serum (VWR, West Chester, PA) at room temperature for 1 hour. The blocking buffer was discarded and the plates were blotted dry on paper towels by inverting and tapping. The capture antibody-bound wells were then blocked and used directly to detect BoNT/A activity.

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

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

antibody solid phase support and the α-GAPDH capture antibody solid phase support, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated on a shaker rotating at 500 rpm at 4 °C for 2-4 hours to overnight. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µl 1 x PBS, 0.05 % TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 100 µL of a detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate), and 1 mg/mL α-SNAP-25 polyclonal antibody/HRP was added to each well of the α-SNAP-25 capture antibody solid phase support, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated on a shaker rotating at 650 rpm at room temperature for 1 hour. Similarly, 100 µL of a detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate), and 0.25 mg/mL α-GAPDH G9545 polyclonal antibody/HRP (Sigma Co., St Louis, MO) was added to each well of the α-GAPDH capture antibody solid phase support, the plate was sealed, and the sealed plate was placed on a shaker rotating at 650 rpm at room temperature for 1 hour. After detection antibody incubation, the wells were washed three times with 200 µl 1 x PBS, 0.05% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 100 µl of SuperSignal ELISA Pico 1:1 mixture (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) was added to each well and the plates were read using a luminometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 395 nm. The collected data was analyzed and the EC_{50} calculated as described in Example V. The results indicated that the data points collected for the amounts of α-SNAP-25antibody-antigen complex detected were a better fit after normalization to the amounts of α-GAPDH antibody-antigen complex detected, thereby producing a more accurate reading. These results indicated that on average 1.0 pM of BoNT/A at the EC_{50} was detected (a range of about 0.3 pM to about 2.0 pM) with a signal-to-noise ratio for the lower asymptote of about 15:1 to about 20:1 and a signal-to-noise ratio for the upper asymptote of about 20:1 to about 500:1.

[0226] A similar design can be used for multiplex immuno-based methods of detecting BoNT/A activity by detecting a SNAP-25 cleavage product using a α-SNAP-25 monoclonal antibody specific for a SNAP-25 cleavage product having a carboxyl-terminus at the P_1 residue of the BoNT/A cleavage site scissile bond using ECL sandwich ELISA with the same α-GAPDH antibody pair.

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

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

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

3NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

282

[0228] To prepare a lysate from cells treated with a BoNT/A, approximately 50,000 to 150,000 cells from an established cell line were plated into the wells of 96-well tissue culture poly-D-lysine plates containing 100 µL of a serum-free medium containing Minimum Essential Medium, 2 mM GlutaMAX™ I with Earle's salts, 1 x B27 supplement, 1 x N2 supplement, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 10 mM HEPES and 25 µg/mL GT1b (see Examples I and II). These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 2 to 3 days). The media from the differentiated cells was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.03 pM, 0.1 pM, 0.3 pM, 0.9 pM, 2.8 pM, 8.3 pM, or 25 pM of a BoNT/A pharmaceutical product reconstituted in a sodium chloride free solution; or 0 (untreated sample), 0.7 U/mL, 2.1 U/mL, 6.2 U/mL, 18.5 U/mL, 55.6 U/mL, 166.7 U/mL or 500 U/mL of a BoNT/A pharmaceutical product reconstituted in a sodium chloride free medium. Because the BoNT/A pharmaceutical product contains sodium chloride, its addition to the culture medium resulted in a hypertonic media that was detrimental to cell viability. To circumvent the hypertonicity issue, 200 µL of MEM media made without sodium chloride was used to reconstitute the BoNT/A pharmaceutical product giving a final concentration of 25 pM BoNT/A (500 U/mL). The matrix was kept constant for all concentrations along the dose-response curve by adding sodium chloride in the media used to make the dilutions match the amount of excipients present at the highest concentration used (25 pM or 500 U/mL). After a 24 hr treatment, the cells were washed, and incubated for an additional two days without toxin. To harvest the cells, the medium was aspirated, washed with 1 x PBS, and lysed by adding 30 µl of Lysis Buffer comprising 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100 to each well, and the plate incubated on a shaker rotating at 500 rpm for 30 minutes at 4 °C. The plate was centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes at 4 °C to pellet cellular debris and the supernatant was transferred to a capture antibody coated 96-well plate to perform the detection step.

[0229] The α-SNAP-25 capture antibody solution, the α-SNAP-25 detection antibody solution, and the solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleaved product were prepared as described in Example VI.

[0230] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by ECL sandwich ELISA analysis, the Blocking Buffer from stored plates was aspirated, 25 µL of a lysate from cells treated with BoNT/A was added to each well and the plates were incubated at 4 °C for either 2 hrs or 24 hrs. Plate wells were washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 25 µl of 5 µg/mL α-SNAP-25 detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate) was added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated at room temperature for 1 hour with shaking. After α-SNAP-25 detection antibody incubation, the wells were washed three times with 200 µL 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, the plates were processed, collected data

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

was analyzed, and the EC_{50} calculated as described in Example V. These results indicated that on average 1.0 pM of BoNT/A at the EC_{50} was detected (a range of about 0.3 pM to about 2.0 pM) with a signal-to-noise ratio for the lower asymptote of about 15:1 to about 20:1 and a signal-to-noise ratio for the upper asymptote of about 20:1 to about 500:1 (FIG. 9). This method can also be performed in a multiplex fashion as described in Example VIII.

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

[0231] Lysate from cells treated with a BoNT/A and the α-SNAP-25 capture antibody solution will be prepared as described in Example VI. The α-SNAP-25 detection antibody solution and solid phase support comprising the capture antibody that is specific for a SNAP-25 cleaved product will be prepared as described in Example VII.

[0232] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by CL sandwich ELISA analysis, 25 µL of a lysate from cells treated with BoNT/A will be added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated on a shaker rotating at 500 rpm at 4 °C for either 2 hrs or 24 hrs. Plate wells will be washed three times by aspirating the cell lysate and rinsing each well three times with 200 µl 1 x PBS, 0.05 % TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing, 100 µL of 1 mg/mL α-SNAP-25 polyclonal antibody/HRP detection antibody solution comprising 2% Amersham Blocking Reagent in 1 x PBS, 0.1% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate) will be added to each well, the plate was sealed, and the sealed plate was incubated on a shaker rotating at 650 rpm at room temperature for 1 hour. After detection antibody incubation, the wells will be washed three times with 200 µl 1 x PBS, 0.05% TWEEN-20® (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaureate). After washing 100 µl of SuperSignal ELISA Pico 1:1 mixture (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) will be added to each well and the plates will be read using a luminometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 395 nm. The collected data will be analyzed and the EC_{50} will be calculated as described in Example V. This method can also be performed in a multiplex fashion as described in Example VIII.

Example XI

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

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

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

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

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

[0235] To detect the presence or absence of neutralizing α-BoNT/A antibodies, the immuno-based methods of determining BoNT/A activity disclosed in the present specification can be used. One way is to determine the amount of SNAP-25 cleavage product present after treatment with various concentrations of BoNT/A using a Western blot detection method, the other way was to use an ECL sandwich ELISA detection method.

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

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

[0238] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by Western blot analysis, the media was aspirated from each well, the cells suspended in 50 µL of SDS-PAGE loading buffer, and then heated to 95 °C for 5 minutes. An aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that harvested samples are separated by SDS-PAGE using 12 % 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the rabbit polyclonal α-SNAP-25_{197} antibody serum was used as the primary antibody (see Example IV). The results indicate that test samples resulted in reduced cleavage of SNAP25 when compared to the negative control sample, demonstrating that the serum from the immunized individual contained neutralizing α-BoNT/A antibodies.

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

285

[0239] To detect the presence of a cleaved SNAP-25 product by ECL Sandwich ELISA, the media was removed from each well and the cells were lysed as described in Example V. The α-SNAP-25 capture antibody solution, the α-SNAP-25 detection antibody solution, and the α-SNAP-25 solid phase support were prepared as described in Example VII. Supernatants were transferred to the α-SNAP-25 solid phase support and an ECL sandwich ELISA assay was performed as detailed in Example V. The collected data was analyzed and the EC_{50} calculated as described in Example V, except that the EC_{50} is the serum dilution needed to inhibit the activity of the BoNT/A to ½ its maximum and the ratio of maximal signal ($Signal_{Max}$) to minimum signal ($Signal_{Min}$) was obtained by dividing the SNAP-25 cleavage product signal obtained with the highest dilution of serum by the signal obtained with the lowest serum dilution.

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

Example XII

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

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

[0242] To introduce an exogenous BoNT/A receptor into cells comprising an established cell line, an expression construct comprising a polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 130 encoding the FGFR2 of SEQ ID NO: 59, or a polynucleotide molecule of SEQ ID NO: 139 encoding the FGFR3 of SEQ ID NO: 25, was transfected into cells from an established cell line by a cationic lipid method. A suitable density (about 5 $x10^6$ cells) of cells from an established cell line are plated in a 100 mm tissue culture dish containing 5 mL of complete culture media and grown in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells reached a density appropriate for transfection. A 3 mL transfection solution is prepared by adding 1.5 mL of OPTI-MEM Reduced Serum Medium containing 60 µL of LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) incubated at room temperature for 5 minutes to 1.5 mL of OPTI-MEM Reduced Serum Medium containing 24 µg of an expression construct encoding a FGFR2 or a FGFR3, or a control expression construct encoding a green fluorescent protein (GFP). This transfection mixture was incubated at room temperature for approximately 30 minutes. The complete media is replaced with the 3 mL transfection solution and the cells are incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for approximately 8 hours. Transfection media is replaced with 3 mL of fresh complete culture media and the cells are incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for approximately 24 hours. Media is replaced with 3 mL of fresh complete culture media containing approximately 1mM G418 (Invitrogen,

)NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

Carlsbad, CA). Cells are incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide for approximately 1 week, the old media is replaced with fresh complete culture media containing 0.5 mM G418. Once antibiotic-resistant colonies are established, resistant clones are replated to new 100 mm culture plates containing fresh complete culture media, supplemented with approximately 0.5 mM G418 until these cells reached a density of 6 to $20x10^5$ cells/mL.

[0243] To determine if the overexpression of BoNT/A receptors improved cell susceptibility to BoNT/A intoxication or improved BoNT/A uptake capacity, a dose-response curve was generated using cells treated with different doses of a BoNT/A complex. To prepare a lysate from cells treated with a BoNT/A, a suitable density of cells from an established transfected cell line was plated into the wells of 96-well tissue culture plates containing 100 µL of an appropriate serum-free medium (Table 5). These cells were incubated in a 37 °C incubator under 5% carbon dioxide until the cells differentiated, as assessed by standard and routine morphological criteria, such as growth arrest and neurite extension (approximately 3 days). The media from the differentiated cells was aspirated from each well and replaced with fresh media containing either 0 (untreated sample), 0.01 nM, 0.04 nM, 0.12 nM, 0.37 nM, 1.1 nM, 3.3 nM, and 10 nM of a BoNT/A complex for cells comprising a SiMa or a PC12 transfected cell line; and 0 (untreated sample), 0.14 nM, 0.40 nM, 1.2 nM, 3.7 nM, 11 nM, 33 nM, and 100 nM of a BoNT/A complex for cells comprising a Neuro-2a transfected cell line. The cells were treated with BoNT/A containing media for 6 hrs followed by incubation with fresh media for 15 hrs and harvested by adding 40 µL of 2 x SDS-PAGE loading buffer and heating the plate to 95 °C for 5 min.

[0244] To detect for the presence of SNAP-25 cleavage product, an aliquot from each harvested sample was analyzed by Western blot as described in Example I, except that harvested samples are separated by SDS-PAGE using 12% 26-well Criterion gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the following primary antibodies were used a 1:1,000 dilution of rabbit polyclonal α-SNAP-25 antibody serum (Example IV) (AGN, polyclonal antibody), a 1:500 dilution of α-FGFR2 rabbit polyclonal C-17 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), or a 1:500 dilution of α-FGFR3 rabbit polyclonal C-15 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The intensity of the protein of interest from each sample was calculated using Image Quant (GE Healthcare, Piscataway, NJ), and the EC_{50} for each of the cells lines was estimated using SigmaPlot software.

[0245] The results indicate that cells transfected with FGFR2 or FGFR3 were more sensitive to BoNT/A than cells transfected with GFP and also showed a higher level of SNAP-25 cleavage (Table 14). The EC_{50} values for cells over-expressing FGFR2 or FGFR3 were lower than the EC_{50} values exhibited by cells over-expressing GFP, indicating that introduction of FGFR2 or FGFR3 improved cell susceptibility to BoNT/A intoxication or improved BoNT/A uptake capacity.

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

INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

CB7

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

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

INSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

What is claimed:

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

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

3. An isolated α-SNAP-25 antibody,

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

wherein the α-SNAP-25 antibody has an association rate constant for an epitope not comprising a carboxyl-terminus glutamine of the BoNT/A cleavage site scissile bond from a SNAP-25 cleavage product of less than $1 \times 10^{1}\ M^{-1}\ s^{-1}$; and

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

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

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

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

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

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

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

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

\SDOCID: <WO____2009114748A1_1_>

7. An isolated α-SNAP-25 antibody comprising at least a V_H CDR3 of SEQ ID NO: 100, a V_H CDR3 of SEQ ID NO: 101, or a V_H CDR3 of SEQ ID NO: 102.

8. A method of detecting BoNT/A activity, the method comprising the steps of:

   a. treating a cell from an established cell line with a sample comprising a BoNT/A, wherein the cell from an established cell line is susceptible to BoNT/A intoxication by about 500 pM or less of a BoNT/A;

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

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

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

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

   wherein detection by the antibody-antigen complex is indicative of BoNT/A activity.

9. The method of Claim 8, wherein the SNAP-25 cleavage product is $SNAP\text{-}25_{197}$.

10. The method of Claim 8, wherein the presence of an antibody-antigen complex is detected using a sandwich ELISA.

11. The method of Claim 8, wherein the method has a signal-to-noise ratio at the lower asymptote of at least 3:1 and a signal-to-noise ratio at the upper asymptote of at least 10:1.

12. The method of Claim 8, wherein the sample comprises at most 100 pM of a BoNT/A

NSDOCID: <WO____2009114748A1_I_>

13. The method of Claim 8, wherein the cell from an established cell line is susceptible to BoNT/A intoxication by about 100 pM or less of a BoNT/A.

14. The method of Claim 8, wherein the method is performed in a singleplex fashion or a multiplex fashion.

15. A method of determining BoNT/A immunoresistance in a mammal comprising the steps of:

a. adding a BoNT/A to a test sample obtained from a mammal being tested for the presence or absence of α-BoNT/A neutralizing antibodies;

b. treating a cell from an established cell line with the test sample, wherein the cell from an established cell line is susceptible to BoNT/A intoxication;

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

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

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

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

f. repeating steps b-e with a negative control sample instead of a test sample, the negative control sample comprising a BoNT/A and a serum known not to contain α-BoNT/A neutralizing antibodies; and

g. comparing the amount of antibody-antigen complex detected in step e to the amount of antibody-antigen complex detected in step f.

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

291

wherein detection of a lower amount of antibody-antigen complex detected in step e relative to the amount of antibody-antigen complex detected in step f is indicative of the presence of α-BoNT/A neutralizing antibodies.

NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

292

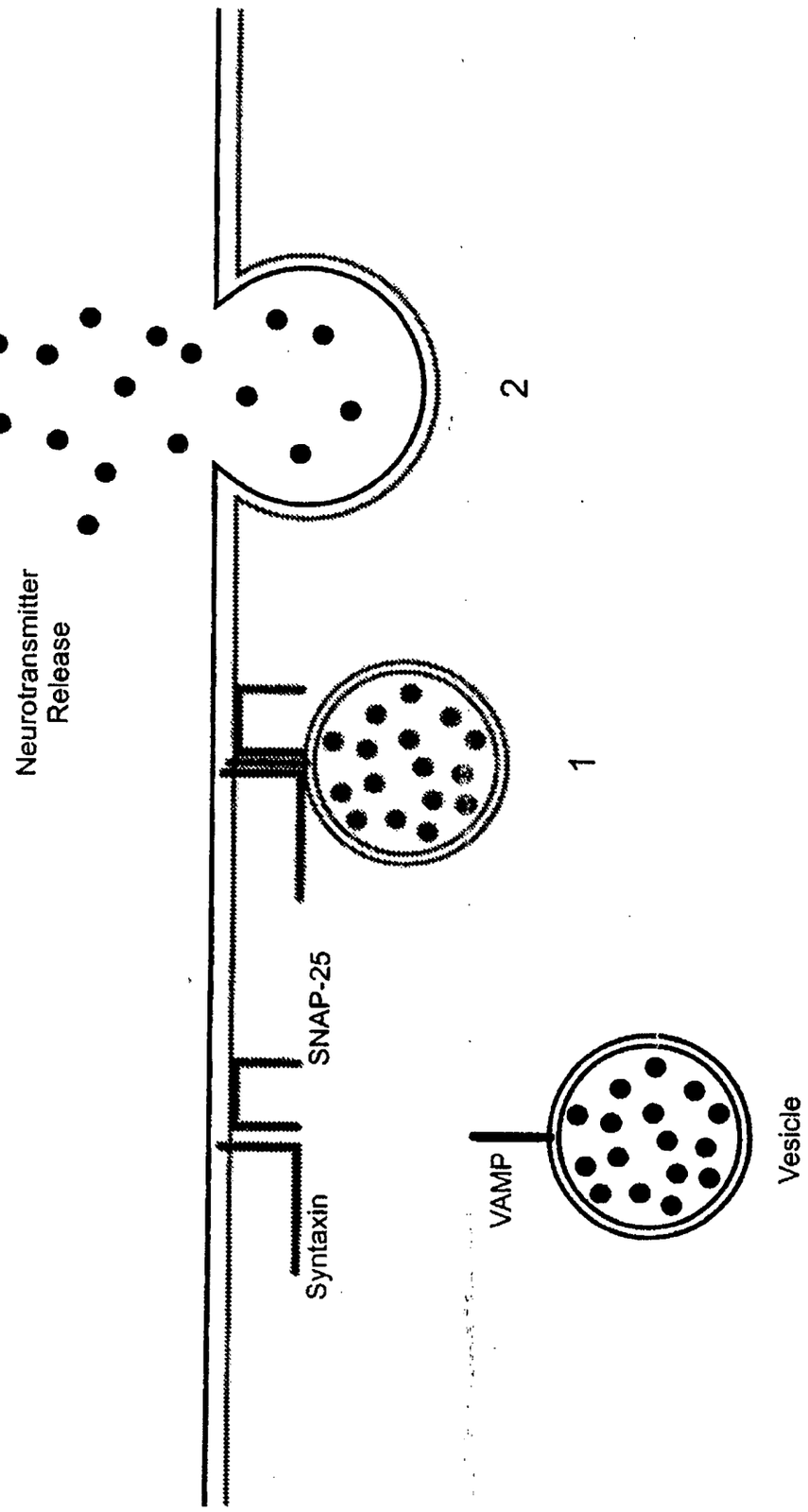

Neurotransmitter Release
2
1
SNAP-25
Syntaxin
VAMP
Vesicle

FIG. 1A.

293

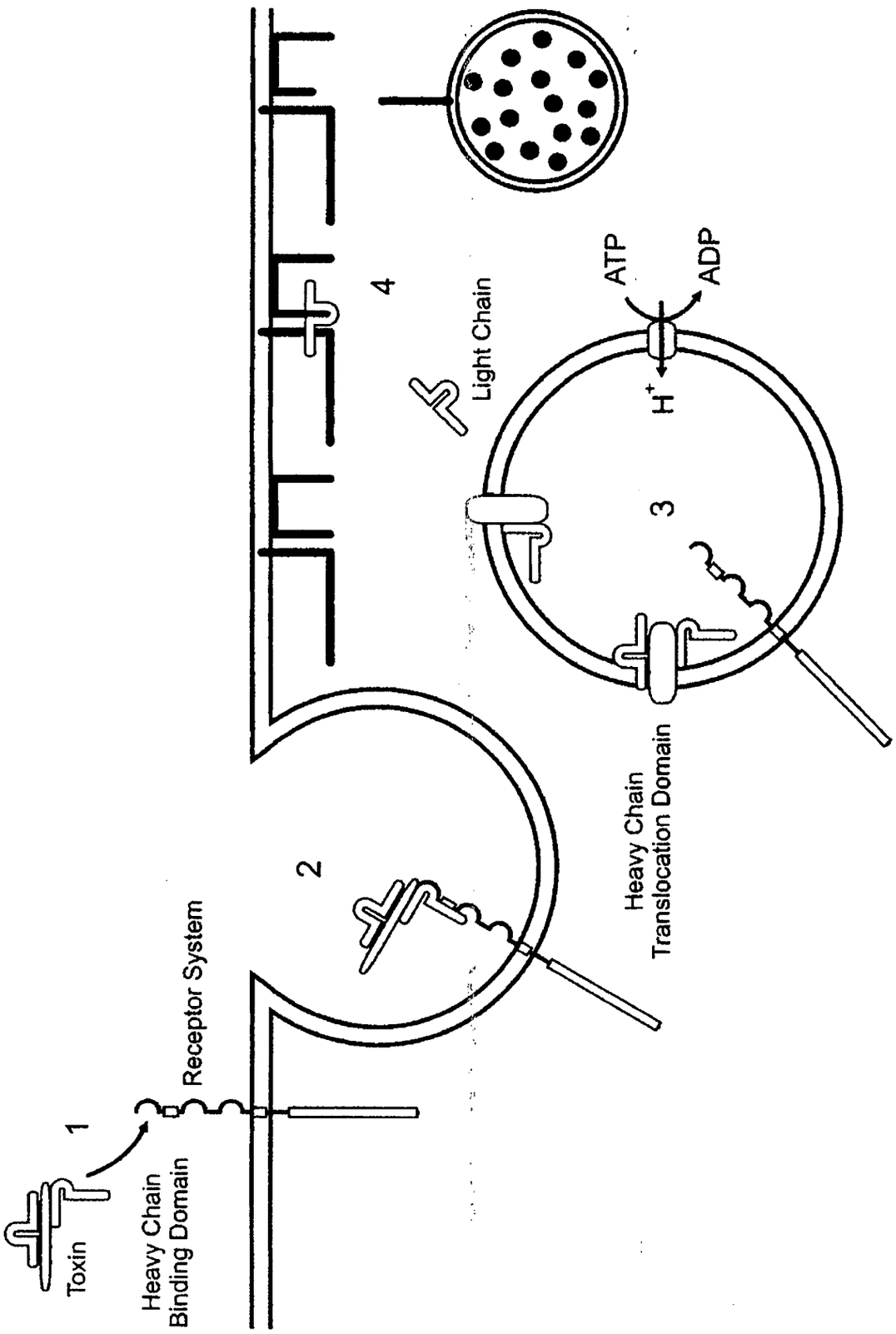
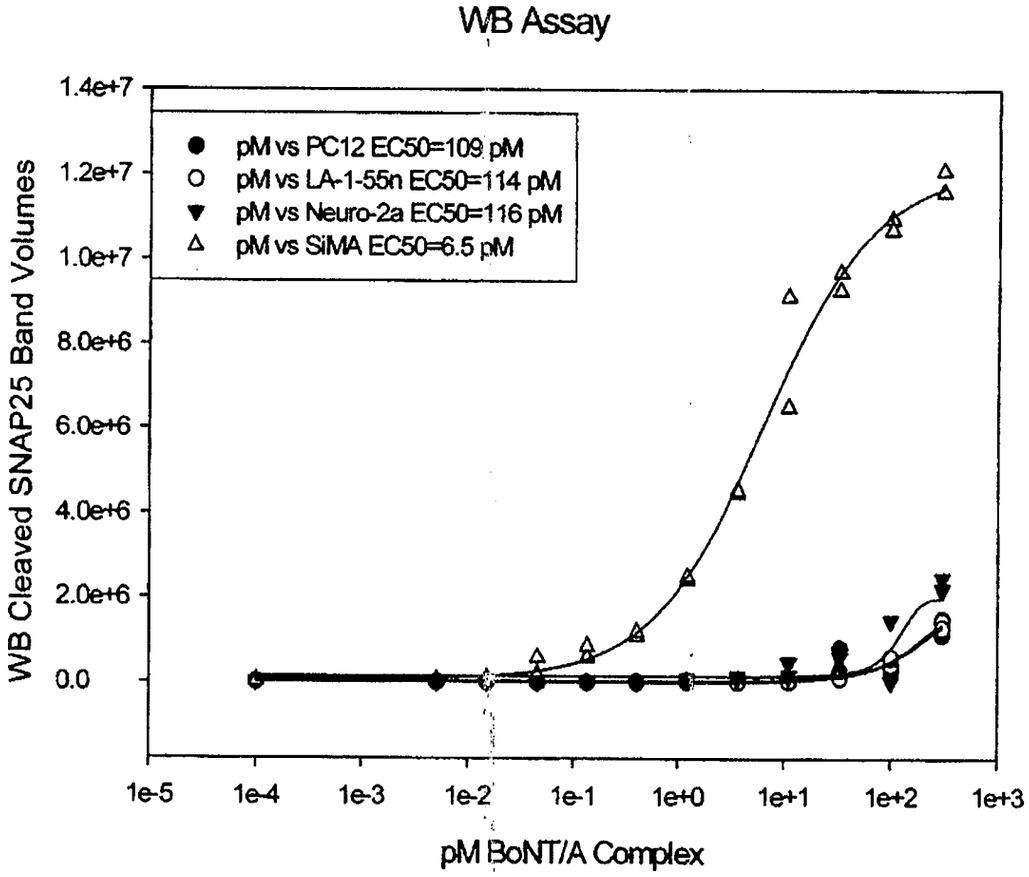

1
Toxin
Heavy Chain
Binding Domain
Receptor System
2
Heavy Chain
Translocation Domain
3
H+
ATP
ADP
Light Chain
4

FIG. 1B.

294

FIG. 2. 3/11

A

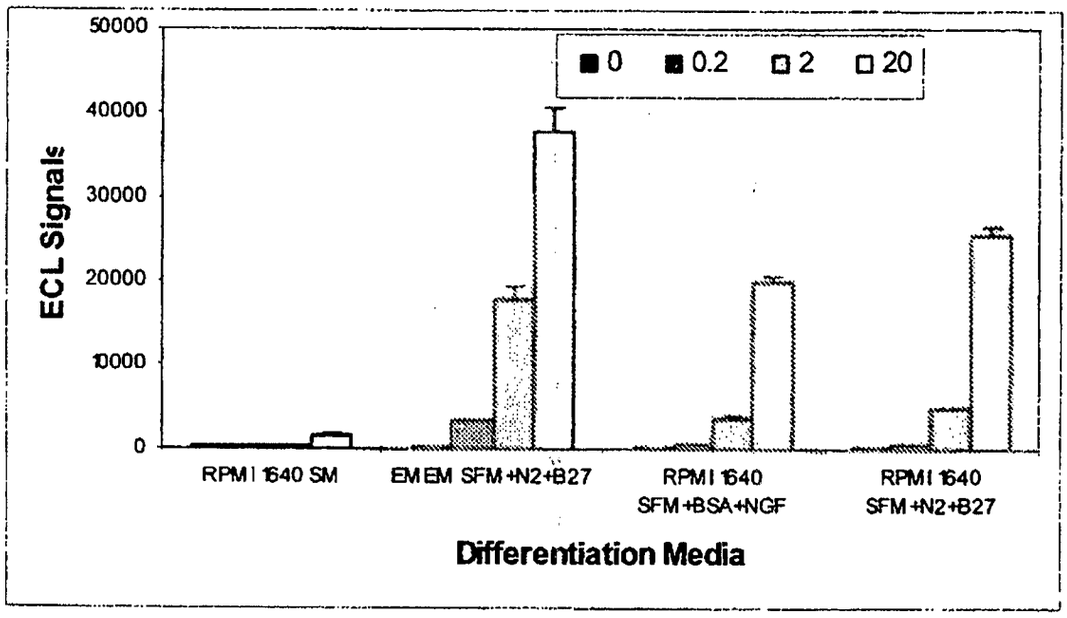


B

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

295

FIG. 3.



INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

FIG. 4.

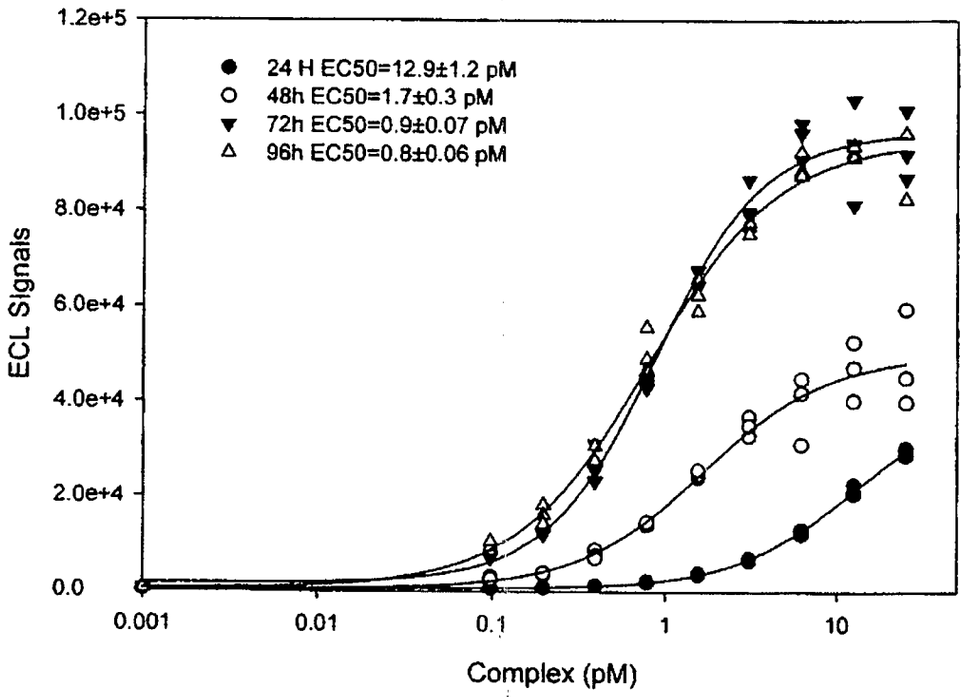
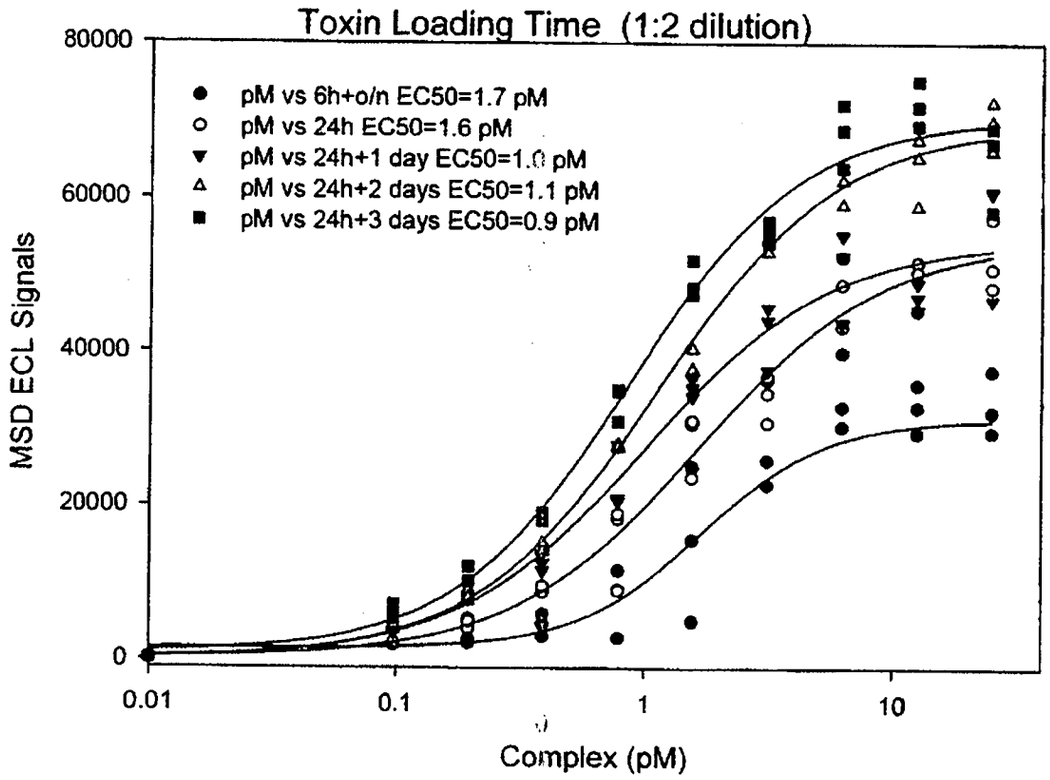

1.2e+5
1.0e+5
8.0e+4
6.0e+4
4.0e+4
2.0e+4
0.0
ECL Signals
24 H EC50=12.9±1.2 pM
48h EC50=1.7±0.3 pM
72h EC50=0.9±0.07 pM
96h EC50=0.8±0.06 pM
0.001
0.01
0.1
1
10
Complex (pM)

FIG. 5.



:NSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

298

FIG. 6.

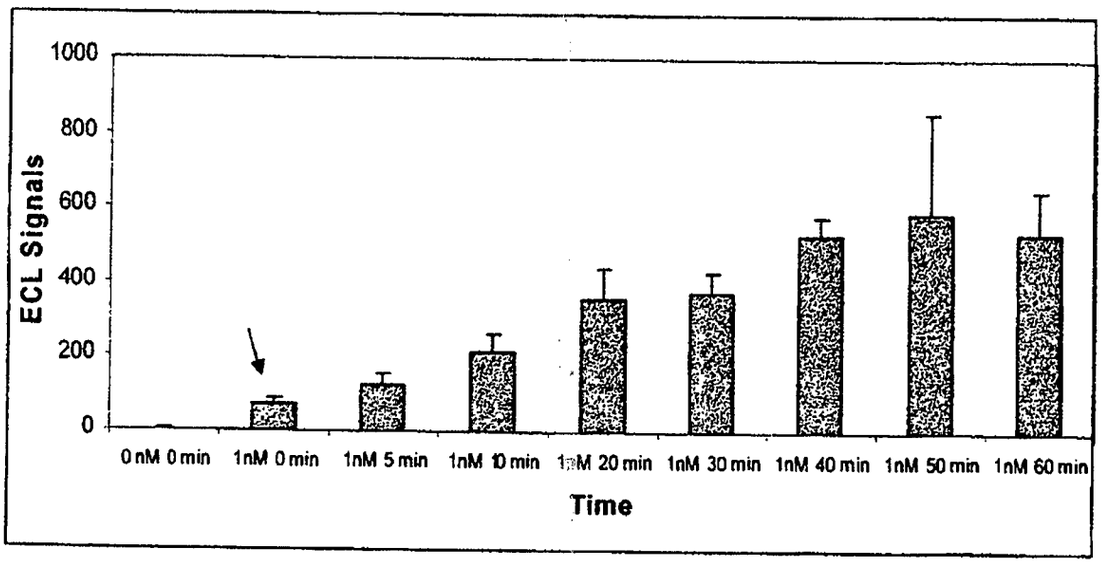

1000
800
600
400
200
0
ECL Signals
0 nM 0 min
1nM 0 min
1nM 5 min
1nM 10 min
1nM 20 min
1nM 30 min
1nM 40 min
1nM 50 min
1nM 60 min
Time

FIG. 7.

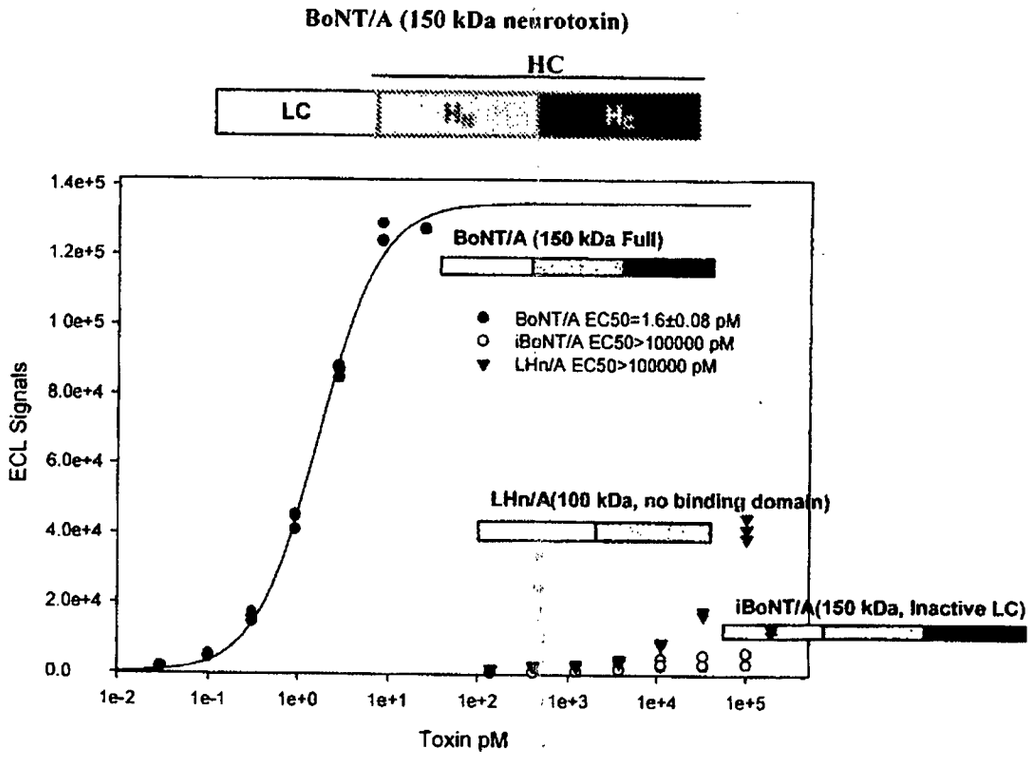

BoNT/A (150 kDa neurotoxin)
HC
LC
H_N
H_C
1.4e+5
1.2e+5
1.0e+5
8.0e+4
6.0e+4
4.0e+4
2.0e+4
0.0
ECL Signals
BoNT/A (150 kDa Full)
BoNT/A EC50=1.6±0.08 pM
iBoNT/A EC50>100000 pM
LHn/A EC50>100000 pM
LHn/A(100 kDa, no binding domain)
iBoNT/A(150 kDa, Inactive LC)
1e-2
1e-1
1e+0
1e+1
1e+2
1e+3
1e+4
1e+5
Toxin pM

FIG. 8.

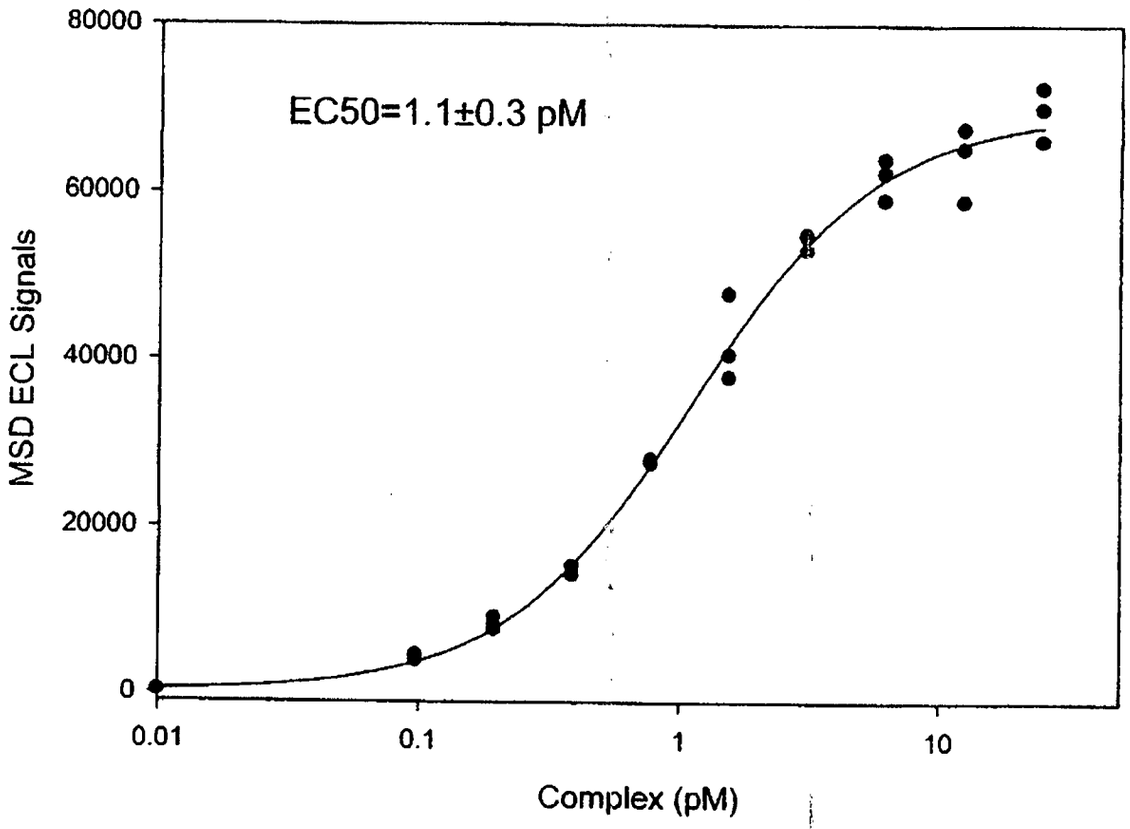
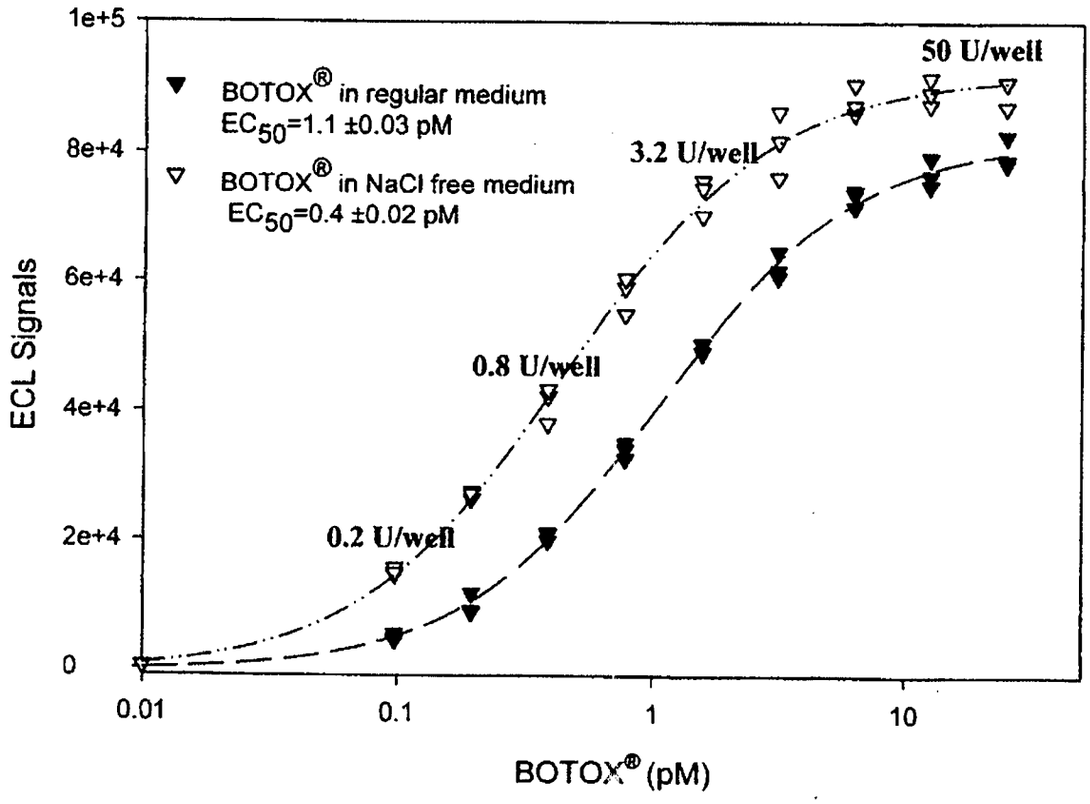

EC50=1.1±0.3 pM
MSD ECL Signals
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
Complex (pM)

FIG.9.



INSDOCID: <WO_____2009114748A1_I_>

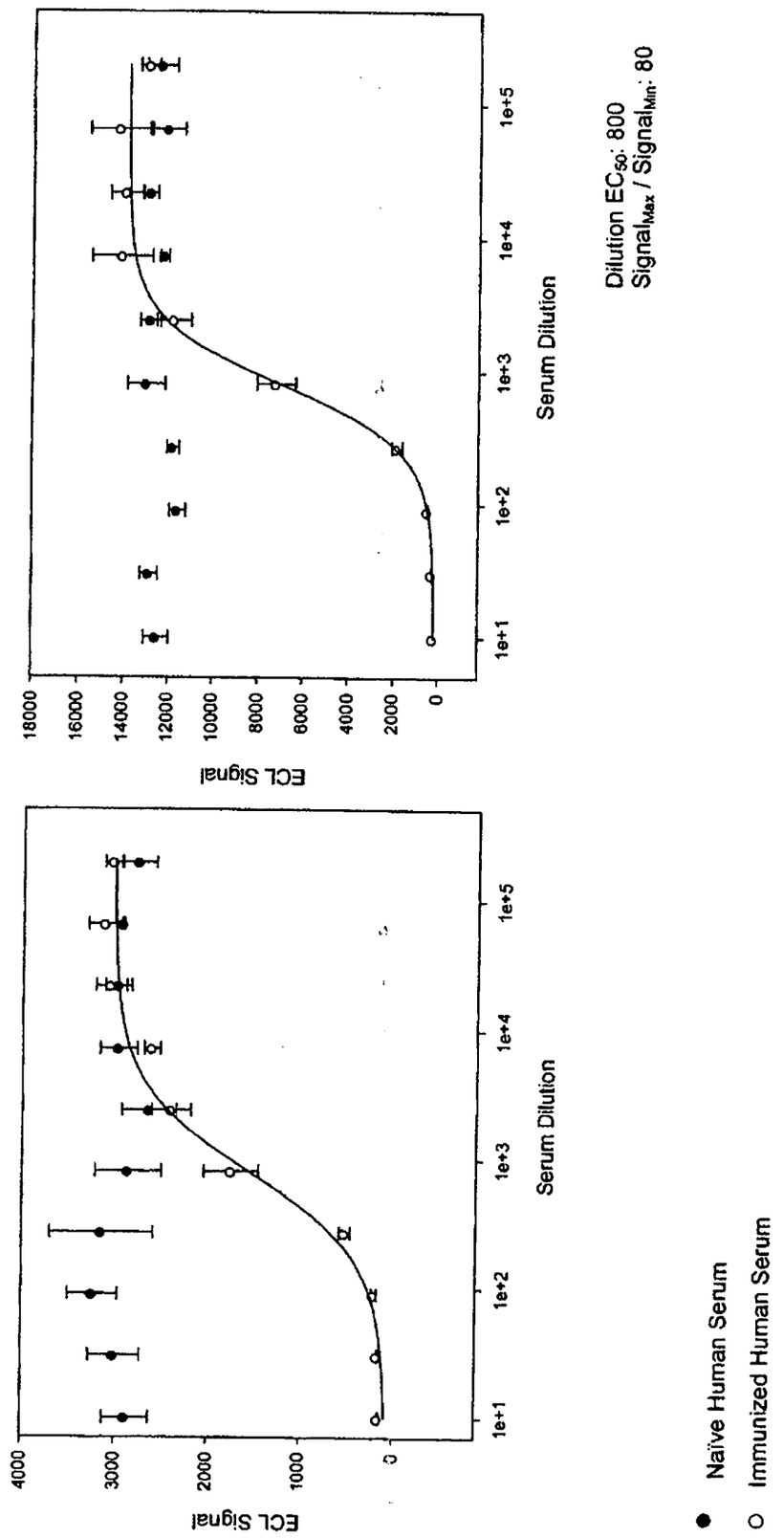

3 days differentitaion
15 hour exposure
ECL Signal
Serum Dilution
Dilution EC_{50}: 800
$Signal_{Max}$ / $Signal_{Min}$: 80
6 hours differentitaion
15 hour exposure
ECL Signal
Serum Dilution
Naïve Human Serum
Immunized Human Serum

FIG. 10.

303

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 85,225
FECHA : OCTUBRE 11 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-126241- -00000-0000

Fecha: 2010-10-11 17:06:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 305

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO PINEDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19869205	11/10/2010	6,959,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL : $	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

304

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 85,228
FECHA : OCTUBRE 11 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-126241- -00000-0000
Fecha: 2010-10-11 17:06:50 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 305

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO PINEDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19869205	11/10/2010	6,959,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	PENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
5	50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	130,000.00
		TOTAL : $	130,000.00

SON: CIENTO TREINTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

305

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-126241- -00000-0000

Fecha: 2010-10-11 17:06:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 305

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CASTILLO BONILLA JERONIMO
Apoderado(a) y/o Representante de
ALLERGAN INC.

REFERENCIA	Radicación No.	10 126241
	Solicitud internacional	PCT/US2009/037046
	Fecha inicio fase nacional	14/10/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	14096

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continua en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 29 OCT. 2010
adpa11