

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-143689

(P2015-143689A)

(43) 公開日 平成27年8月6日(2015.8.6)

(51) Int.Cl.	F 1			テーマコード (参考)
<b>G01N 33/53</b> (2006.01)	GO1N	33/53	Z N A S	4 B 0 6 3
<b>C12Q 1/02</b> (2006.01)	C12Q	1/02		4 H 0 4 5
<b>C07K 16/18</b> (2006.01)	C07K	16/18		
<b>G01N 33/543</b> (2006.01)	GO1N	33/543	5 4 5 A	

審査請求 有 請求項の数 16 O L 外国語出願 (全 111 頁)

(21) 出願番号	特願2015-28972 (P2015-28972)	(71) 出願人	591018268 アーラган、インコーポレイテッド A L L E R G A N, I N C O R P O R A T E D アメリカ合衆国92612カリフォルニア 州アーヴィン、デュポン・ドライブ252 5番
(22) 出願日	平成27年2月17日 (2015.2.17)	(72) 発明者	エステル・フェルナンデス-サラス アメリカ合衆国92831カリフォルニア 州フラートン、ロッキー・ロード1710 番
(62) 分割の表示	特願2010-550881 (P2010-550881) の分割	(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
原出願日	平成21年3月13日 (2009.3.13)		
(31) 優先権主張番号	61/036,723		
(32) 優先日	平成20年3月14日 (2008.3.14)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫基盤ボツリヌス毒素血清A型アッセイ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】免疫基盤ボツリヌス毒素血清A型アッセイを提供する。

【解決手段】所定の工程を含むB o N T / A活性を検出する方法であって、S N A P - 2 5構成要素を固相支持体に連結された - S N A P - 2 5抗体と接触させること、 - S N A P - 2 5抗体およびB o N T / A切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有するS N A P - 2 5切斷生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること、ここで抗体 - 抗原複合体による検出はB o N T / A活性を示す；の工程を含んでなるB o N T / A活性を検出する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a . 確立された細胞株からの細胞を B o N T / A を含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は 5 0 0 p M 以下の B o N T / A による B o N T / A 中毒に感受性が高い；

b . 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離すること；

c . S N A P - 2 5 構成要素を固相支持体に連結された - S N A P - 2 5 抗体と接触させること、

ここで - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し、 - S N A P - 2 5 抗体はインタクトな S N A P - 2 5 に関して  $1 \times 1 0 ^ 1 M ^ { - 1 } s ^ { - 1 }$  未満の会合速度定数を有し；そして - S N A P - 2 5 抗体はエピトープに関して  $0 . 4 5 0 n M$  未満の平衡解離定数を有し、かつ

( i ) 該 - S N A P - 2 5 抗体は配列番号： 7 2 、配列番号： 7 4 、配列番号： 7 6 、配列番号： 8 0 もしくは配列番号： 8 2 に示されるアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変領域を含んでなるか、または

( i i ) 該 - S N A P - 2 5 抗体は配列番号： 1 0 0 、配列番号： 1 0 1 もしくは配列番号： 1 0 2 に示されるアミノ酸配列からなる V<sub>H</sub> C D R 3 を含んでなる；

d . - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること、

ここで抗体 - 抗原複合体による検出は B o N T / A 活性を示す；

の工程を含んでなる B o N T / A 活性を検出する方法。

## 【請求項 2】

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

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

c . 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離すること；

d . S N A P - 2 5 構成要素を固相支持体に連結された - S N A P - 2 5 抗体に接触させること、

ここで - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し、 - S N A P - 2 5 抗体はインタクトな S N A P - 2 5 に関して  $1 \times 1 0 ^ 1 M ^ { - 1 } s ^ { - 1 }$  未満の会合速度定数を有し；そして - S N A P - 2 5 抗体はそのエピトープに関して  $0 . 4 5 0 n M$  未満の平衡解離定数を有し、かつ

( i ) 該 - S N A P - 2 5 抗体は配列番号： 7 2 、配列番号： 7 4 、配列番号： 7 6 、配列番号： 8 0 もしくは配列番号： 8 2 に示されるアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変領域を含んでなるか、または

( i i ) 該 - S N A P - 2 5 抗体は配列番号： 1 0 0 、配列番号： 1 0 1 もしくは配列番号： 1 0 2 に示されるアミノ酸配列からなる V<sub>H</sub> C D R 3 を含んでなる；

e . - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；

f . 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b - e を繰り返すこと、ここで陰性対照試料は B o N T / A 、および - B o N T / A 中和抗体を含有しないことが解っている血清を

10

20

30

40

50

含んでなる；ならびに

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

ここで工程fで検出された抗体-抗原複合体の量に対して工程eで検出された抗体-抗原複合体のより少ない検出量は-BONT/A中和抗体の存在を示す；  
の工程を含んでなる哺乳動物におけるBONT/A免疫抵抗性を決定する方法。

**【請求項3】**

S N A P - 2 5 切断生成物が S N A P - 2 5<sub>1,9,7</sub> である請求項1または2に記載の方法。

**【請求項4】**

抗体-抗原複合体の存在がサンドイッチE L I S Aを使用して検出される請求項1～3のいずれかに記載の方法。

**【請求項5】**

検出の下限で方法において検出されるシグナル：バックグラウンドシグナルが少なくとも3：1であり、検出の上限で方法において検出されるシグナル：バックグラウンドシグナルが少なくとも10：1である請求項1～4のいずれかに記載の方法。

**【請求項6】**

試料が多くても100pMのBONT/Aを含んでなる請求項1～5のいずれかに記載の方法。

**【請求項7】**

確立された細胞株からの細胞が100pM以下のBONT/AによるBONT/A中毒に感受性が高い請求項1～6のいずれかに記載の方法。

**【請求項8】**

方法がシングルプレックス様式またはマルチプレックス様式で実施される請求項1～7のいずれかに記載の方法。

**【請求項9】**

担体、可動性リンカーおよびS N A P - 2 5 抗原を含んでなる組成物であって、ここで、該担体、該可動性リンカーおよび該S N A P - 2 5 抗原は前述の順序で連結されており、可動性リンカーは少なくとも3個のアミノ酸を含んでなり、S N A P - 2 5 抗原は配列番号：148、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、または配列番号：37に示されるアミノ酸配列を含んでなる、組成物。

**【請求項10】**

可動性リンカーおよびS N A P - 2 5 抗原のアミノ酸配列が配列番号：38に示されるアミノ酸配列からなる、請求項9に記載の組成物。

**【請求項11】**

BONT/A切断部位切断可能結合のカルボキシリ末端グルタミンを有するS N A P - 2 5 切断生成物に対する免疫応答の誘発における使用のための、請求項9または10に記載の組成物。

**【請求項12】**

単離された-S N A P - 2 5 抗体がS N A P - 2 5 切断生成物からのBONT/A切断部位切断可能結合のカルボキシリ末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し；

-S N A P - 2 5 抗体がインタクトなS N A P - 2 5 に関して $1 \times 10^{-1} M^{-1} s^{-1}$ 未満の会合速度定数を有し；そして

-S N A P - 2 5 抗体がそのエピトープに関して0.450nM未満の平衡解離定数を有する、

単離された-S N A P - 2 5 抗体。

**【請求項13】**

エピトープが配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項12に記載の単離された-S N A P - 2 5 抗体。

**【請求項14】**

10

20

30

40

50

配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：80または配列番号：82に示されるアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変領域を含んでなる、単離された - S N A P - 25 抗体。

**【請求項 15】**

配列番号：100、配列番号：101または配列番号：102に示されるアミノ酸配列からなる V<sub>H</sub> C D R 3 を含んでなる単離された - S N A P - 25 抗体。

**【請求項 16】**

請求項 12～15のいずれかに記載の単離された - S N A P - 25 抗体を含んでなる、請求項 1～8のいずれかに記載の方法における使用のための組成物。

**【発明の詳細な説明】**

10

**【技術分野】**

**【0001】**

本発明は、免疫基盤ボツリヌス毒素血清 A 型アッセイに関する。

**【0002】**

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

**【背景技術】**

**【0003】**

例えばボツリヌス神経毒 (BoNT)、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F および BoNT/G ならびに破傷風神経毒 (TeNT) のようなクロストリジウム毒素がニューロン伝達を阻止する能力は多様な治療的および美容的適用において活用されており、例えば非特許文献 1 を参照されたい。医薬組成物として市販により入手可能なクロストリジウム毒素には、例えば BOTOX (登録商標) (Allergan, Inc., Irvine, CA)、DYSPORT (登録商標) / RELOXIN (登録商標)、(Ipsen Ltd., Slough, England)、PURTOX (登録商標) (Mentor Corp., Santa Barbara, CA)、XEOMIN (登録商標) (Merz Pharmaceuticals, GmbH., Frankfurt, Germany)、NERONOX (登録商標) (Medy-Tox, Inc., Ochang-myeon, South Korea)、BTX-A (Biogen- tech Ltd., University, Yantai, Shandong, China) のような BoNT/A 調製物；および例えば MYOBLOC (登録商標) / NEUROBLOC (登録商標) (Solvance Neurosciences, Inc., South San Francisco, CA) のような BoNT/B 調製物が含まれる。実例としては BOTOX (登録商標) は現在米国において痙性斜頸に関連する頭部位置異常および頸部疼痛の重篤度を低下させるための成人の痙性斜頸の処置；局所薬で十分に管理がされない重篤な原発性腋窩多汗症の処置；ならびに 12 歳以上の患者における良性本態性眼瞼痙攣または第 V II 神経傷害を含むジストニアに関連する斜視および眼瞼痙攣の処置に関して承認されている。

20

**【0004】**

現在のところ致死試験であるマウス LD<sub>50</sub> バイオアッセイは依然その調製物の効力を表現するために全ての製薬業者により使用される「ゴールドスタンダード」である。非特許文献 2。実際に、医薬製剤のラベルの単位はマウス LD<sub>50</sub> 単位であり、そして統計的に有用な LD<sub>50</sub> データを生成するために必要な動物の数が多い。マウス LD<sub>50</sub> バイオアッセイの有利な点は、例えば軽鎖酵素活性のみを測定するインビトロアッセイのような単にこの中毒過程の一部のみに関する活性を決定する代わりに、ボツリヌス毒素取り込みに必要な工程を全て測定するということである（例えば細胞表面受容体への毒素結合、毒素 - 受容体複合体の内部移行、細胞質への軽鎖転位置、基質の軽鎖切断）。不幸にもマウス LD<sub>50</sub> バイオアッセイは、多数の実験動物が必要とされるための高い操作コスト、全ての BoNT 血清型が同じ測定可能なエンドポイントを引き起こすであろうから、特異性の欠如、および大きな動物群を使用しない場合の不正確さの潜在を含む多くの欠点に悩まされる。加えて動物保護団体が動物試験を低減し、そしてさらに重要なことには製品リリースのためのマウス LD<sub>50</sub> バイオアッセイを替えるように米国 (FDA / NICEAT

30

40

50

M / I C C V A M ) および欧州 ( M H R A および E D Q M ) の監督官庁、ならびにボツリヌス神経毒生成物を製造する製薬会社に圧力をかけている。監督官庁は製薬会社に、ボツリヌス神経毒の効力試験に対する 3 つの「 R 」原理 : 低減する ( Reduce ) 、洗練する ( Refine ) 、置き換える ( Replace ) ; を適用するように約束させている。「ボツリヌス毒素 A 型の効力試験に対する 3 つの R の適用における進歩」非特許文献 3 。近年では、プロトコールを標準化し、そしてアッセイあたりにより少ない動物を使用してさらに一貫したデータを生成するために、マウス LD<sub>50</sub> バイオアッセイを低減および洗練するいくつかの工程が既に採用されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1 】 William J. Lipham, Cosmetic and Clinical Applications of Botulinum Toxin ( Slack, Inc., 2004 )

【非特許文献 2 】 S. S. Arnon et al., JAMA 285 : 1059 - 1070 ( 2001 )

【非特許文献 3 】 D. Straughan, Altern. Lab. Anim. 34 ( 3 ) : 305 - 313 ( 2006 )

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

故に、かかる非動物基盤のアッセイにより動物試験の必要性が軽減され、そしてこの型の動物基盤のアッセイに随伴される全ての不利な点、経費および倫理的な問題が軽減されるので、ボツリヌス毒素取り込みに必要な全ての工程の完全性を評価することができる、簡単で、信頼性のある、検証された、そして行政機関が受け入れ可能なボツリヌス毒素活性アッセイは有意に価値のあるものであろう。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本明細書は例えば医薬品および食品産業のような種々の産業に有用なボツリヌス毒素 A の活性を検定するための新規組成物、細胞および方法を提供し、そして同様に関係する有利な点を提供する。かかる組成物、細胞および方法は生存動物または生存動物から取られた組織を使用しないが、神経毒作用に必要な工程を全て評価することができる。

【0008】

即ち、本発明の要旨は、

( 1 ) a . 確立された細胞株からの細胞を B o N T / A を含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は 5 0 0 p M 以下の B o N T / A による B o N T / A 中毒に感受性が高い ;

b . 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離すること ;

c . S N A P - 2 5 構成要素を固相支持体に連結された - S N A P - 2 5 抗体と接触させること、

ここで - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し、 - S N A P - 2 5 抗体はインタクトな S N A P - 2 5 に関して  $1 \times 1 0 ^ { 1 } M ^ { - 1 } s ^ { - 1 }$  未満の会合速度定数を有し ; そして - S N A P - 2 5 抗体はエピトープに関して 0 . 4 5 0 n M 未満の平衡解離定数を有し、かつ

( i ) 該 - S N A P - 2 5 抗体は配列番号 : 7 2 、配列番号 : 7 4 、配列番号 : 7 6 、配列番号 : 8 0 もしくは配列番号 : 8 2 に示されるアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変領域を含んでなるか、または

( i i ) 該 - S N A P - 2 5 抗体は配列番号 : 1 0 0 、配列番号 : 1 0 1 もしくは配列番号 : 1 0 2 に示されるアミノ酸配列からなる V<sub>H</sub> C D R 3 を含んでなる ;

d . - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシ

10

20

30

40

50

ル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること、

ここで抗体 - 抗原複合体による検出は B o N T / A 活性を示す；

の工程を含んでなる B o N T / A 活性を検出する方法、

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

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

c . 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離すること；

d . S N A P - 2 5 構成要素を固相支持体に連結された - S N A P - 2 5 抗体に接触させること、

ここで - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し、 - S N A P - 2 5 抗体はインタクトな S N A P - 2 5 に対して  $1 \times 10^1 M^{-1} s^{-1}$  未満の会合速度定数を有し；そして - S N A P - 2 5 抗体はそのエピトープに対して  $0.450 nM$  未満の平衡解離定数を有し、かつ

( i ) 該 - S N A P - 2 5 抗体は配列番号： 7 2 、配列番号： 7 4 、配列番号： 7 6 、配列番号： 8 0 もしくは配列番号： 8 2 に示されるアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変領域を含んでなるか、または

( i i ) 該 - S N A P - 2 5 抗体は配列番号： 1 0 0 、配列番号： 1 0 1 もしくは配列番号： 1 0 2 に示されるアミノ酸配列からなる V<sub>H</sub> C D R 3 を含んでなる；

e . - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；

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

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

ここで工程 f で検出された抗体 - 抗原複合体の量に対して工程 e で検出された抗体 - 抗原複合体のより少ない検出量は - B o N T / A 中和抗体の存在を示す；

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

[ 3 ] S N A P - 2 5 切断生成物が S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> である [ 1 ] または [ 2 ] に記載の方法、

[ 4 ] 抗体 - 抗原複合体の存在がサンドイッチ E L I S A を使用して検出される [ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれかに記載の方法、

[ 5 ] 検出の下限で方法において検出されるシグナル：バックグラウンドシグナルが少なくとも 3 : 1 であり、検出の上限で方法において検出されるシグナル：バックグラウンドシグナルが少なくとも 1 0 : 1 である [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載の方法、

[ 6 ] 試料が多くても 1 0 0 p M の B o N T / A を含んでなる [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれかに記載の方法、

[ 7 ] 確立された細胞株からの細胞が 1 0 0 p M 以下の B o N T / A による B o N T / A 中毒に感受性が高い [ 1 ] ~ [ 6 ] のいずれかに記載の方法、

[ 8 ] 方法がシングルプレックス様式またはマルチプレックス様式で実施される [ 1 ] ~ [ 7 ] のいずれかに記載の方法、

[ 9 ] 担体、可動性リンカーおよび S N A P - 2 5 抗原を含んでなる組成物であって、ここで、該担体、該可動性リンカーおよび該 S N A P - 2 5 抗原は前述の順序で連結されており、可動性リンカーは少なくとも 3 個のアミノ酸を含んでなり、 S N A P - 2 5 抗原は

配列番号：148、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、または配列番号：37に示されるアミノ酸配列を含んでなる、組成物、

[10] 可動性リンカーおよびS N A P - 25抗原のアミノ酸配列が配列番号：38に示されるアミノ酸配列からなる、[9]に記載の組成物、

[11] B o N T / A切断部位切斷可能結合のカルボキシル末端グルタミンを有するS N A P - 25切斷生成物に対する免疫応答の誘発における使用のための、[9]または[10]に記載の組成物、

[12] 単離された - S N A P - 25抗体がS N A P - 25切斷生成物からのB o N T / A切断部位切斷可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し；

- S N A P - 25抗体がインタクトなS N A P - 25に関して  $1 \times 10^{-1} M^{-1} s^{-1}$  未満の会合速度定数を有し；そして

- S N A P - 25抗体がそのエピトープに関して  $0.450 nM$  未満の平衡解離定数を有する、

単離された - S N A P - 25抗体、

[13] エピトープが配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含んでなる、[12]に記載の単離された - S N A P - 25抗体、

[14] 配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：80または配列番号：82に示されるアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変領域を含んでなる、単離された - S N A P - 25抗体、

[15] 配列番号：100、配列番号：101または配列番号：102に示されるアミノ酸配列からなるV<sub>H</sub> C D R 3を含んでなる単離された - S N A P - 25抗体、

[16] [12] ~ [15]のいずれかに記載の単離された - S N A P - 25抗体を含んでなる、[1] ~ [8]のいずれかに記載の方法における使用のための組成物に関する。

#### 【発明の効果】

#### 【0009】

本発明により、免疫基盤ボツリヌス毒素血清A型アッセイが提供され得る。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0010】

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

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

【図2】図2はウェスタンプロット分析による4つの細胞株におけるB o N T / A取り込みの比較を示す。図2Aは細胞株を処理するために使用されたB o N T / Aの量に基づい

10

20

30

40

50

て検出されたS N A P - 2 5 切断生成物のグラフを示す。4パラメーターロジスティックモデルを用いてSigmaPlotでデータを分析し、そして各細胞株に関してE C<sub>50</sub>値を得た。検出されたS N A P - 2 5 切断生成物シグナルのランキングは：S i M a > > N e u r o - 2 a > L A 1 - 5 5 n > P C 1 2 であった。図2Bは300pM対0pMおよび1.2pM対0pMでの生シグナルのシグナル対ノイズ比がアッセイに関して計算されたことを示す。S i M a 細胞は最高のシグナル対ノイズ比および最低のE C<sub>50</sub>値を生じた。

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

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

【図5】図5は本明細書において開示されるB o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法において有用な確立された細胞株を含んでなる細胞のB o N T / A 処理の最適化を示す。結果により、試験されたいずれかのB o N T / A 処理で2pM未満のE C<sub>50</sub>が達成されたことが示される。

【図6】図6は本明細書において開示されるB o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法の感度を示す。結果により、細胞によるB o N T / A の取り込みには、バックグラウンドを超えた有意量のS N A P - 2 5 切断生成物を生成する前に1分未満しかかからなかったことが示される。

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

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

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

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

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0 0 1 1】

##### 【詳細な説明】

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

##### 【0 0 1 2】

故に本明細書にて開示される1つの態様はS N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A 切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシリ末端を含んでなるエピトープに結合することができる-S N A P - 2 5 抗体を生成するための組成物を提供する。組成物はアジュvantおよびS N A P - 2 5 抗原、S N A P - 2 5 抗原に連結された担体またはS N A P - 2 5 抗原に連結された可動性スペーサーに連結された担体を含む組成物を含んでなることができ、ここで可動性リンカーはS N A P - 2 5 抗原と担体の間に介在する。S N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A 切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカル

ボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 抗体を生成する免疫応答を誘発する任意のおよび全ての S N A P - 2 5 抗原が、限定するものではないが、天然発生 S N A P - 2 5 から誘導される S N A P - 2 5 抗原、非天然発生 S N A P - 2 5 から誘導される S N A P - 2 5 抗原、および S N A P - 2 5 、天然発生 S N A P - 2 5 または非天然発生 S N A P - 2 5 からの S N A P - 2 5 の免疫反応生フラグメントを含んでなる S N A P - 2 5 抗原を含む S N A P - 2 5 抗原として有用であり得ることが想定される。 S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 抗体を生成するために有用な S N A P - 2 5 抗原には限定するものではないが、限定するものではないが配列番号 : 3 8 を含む担体ペプチドに連結されたカルボキシル化された C 末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 ペプチドを含んでなる S N A P - 2 5 抗原が含まれる。 S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 抗体を作成するために有用なその他の組成物には限定するものではないが、カルボキシル化された C 末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 抗原に連結された可動性リンカーに連結された担体を含んでなる組成物が含まれ、ここで可動性リンカーは S N A P - 2 5 抗原と担体の間に介在する。限定するものではないが、ポリエチレングリコール ( P E G ) 、モノメトキシポリエチレングリコール ( m P E G ) 、ポリビニルアルコール ( P V A ) 、フロイント完全および不完全アジュvantを含む任意のおよび全てのアジュvantがかかる組成物において有用であり得ることが想定される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 3 】

本明細書に開示される別の態様は、 S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 抗体を生成する方法を提供する。この方法の態様は ( a ) 本明細書において開示される組成物を動物に投与すること ; ( b ) - S N A P - 2 5 抗体または - S N A P - 2 5 抗体生成細胞を含有する試料を動物から収集すること ; および ( c ) 試料から - S N A P - 2 5 抗体を単離すること ; の工程を含んでなる。開示された方法は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体、または S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体のいずれかを作成するために有用である。

## 【 0 0 1 4 】

本明細書に開示されるさらに別の態様は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 抗体を提供する。かかる - S N A P - 2 5 抗体は天然発生および非天然発生抗体、ならびにモノクローナル - S N A P - 2 5 抗体またはポリクローナル - S N A P - 2 5 抗体の双方を含む。 S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体として有用なモノクローナル - S N A P - 2 5 抗体には限定するものではないが、ハイブリドーマ細胞株 1 D 3 B 8 、 2 C 9 B 1 0 、 2 E 2 A 6 、 3 C 1 A 5 および 3 C 3 E 2 から生成されたモノクローナル - S N A P - 2 5 抗体が含まれる。

## 【 0 0 1 5 】

本明細書に開示されるなお別の態様は B o N T / A 活性を検出する方法を提供する。この方法の態様は ( a ) 確立された細胞株からの細胞を B o N T / A を含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T / A 中毒に感受性が高い ; ( b ) 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離するこ

と；(c) S N A P - 2 5 構成要素を、S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 抗体と接触させること；ならびに(d) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体 - 抗原複合体による検出は B o N T / A 活性の指標である；の工程を含んでなる。工程 c の - S N A P - 2 5 抗体は場合によっては固相支持体に連結され得る。

#### 【0016】

本明細書に開示されるなお別の態様は B o N T / A 活性を検出する方法を提供する。この方法の態様は(a)確立された細胞株からの細胞を B o N T / A を含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T / A を取り込むことができる；(b)処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離すること；(c) S N A P - 2 5 構成要素を、S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 抗体と接触させること；ならびに(d) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体 - 抗原複合体による検出は B o N T / A 活性の指標である；の工程を含んでなる。工程 c の - S N A P - 2 5 抗体は場合によっては固相支持体に連結され得る。

#### 【0017】

本明細書に開示されるさらなる態様は哺乳動物における B o N T / A 免疫抵抗性を決定する方法を提供する。この方法の態様は(a) - B o N T / A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料に B o N T / A を添加すること；(b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T / A 中毒に感受性が高い；(c) 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離すること；(d) S N A P - 2 5 構成要素を、S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 抗体と接触させること；(e) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；(f) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程 a - e を繰り返すこと；ならびに(g) 工程(e)で検出された抗体 - 抗原複合体の量を工程(f)で検出された抗体 - 抗原複合体の量と比較すること、ここで工程(f)で検出された抗体 - 抗原複合体の量に相対して工程(e)で検出された抗体 - 抗原複合体のより少ない検出量は - B o N T / A 中和抗体の存在の指標である；の工程を含んでなる。工程 d の - S N A P - 2 5 抗体は場合によっては固相支持体に連結されていてよい。工程 f における対照試料はまた陰性対照試料に加えて陽性対照試料を含むこともできる。

#### 【0018】

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、クロストリジウム・バラティ (*Clostridium baratii*) およびクロストリジウム・ブチリクム (*Clostridium butyricum*) により生成されるクロストリジウム毒素はヒトおよびその他の哺乳動物の治療的および美容的処置において最も広く用いられているものである。ボツリヌス菌の株は 7 つの抗原的に区別されるボツリヌス毒素の血清型 (B o N T) を生成し、それはヒト (B o N T / A、B o N T / B、B o N T / E および B o N T / F)、動物 (B o N T / C 1 および B o N T / D) または土壤から単離されたもの (B o N T / G) におけるボツリヌス症激増を調査することにより同定されている。7 つ全てのボツリヌス毒素血清型は類似の構造および生物学的特性を有するが、各々はまた例えば異なる薬理学的特性的ような異種性の特徴をも表示する。対照的に、破傷風毒素 (T e N T) は破傷風菌の均一の群により生成される。クロストリジウムの 2 つのその他の種、クロストリジウム・

10

20

30

40

50

バラティおよびクロストリジウム・ブチリクムもまた各々 B o N T / F および B o N T / E に類似する毒素を生成する。

【0019】

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

【0020】

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

10

20

30

40

50

a., Trends Biochem. Sci. 27 (11) : 552 - 558 (2002) ; 「ニューロンにおける破傷風およびボツリヌス神経毒の行程」Giovanna Lalli et al. Trends Microbiol. 11 (9) : 431 - 437 (2003) を参照されたい。

### 【0021】

本開示の態様は一部では S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 抗体を生成するための組成物を含んでなる。本開示のその他の態様は一部では S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 抗体を生成するための免疫応答誘起組成物を含んでなる。本明細書で使用される際には「免疫応答誘起組成物」なる用語は S N A P - 2 5 抗原を含んでなる組成物を指し、それは動物に投与された場合、S N A P - 2 5 抗原に対する免疫応答を刺激し、それにより S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合することができる - S N A P - 2 5 抗体を生成する。「免疫応答」なる用語は動物の免疫系による免疫応答誘起組成物に対する任意の応答を指す。免疫応答の実例には、限定するものではないが、例えば C D 8 + C T L の抗原特異的誘起を含む C T L 応答、T 細胞増殖応答およびサイトカイン放出を含むヘルパー T 細胞応答、ならびに例えば抗体生成応答を含む B 細胞応答のような、細胞ならびに局所性および全身性液性免疫が含まれる。「免疫応答を誘起する」なる用語は免疫応答誘起組成物または免疫応答誘起組成物をコードするポリヌクレオチドの投与をさし、ここで免疫応答は影響を受ける、すなわち刺激、開始または誘起される。10 20

### 【0022】

組成物は S N A P - 2 5 抗原を含んでなる。本明細書で使用される際には「抗原」なる用語は免疫応答を引き出す分子を指し、そして限定するものではないが、ペプチド、多糖類および例えばリポタンパク質および糖脂質のような脂質の抱合体を含む。本明細書で使用される際には「S N A P - 2 5 抗原」なる用語は免疫応答を引き出すことができる B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する任意の抗原を指す。免疫応答誘起組成物において使用される S N A P - 2 5 抗原は配列が実質的に独特であるために十分に大きくなければならず、故に S N A P - 2 5 以外の抗原に対して交差反応性である抗体を生成する可能性を低減する。加えて免疫応答誘起組成物において使用される S N A P - 2 5 抗原は実質的に B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 に対してのみ免疫応答を誘発するために十分に小型でなければならず、故に B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 を B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を欠如する S N A P - 2 5 と区別することができる - S N A P - 2 5 抗体を生成する可能性が増大する。さらに再現性よく選択的である良好な収率で、そしてそれは高度に感受性のアッセイの設計を可能にするために許容されるアビディティーで結合する単一のアミノ酸配列の - S N A P - 2 5 抗体を作成することも非常に望ましい。30

### 【0023】

S N A P - 2 5 に存在する B o N T / A 切断部位を取り囲む配列は P<sub>5</sub> - P<sub>4</sub> - P<sub>3</sub> - P<sub>2</sub> - P<sub>1</sub> - P<sub>1</sub> ' - P<sub>2</sub> ' - P<sub>3</sub> ' - P<sub>4</sub> ' - P<sub>5</sub> ' として示され、P<sub>1</sub> - P<sub>1</sub> ' は切断可能結合を表す。B o N T / A による切断時に、生成された得られた切断生成物は P<sub>5</sub> - P<sub>4</sub> - P<sub>3</sub> - P<sub>2</sub> - P<sub>1</sub> 配列を含むフラグメントおよび P<sub>1</sub> ' - P<sub>2</sub> ' - P<sub>3</sub> ' - P<sub>4</sub> ' - P<sub>5</sub> ' を含むフラグメントを含んでなる。故に本明細書で使用される際には「B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 」なる用語はそのカルボキシル末端アミノ酸として P<sub>1</sub> 残基を有する任意の S N A P - 2 5 を指す。例えばヒト S N A P - 2 5 (配列番号 : 5 ) の Q<sub>197</sub> - R<sub>198</sub> は B o N T / A 切断部位に関する P<sub>1</sub> - P<sub>1</sub> ' 切断可能結合を表す。そのように「B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 」はそのカルボキシル末端アミノ酸でグルタミンを有する任意の S N A P - 2 5 切断生成物であり、ここでグ40 50

ルタミンは切断可能結合の Q<sub>1,9,7</sub> を表す。別の実例として、トルpedo・マルモラータ (Torpedo marmorata) S N A P - 2 5 の K<sub>2,0,4</sub> - H<sub>2,0,5</sub> (配列番号 : 1 6 ) は B o N T / A 切断部位に関する P<sub>1</sub> - P<sub>1</sub> ' 切断可能結合を表す。そのように「 B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端リジンを有する S N A P - 2 5 」はそのカルボキシル末端アミノ酸でリジンを有する任意の S N A P - 2 5 切断生成物であり、ここでリジンは切断可能結合の K<sub>2,0,4</sub> を表す。

## 【 0 0 2 4 】

B o N T / A 切断部位からの B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原を修飾して、 S N A P - 2 5 抗原、ハプテンまたは、修飾を随伴しない場合に免疫原性、非免疫原性もしくは弱い免疫原性である任意の他の抗原性化合物の免疫原性を増強することができる。この実施態様の態様では、 S N A P - 2 5 抗原の切断可能結合からのカルボキシル末端 P<sub>1</sub> 残基をカルボキシル化することができる。カルボキシル化により 2 つの点で S N A P - 2 5 抗原の望ましい免疫原特性が増大する。第 1 に荷電したアミノ酸は免疫原性を増強するので、カルボキシル末端残基への C O O<sup>-</sup> 基の付加は S N A P - 2 5 抗原の全体的な免疫原性を増大するであろう。第 2 に、 B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基は切断時に荷電した状態であるので、カルボキシル末端残基への C O O<sup>-</sup> 基の付加は、本明細書に開示される - S N A P - 2 5 抗体が結合するように設計された実際の抗原をより良好に擬似するであろう。

10

## 【 0 0 2 5 】

この実施態様の態様では、 S N A P - 2 5 抗原を例えばキーホールリンペットヘモシアニン (K L H) 、卵白アルブミン (O V A) 、サイログロブリン (T H Y) 、ウシ血清アルブミン (B S A) 、ダイズトリリップシン阻害剤 (S T I) または多重付着ペプチド (multiple attachment peptide) (M A P) のような担体タンパク質に付着させるのに適合したアミノ酸の付加により、 S N A P - 2 5 抗原からのアミノ末端残基を修飾することができる。例えば担体タンパク質 K L H を抱合するためにシステイン残基をアミノ末端で置き換えることができる。

20

## 【 0 0 2 6 】

故に実施態様では、 B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原は例えば少なくとも 5 、少なくとも 6 、少なくとも 7 、少なくとも 8 、少なくとも 9 、少なくとも 1 0 、少なくとも 1 1 、少なくとも 1 2 、少なくとも 1 3 、少なくとも 1 4 、少なくとも 1 5 、少なくとも 1 6 、少なくとも 1 7 、少なくとも 1 8 、少なくとも 1 9 、少なくとも 2 0 、少なくとも 2 5 または少なくとも 3 0 アミノ酸長でよい。別の実施態様では、 B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原は例えば多くても 5 、多くても 6 、多くても 7 、多くても 8 、多くても 9 、多くても 1 0 、多くても 1 1 、多くても 1 2 、多くても 1 3 、多くても 1 4 、多くても 1 5 、多くても 1 6 、多くても 1 7 、多くても 1 8 、多くても 1 9 、多くても 2 0 、多くても 2 5 または多くても 3 0 アミノ酸長でよい。さらに別の実施態様では、 B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原は例えば 7 - 1 2 アミノ酸の間、 1 0 - 1 5 アミノ酸の間または 1 3 - 1 8 アミノ酸の間でよい。

30

## 【 0 0 2 7 】

別の実施態様では、 B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号 : 3 2 を含んでなる。この実施態様の態様では、 B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号 : 3 3 、配列番号 : 3 4 、配列番号 : 3 5 、配列番号 : 3 6 、配列番号 : 3 7 、配列番号 : 1 4 7 または配列番号 : 1 4 8 を含んでなる。さらなる実施態様では、 B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号 : 3 8 を含んでなる。

40

## 【 0 0 2 8 】

なお別の実施態様では、 B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル

50

末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号：3 9 を含んでなる。この実施態様の態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号：4 0 、配列番号：4 1 、配列番号：4 2 、配列番号：4 3 または配列番号：4 4 を含んでなる。さらなる実施態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号：4 5 を含んでなる。

#### 【 0 0 2 9 】

S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体を生成する免疫応答を誘発する任意のおよび全ての S N A P - 2 5 抗原が S N A P - 2 5 抗原として有用であり得ると想定される。故に配列番号：3 2 、配列番号：3 3 、配列番号：3 4 、配列番号：3 5 、配列番号：3 6 、配列番号：3 7 、配列番号：3 9 、配列番号：4 0 、配列番号：4 1 、配列番号：4 2 、配列番号：4 3 、配列番号：4 4 、配列番号：1 4 7 または配列番号：1 4 8 を含んでなるアミノ酸配列バリアントは、S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体を生成する免疫応答を誘発するための S N A P - 2 5 抗原として有用であり得る。故に実施態様では、S N A P - 2 5 抗原は配列番号：3 2 、配列番号：3 3 、配列番号：3 4 、配列番号：3 5 、配列番号：3 6 、配列番号：3 7 、配列番号：3 9 、配列番号：4 0 、配列番号：4 1 、配列番号：4 2 、配列番号：4 3 、配列番号：4 4 、配列番号：1 4 7 または配列番号：1 4 8 を含んでなる S N A P - 2 5 抗原に対する少なくとも 1 、少なくとも 2 、少なくとも 3 、少なくとも 4 または少なくとも 5 個のアミノ酸置換、欠失または付加を置換することができる。さらに別の実施態様では、S N A P - 2 5 抗原は配列番号：3 2 、配列番号：3 3 、配列番号：3 4 、配列番号：3 5 、配列番号：3 6 、配列番号：3 7 、配列番号：3 9 、配列番号：4 0 、配列番号：4 1 、配列番号：4 2 、配列番号：4 3 、配列番号：4 4 、配列番号：1 4 7 または配列番号：1 4 8 を含んでなる S N A P - 2 5 抗原に対して少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % のアミノ酸同一性を有し得る。

#### 【 0 0 3 0 】

担体を随伴しない場合に免疫原性、非免疫原性または弱い免疫原性である S N A P - 2 5 抗原の免疫原性を増強するために、1 つまたはそれより多い担体を S N A P - 2 5 抗原に連結できるということは想定される。非限定例には例えばキーホールリンペットヘモシアニン ( K L H ) 、卵白アルブミン ( O V A ) 、サイログロブリン ( T H Y ) 、ウシ血清アルブミン ( B S A ) 、ダイズトリプシン阻害剤 ( S T I ) または多重付着ペプチド ( M A P ) が含まれる。当分野において周知であるように、抗原を担体に結合することにより非抗原性または弱い抗原性の抗原を抗原性にすることができる。種々のその他の担体および抗原を担体に結合する方法は当分野において周知である。例えば Harlow and Lane, supra, 1998a ; Harlow and Lane, supra, 1998b ; および David W. Waggoner, Jr. ら、「免疫原性増強担体およびその組成物ならびに同一物を使用する方法」米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 0 5 7 9 5 8 号 ( 2 0 0 4 年 3 月 2 5 日 ) 参照。エピトープを融合タンパク質として発現することによりエピトープを作成することもできる。ポリペプチド融合体を発現するための方法は、例えば Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology ( Supplement 47 ), John Wiley & Sons, New York ( 1999 ) に記載されるように当業者に周知である。S N A P - 2 5 抗原のカルボキシル終端は B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でなければならないので、担体は S N A P - 2 5 抗原のアミノ端に連結されていなければならない。

#### 【 0 0 3 1 】

可動性リンカーを随伴しない場合に免疫原性、非免疫原性または弱い免疫原性である S N A P - 2 5 抗原の免疫原性を増強するために、1 つまたはそれより多い可動性スペーサーを S N A P - 2 5 抗原に連結できるということは想定される。可動性スペーサーは S N

10

20

30

40

50

A P - 2 5 抗原の全体的なペプチド長を増大し、そして可動性を提供し、それにより S N A P - 2 5 抗原の免疫細胞への適切な提示を促進する。非限定例としては、組成物は S N A P - 2 5 抗原を免疫細胞により良好に提示するために 1 つまたはそれより多い可動性スペーサーに直列に連結された S N A P - 2 5 抗原を含んでなることができ、それにより免疫応答を促進する。

#### 【 0 0 3 2 】

ペプチドを含んでなる可動性スペーサーは少なくとも 1 アミノ酸長であり、そして例えばグリシン、アラニン、バリン、ロイシンまたはセリンのような短い側鎖 R 基を伴う非荷電アミノ酸を含んでなる。故に実施態様では、可動性スペーサーは例えば少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9 または少なくとも 10 アミノ酸長でよい。別の実施態様では、可動性スペーサーは例えば少なくとも 1、多くても 2、多くても 3、多くても 4、多くても 5、多くても 6、多くても 7、多くても 8、多くても 9 または多くても 10 アミノ酸長でよい。さらに別の実施態様では、可動性スペーサーは例えば 1 - 3 アミノ酸の間、2 - 4 アミノ酸の間、3 - 5 アミノ酸の間、4 - 6 アミノ酸の間または 5 - 7 アミノ酸の間でよい。可動性スペーサーの非限定例には、例えば G G G、G G G G (配列番号 : 5 5 ) および G G G G S (配列番号 : 5 6 ) のような G スペーサーまたは A A A、A A A A (配列番号 : 5 7 ) および A A A A V (配列番号 : 5 8 ) のような A スペーサーが含まれる。可動性スペーサーは融合タンパク質として S N A P - 2 5 抗原にフレーム内で連結される。

10

20

30

40

#### 【 0 0 3 3 】

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

40

#### 【 0 0 3 4 】

本明細書に開示される組成物は場合によっては本明細書に開示される S N A P - 2 5 抗原および 1 つまたはそれより多いアジュバントを含んでなることができるということは想定される。本明細書で使用される際には「アジュバント」なる用語は、S N A P - 2 5 組成物を参照して使用される場合、S N A P - 2 5 抗原に対する免疫応答を増大または多様化する任意の物質または物質の混合物を指す。アジュバントは例えば免疫化の数または保護免疫に必要な抗原の量を低減するために役立つ。免疫応答誘起組成物におけるアジュバントの使用は周知である。これらのアジュバントの主な目的は免疫応答の増大を可能にすることである。非限定的なアジュバントには、例えばリポソーム、限定するものではないが、例えばフロイント完全アジュバント ( F C A ) ; フロイント不完全アジュバント ( F

50

I A ) のようなフロイント型のアジュバントを含む油相 ; 例えばサポニン類のようなサポゲニン配糖体 ; カルボポール ; N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン (ムラミルジペプチドまたは「MDP」として一般的に公知) ; およびリポ多糖類 (LPS) が含まれる。かかるアジュバントは一般には水相を伴うエマルジョンの形態で使用されるか、またはさらに一般的には水不溶性無機塩からなってよい。これらの無機塩は例えば水酸化アルミニウム、硫酸亜鉛、水酸化鉄コロイド、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムからなってよい。水酸化アルミニウム (Al(OH)<sub>3</sub>) は一般的に使用されるアジュバントである。現在では、ヒトにおいて使用するための唯一のFDA承認アジュバントはアルミニウム塩 (アラム) であり、それは抗原の沈澱により抗原を「貯留する」ために使用される。前記で提供されたアジュバントは単に実例である。実際にはアジュバントが免疫応答を誘起するために欠くことができない特徴を満足する限り、任意のアジュバントを本明細書に開示されるSNAP-25組成物において使用できる。

10

## 【0035】

本明細書に開示される担体はまたアジュバントとしても作用し得る。特異的アジュバントならびに作成および使用の方法が例えばGupta et al. Vaccine, 11: 993 - 306 (1993) ; Arnon, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1: 83 - 92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., (1987) ; および「免疫原性増強担体およびその組成物ならびに同一物を使用する方法」David W. Waggoner, Jr.ら、米国特許出願公開第2004/0057958号 (2004年3月25日) に記載される。さらなるアジュバントにはChapter 7 (pp 141 - 227) 「Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach」(eds. Powell, M. F. and Newman, M. J.) Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Plenum Press (New York) に記載される任意の化合物が含まれる。この概論からの実例には、ムラミルジペプチド (MDP) およびMontanide 720が含まれる。ポリイノシン : シトシン (ポリI : C) のような分子またはCpGモチーフを含有するプラスミドDNAをアジュバントとしてマイクロ粒子に被包された抗原と組み合わせて投与することもできる。別の実例では、アジュバントはリストリオリシン、ストレプトリシンまたはその混合物のような、抗原性化合物の細胞の細胞質への侵入を促進する薬剤である。

20

## 【0036】

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

30

## 【0037】

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

40

## 【0038】

なお別の実施態様では、SNAP-25組成物は1つまたはそれより多い可動性リンカーおよび担体ペプチドに連結されたカルボキシル化されたC末端グルタミンを有するSN

50

A P - 2 5 抗原を含んでなり、ここで可動性リンカーは S N A P - 2 5 抗原と担体ペプチドの間に介在する。この実施態様の態様では、カルボキシル化されたカルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 抗原は配列番号：3 2 、配列番号：3 3 、配列番号：3 4 、配列番号：3 5 、配列番号：3 6 、配列番号：3 7 、配列番号：1 4 7 または配列番号：1 4 8 を含んでなる。別の実施態様では、S N A P - 2 5 抗原は配列番号：4 6 を含んでなる。この実施態様の態様では担体ペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン（K L H）、卵白アルブミン（O V A）、サイログロブリン（T H Y）、ウシ血清アルブミン（B S A）、ダイズトリプシン阻害剤（S T I）または多重付着ペプチド（M A P）である。この実施態様の態様では、可動性リンカーはGスペーサーまたはAスペーサーである。

10

## 【0 0 3 9】

さらに別の実施態様では、S N A P - 2 5 組成物は可動性リンカーおよび担体ペプチドに連結されたカルボキシル化されたC末端リジンを有するS N A P - 2 5 抗原を含んでなり、ここで可動性リンカーはS N A P - 2 5 抗原と担体ペプチドの間に介在する。この実施態様の態様では、カルボキシル化されたカルボキシル末端リジンを有するS N A P - 2 5 抗原は配列番号：3 9 、配列番号：4 0 、配列番号：4 1 、配列番号：4 2 、配列番号：4 3 または配列番号：4 4 を含んでなる。この実施態様の別の態様ではS N A P - 2 5 抗原は配列番号：4 7 を含んでなる。この実施態様の態様では担体ペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン（K L H）、卵白アルブミン（O V A）、サイログロブリン（T H Y）、ウシ血清アルブミン（B S A）、ダイズトリプシン阻害剤（S T I）または多重付着ペプチド（M A P）である。この実施態様の態様では可動性リンカーはGスペーサーまたはAスペーサーである。

20

## 【0 0 4 0】

本開示の態様は一部ではS N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A 切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体を生成するための方法を含んでなる。S N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A 切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体を当分野において周知である多様な方法により生成することができる。抗体を作成および使用し、ならびに検出し、そして抗体結合特異性、結合アフィニティーおよび結合アビディティーを測定するための具体的なプロトコールは当分野において公知である。例えばANTIBODIES : A LABORATORY MANUAL (Edward Harlow & David Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> ed. 1998a) ; およびU SING ANTIBODIES : A LABORATORY MANUAL : PORABLE PROTOCOL No. I (Edward Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998b) ; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2001 ; およびCurrent Protocols in Molecular Biology, 2004 ; 「治療用ポリペプチド、同一物をコードする核酸および使用の方法」David Andersonら、米国特許第7 0 3 4 1 3 2 号（2 0 0 5 年4月2 5 日）；および「CTL A 4に対する抗体」Beatriz M. Carrenoら、米国特許第7 0 3 4 1 2 1 号（2 0 0 6 年4月2 5 日）参照。

30

## 【0 0 4 1】

非限定例としては、例えばウサギ、ヤギ、マウスまたは別の哺乳動物のような動物に本明細書において開示される組成物の1回またはそれより多い注射で注射することにより、S N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A 切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を生成することができる。別の非限定例としては、本明細書において開示される組成物の1回またはそれより多い注射で例えば鶏卵のような卵を注射することにより、S N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A 切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を生成することができる。固定された抗原を使用する酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）または細胞基盤の活性アッセイを用いるような標準的な技術により免疫された動物における抗体力値を経時的にモニタリングすることができる。所望によりS N A P - 2 5 切断生

40

50

成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体に関するポリクローナル抗体を哺乳動物（例えば血液から）単離し、そして I g G 分画を得るためにプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーのような周知の技術により、または抗体を生成するために使用されるペプチドに対するアフィニティー精製によりさらに精製することができる。

## 【 0 0 4 2 】

別の非限定例としては、ハイブリドーマ法を用いて S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を生成することができる。例えば Chapter 6 Monoclonal Antibodies, pp. 196 - 244, Harlow & Lane, supra, 1998a ; および Chapter 7 Growing Hybridomas, pp. 245 - 282, Harlow & Lane, supra, 1998a ; および Goding, pp. 59 - 103, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, Academic Press, (1986) 参照。この方法では、例えばマウス、ハムスターまたは別の適切な宿主動物のような宿主動物は、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 に特異的に結合するであろう - S N A P - 2 5 抗体を生成するかまたは生成することが可能であるリンパ球を引き出すために、典型的には本明細書に開示される S N A P - 2 5 抗原の 1 回またはそれより多い注射を経験する。固定された抗原または細胞基盤の活性アッセイを使用する酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) を用いるような標準的な技術により、免疫された動物における抗体力価を経時的にモニタリングすることができる。これに代えて、適当な細胞培養系を用いてリンパ球をインビトロで免疫することができる。免疫後の適切な時間に、例えば抗体力価が最高であるときに、抗体生成細胞を動物から単離する。一般には、ヒト起源の細胞が望ましい場合は抹消血リンパ球を、または非ヒト哺乳動物原が望ましい場合は脾臓細胞もしくはリンパ節細胞を使用する。ポリエチレンギリコールのような適当な融合剤を使用して単離された抗体生成細胞を不死細胞株と融合してハイブリドーマ細胞を形成する。不死化細胞株は通常形質転換された哺乳動物細胞、とりわけげっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髄腫細胞である。典型的にはネズミ骨髄腫細胞株を適切に免疫されたマウスから採取された脾細胞と融合してハイブリドーマを生成する。好ましい不死細胞株はヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジン ( H A T ) を含有する培養培地に鋭敏であるマウス骨髄腫細胞株である。多くの骨髄腫細胞株、例えば P 3 - N S 1 / 1 - A g 4 - 1 、 P 3 - x 6 3 - A g 8 . 6 5 3 または S p 2 / O - A g 1 4 骨髄腫系のいずれかを標準的な技術により融合パートナーとして使用することができる。次いで未融合のまたは非生産的に融合された骨髄腫細胞を死滅させる（未融合脾細胞は形質転換されていないので、数日後に死亡する） H A T 培地を使用して融合の結果であるハイブリドーマ細胞を選択する。次いでハイブリドーマ細胞が成長する培養培地を S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の存在に関して検定することができる。例えば免疫沈降アッセイ、ラジオイムノアッセイ ( R I A ) または酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) のようなインビオ結合アッセイにおいて、または細胞基盤の活性アッセイにおいて - S N A P - 2 5 陽性培地を使用してハイブリドーマ上澄を、スクリーニングすることができる。かかる技術およびアッセイは当分野において公知である。例えば Chapter 11 Immunoprecipitation, pp. 421 - 470, Harlow & Lane, supra, 1998a ; Chapter 12 Immunoblotting, pp. 471 - 510, Harlow & Lane, supra, 1998a ; Chapter 14 Immunoassays, pp. 553 - 612, Harlow & Lane, supra, 1998a 参照。次いでさらなる研究を行って、抗体はまた B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を欠如する S N A P - 2 5 に対して非反応性であるかどうかを決定することができる。 - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の結合アフィニティーを例えば Scatchard 分析により決定することもできる。例えば「リガンド：リガンド結合系の特徴付けのための多目的コンピューター研究法」 Peter J. Munson and David Rodbard, Anal. Biochem. 107 (1) : 220 - 239 (1980) 参照。望ましいハイブリドーマ細胞を同定した後、限界希釈手順を用いて望ましいモノクローナル抗体

10

20

30

40

50

を発現するクローンの細胞株が得られるまで、単一細胞に由来するクローンを単離する。BoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25に関して十分に選択的であり、そして十分に高いアビディティーで結合するこれらの抗体を選び、さらに特徴付けおよび研究する。

#### 【0043】

SNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する -SNAP-25モノクローナル抗体を調製するための別の代替は、例えば抗体ファージディスプレイライブラリーのような組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーをSNAP-25ペプチドでスクリーニングすることにより、そしてBoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25に結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離する。ファージディスプレイライブラリーを作成およびスクリーニングするためのキットは例えば組換えファージ抗体系(Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ)；およびSurfZAP(商標)ファージディスプレイキット(Stratagene, La Jolla, CA)のように市販により入手可能である。加えて、抗体ディスプレイライブラリーの作成およびスクリーニングに有用な方法および試薬の実例を例えばLadnerら、米国特許第5223409号；Borrebaeckら、米国特許第5712089号；Griffithsら、米国特許第5885793号；Griffithsら、米国特許第5962255号；McCaffertyら、米国特許第5969108号；Griffithsら、米国特許第6010884号；Jespersら、米国特許第6017732号；Borrebaeckら、米国特許第6027930号；Johnsonら、米国特許第6140471号；McCaffertyら、米国特許第6172197号(その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする)において見出すことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0044】

本開示の態様は一部では -SNAP-25抗体または -SNAP-25抗体生成細胞を含有する試料を収集することを含んでなる。本明細書で使用される際には「 -SNAP-25抗体または -SNAP-25抗体生成細胞を含有する試料」なる用語はSNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する少なくとも1つの -SNAP-25抗体を含有するか、または潜在的に含有する任意の生物学的物質を指す。SNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する -SNAP-25抗体を含有できる、限定するものではないが、血液、血漿、血清およびリンパ液を含む任意のおよび全ての試料を、この方法において使用することができるということは想定される。SNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する -SNAP-25抗体を生成することが可能な、限定するものではないが、CD8細胞、CTL細胞、ヘルパーT細胞およびB細胞を含む任意の細胞を、この方法において使用することができるということも想定される。種々の周知の方法を用いて

-SNAP-25抗体または -SNAP-25抗体生成細胞を含有する試料を個体から収集することができ、例えばHarlow & Lane, supra, 1998a；およびHarlow & Lane, supra, 1998bを参照されたい。類似して、種々の周知の方法を用いて、SNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する -SNAP-25抗体を単離するために試料を加工することができる。単離されるべき抗体の型に基づいて試料を収集するための手順を選択することができる。非限定例としては、SNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する -SNAP-25ポリクローナル抗体を単離する場合、適切な試料はかかる -SNAP-25抗体を含有する血液試料でよいが、SNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する -SNAP-25モノクローナル抗体を単離する場合、適切な試料は脾臓細胞またはハイブリドーマのような -SNAP-25抗体生成細胞でよい。

## 【0045】

本開示の態様は一部では S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体を試料から単離することを含んでなる。例えば S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体または S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体のようなかかる - S N A P - 2 5 抗体を単離する方法は当業者に周知である。例えば Harlow and Lane, supra, 1998a; および Harlow and Lane, supra, 1998b 参照。例えばかかる - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を例えれば一次的には免疫血清の IgG 分画を提供する、プロテイン A またはプロテイン G を使用するアフィニティークロマトグラフィーのような周知の技術により試料から単離することができる。引き続いて、またはこれに代えて、特異的な S N A P - 2 5 抗原をカラムまたは磁性ビーズに固定して S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を免疫アフィニティーコロマトグラフィーにより精製することができる。S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を培養培地または腹水から、例えばプロテイン A - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティーコロマトグラフィーのような従来の免疫グロブリン精製手順により単離することができる。  
10  
20

## 【0046】

故に実施態様では、S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体を生成する方法は工程 (a) 担体ペプチドに連結されたカルボキシル化された C 末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 抗原を含んでなる組成物を動物に投与すること；(b) - S N A P - 2 5 抗体または - S N A P - 2 5 抗体生成細胞を含有する試料を動物から収集すること；および (c) 試料から - S N A P - 2 5 抗体構成要素を単離すること；を含んでなる。この実施態様の態様では、S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体はポリクローナル抗体である。この実施態様の別の態様では、S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体はモノクローナル抗体である。この実施態様のさらなる態様では、生成される S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体は IgG サブタイプである。この実施態様のその他の態様では、S N A P - 2 5 組成物はさらに例えばポリエチレングリコール (PEG)、モノメトキシポリエチレングリコール (mPEG) またはポリビニルアルコール (PVA) のようなアジュバントを含んでなる。  
30  
40

## 【0047】

別の実施態様では、S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体を生成する方法は工程 (a) 可動性リンカーおよび担体ペプチドに連結されたカルボキシル化された C 末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 ペプチドを含んでなる組成物を動物に投与すること、ここで可動性リンカーは S N A P - 2 5 ペプチドと担体ペプチドの間に介在する；(b) - S N A P - 2 5 抗体または - S N A P - 2 5 抗体生成細胞を含有する試料を動物から収集すること；ならびに (c) 試料から - S N A P - 2 5 抗体を単離すること；を含んでなる。この実施態様の態様では、S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んで  
50

なるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体はポリクローナル抗体である。この実施態様の別の態様では、S N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A 切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 抗体はモノクローナル抗体である。この実施態様のさらなる態様では、生成されるS N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A 切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体はI g G サブタイプである。この実施態様のその他の態様では、S N A P - 2 5 組成物はさらに例えばポリエチレングリコール ( P E G ) 、モノメトキシポリエチレングリコール ( m P E G ) またはポリビニルアルコール ( P V A ) のようなアジュバントを含んでなる。

10

## 【 0 0 4 8 】

本開示の態様は一部ではB o N T / A 切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する単離された - S N A P - 2 5 抗体を含んでなる。本明細書で使用される際には「単離された」なる用語はヒトの介入を用いることによりその天然の環境から分子を分離することを指す。本明細書で使用される際には「抗体」なる用語は特定の抗原に応答して作られた免疫系により作成された、その抗原に特異的に結合する分子を指し、そして天然発生抗体および非天然発生抗体の双方を含む。本明細書で使用される際には「 - S N A P - 2 5 」なる用語は「抗S N A P - 2 5」と同義であり、そしてS N A P - 2 5 抗原に結合する抗体を指す。例えば抗体は、フラグメントが望ましい生物学的活性を呈する限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ダイマー、マルチマー、多特異的抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、二機能性抗体、I g 受容体様の細胞結合抗体、線状抗体、ダイアボディーまたはミニボディー、および同一物の一本鎖誘導体でよい。抗体はV<sub>H</sub> およびV<sub>L</sub> ドメイン、ならびに軽鎖定常ドメイン ( C<sub>L</sub> ) および重鎖定常ドメイン、C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub> およびC<sub>H3</sub>、または例えばF a b フラグメント、F ( a b' )<sub>2</sub> フラグメント、F c フラグメント、F d フラグメント、F v フラグメントのような、全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメントを含んでなる全長免疫グロブリン分子でよい。抗体を任意の脊椎動物種 ( 例えばヒト、ヤギ、ウマ、ロバ、ネズミ、ラット、ウサギまたはニワトリ ) から誘導することができ、そして任意の型 ( 例えばI g G、I g E、I g M、I g D およびI g A ) 、クラス ( 例えばI g A、I g D、I g E、I g G およびI g M ) またはサブクラス ( I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 およびI g A 2 ) のものでよい。天然発生抗体、非天然発生抗体およびその抗原性化合物 - 結合フラグメントの構造に関する一般的の開示に関しては、例えばPluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer - Verlag, New York, pp. 269 - 315 ( 1994 ) ; Borrebeck, Antibody Engineering, 2d ed. ( Oxford University Press 1995 ) ( その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする ) を参照されたい。

20

30

30

## 【 0 0 4 9 】

天然発生抗体は通常約 1 5 0 , 0 0 0 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、2つの同一の軽 ( L ) 鎖および2つの同一の重 ( H ) 鎖から構成される。各軽鎖は1つの共有結合性ジスルフィド結合により重鎖に連結されるが、ジスルフィド連結の数は様々な免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で異なる。各重および軽鎖はまた規則的に間隔をあけて配置された鎖内ジスルフィド橋を有する。各重鎖は一方の端で可変ドメイン ( V<sub>H</sub> ) 、続いて多数の定常ドメインを有する。各軽鎖は一方の端で可変ドメイン ( V<sub>L</sub> ) およびそのもう一方の端で定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメインと並び、そして軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並ぶ。特定のアミノ酸残基が軽鎖と重鎖可変ドメインとの間のインターフェースを形成すると考えられる。

40

## 【 0 0 5 0 】

完全な抗原認識および抗原結合部位は抗体の可変ドメイン、すなわちF v フラグメント内に含有される。このフラグメントは堅固な非共有結合性会合の1つの重鎖可変ドメイン ( V<sub>H</sub> ) および1つの軽鎖可変ドメイン ( V<sub>L</sub> ) のダイマーを含む。各ドメインは4つの

50

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

10

## 【 0 0 5 1 】

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

20

## 【 0 0 5 2 】

ポリクローナル抗体とは特定の抗原に結合することが可能な少なくとも 2 種の抗体を含有する抗体分子の異種性集団を指す。定義によれば、ポリクローナル抗体は少なくとも 2 つの異なるエピトープに結合する 2 つの異なる抗体を含む。本明細書で使用される際には「( 複数の ) モノクローナル抗体」なる用語は特定の抗原に結合することが可能な 1 種のみの抗体含有する、抗体分子の実質的に同種性の集団を指し、すなわち集団を含んでなる個々の抗体は微量で存在し得る可能な天然発生変異体を除いて同一である。定義によれば、モノクローナル抗体は単一のエピトープに結合する。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対して指向する。さらにポリクローナル抗体とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して指向する。その特異性に加えて、モノクローナル抗体はその他の抗体と夾雜しないで合成され得るという点で有利である。「モノクローナル」なる修飾語句は、実質的に同種の抗体の集団から得られているような抗体の特徴を示し、そして任意の特定の方法による抗体の生成を必要とするとは解釈されるべきではない。例えば本開示に従って使用するためのモノクローナル抗体を、最初に Kohler et al., Nature 256 : 495 ( 1975 ) により記載されたハイブリドーマ法により作成できるか、または組換え DNA 法により作成できる( 例えは : 米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号 ; 米国特許第 5 8 0 7 7 1 5 号参照 )。例えは Clackson et al., Nature, 352 : 624 - 6 28 ( 1991 ) ; Marks et al., J. Mol. Biol. 222 : 581 - 597 ( 1991 ) に記載される技術を用いてモノクローナル抗体をファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

30

## 【 0 0 5 3 】

故に実施態様では、 - S N A P - 2 5 抗体は B o N T / A 切断部位切断可能結合の  $P_1$  残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する重鎖可変ドメイン(  $V_H$  ) および軽鎖可変ドメイン(  $V_L$  ) を含んでなる。この実施態様の態様では、重鎖可変ドメイン(  $V_H$  ) は配列番号 : 7 2 、配列番号 : 7 4 、配列番号 : 7 6 、配列番号 : 8 0 または配列番号 : 8 2 である。この実施態様の別の態様では、軽鎖可変ドメイン(  $V_L$  ) は配列番号 : 8 4 、配列番号 : 8 6 、配列番号 : 8 8 、配列番号 : 9 0 または配列番号 : 9 2 である。

40

## 【 0 0 5 4 】

別の実施態様では、 - S N A P - 2 5 抗体は B o N T / A 切断部位切断可能結合の  $P_1$  残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 に選択的に結合する重鎖可変ドメイン(  $V_H$  ) C D R 1 領域、 C D R 2 領域、 C D R 3 領域または任意のその組み合わせを含ん

50

でなる。この実施態様の態様では、重鎖可変ドメイン ( $V_H$ ) CDR1領域は配列番号：93、配列番号：94、配列番号：95、配列番号：118、配列番号：119または配列番号：120である。この実施態様の別の態様では、重鎖可変ドメイン ( $V_H$ ) CDR2領域は配列番号：96、配列番号：97、配列番号：98、配列番号：99、配列番号：121、配列番号：122または配列番号：123である。この実施態様のなお別の態様では、重鎖可変ドメイン ( $V_H$ ) CDR3領域は配列番号：100、配列番号：101、配列番号：102または配列番号：124である。

#### 【0055】

別の実施態様では -SNAP-25抗体は、BoNT/A切断部位切斷可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25に選択的に結合する軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) CDR1領域、CDR2領域、CDR3領域、またはその任意の組み合わせを含んでなる。この実施態様の態様では、軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) CDR1領域は配列番号：103、配列番号：104、配列番号：105、配列番号：106、配列番号：107、配列番号：125、配列番号：126、配列番号：127、配列番号：128または配列番号：129である。この実施態様の別の態様では、軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) CDR2領域は配列番号：108、配列番号：109、配列番号：110、配列番号：111または配列番号：112である。この実施態様のなお別の態様では、軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) CDR3領域は配列番号：113、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116または配列番号：117である。

10

#### 【0056】

なお別の実施態様では、-SNAP-25抗体はBoNT/A切断部位切斷可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25を含んでなるエピトープに特異的に結合する。この実施態様の態様では、エピトープは配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：147または配列番号：148を含んでなる。この実施態様の態様では、エピトープは配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43または配列番号：44を含んでなる。

20

#### 【0057】

前記で開示されるように、SNAP-25に存在するBoNT/A切断部位を取り囲む配列はP<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>-P<sub>1'</sub>-P<sub>2'</sub>-P<sub>3'</sub>-P<sub>4'</sub>-P<sub>5'</sub>と示され、P<sub>1</sub>-P<sub>1'</sub>は切斷可能結合を表す。BoNT/Aによる切斷時に、結果的に生成された切斷生成物はP<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>配列を含むフラグメントおよびP<sub>1'</sub>-P<sub>2'</sub>-P<sub>3'</sub>-P<sub>4'</sub>-P<sub>5'</sub>を含むフラグメントを含んでなる。本明細書で使用される際には「SNAP-25切斷生成物からのBoNT/A切断部位切斷可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する-SNAP-25抗体」なる用語はP<sub>5</sub>-P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>配列を含んでなる任意のSNAP-25切斷生成物フラグメントに選択的に結合するが、P<sub>1'</sub>-P<sub>2'</sub>-P<sub>3'</sub>-P<sub>4'</sub>-P<sub>5'</sub>配列を含んでなる任意のSNAP-25切斷生成物フラグメントまたはBoNT/A切断部位のインタクトなP<sub>1</sub>-P<sub>1'</sub>切斷可能結合を有する任意のSNAP-25には結合しない-SNAP-25抗体を指す。本明細書で使用される際には「-SNAP-25<sub>197</sub>抗体」なる用語は配列番号：5のグルタミン197に相当するカルボキシル末端P<sub>1</sub>残基を有するSNAP-25に選択的に結合する抗体を指す。本明細書で使用される際には「-SNAP-25<sub>204</sub>抗体」なる用語は配列番号：16のリジン204に相当するカルボキシル末端P<sub>1</sub>残基を有するSNAP-25に選択的に結合する抗体を指す。

30

#### 【0058】

本明細書で使用される際には「選択的」なる用語は唯一の方でまたは唯一のものとの独特な効果または影響または反応を有することを指す。本明細書で使用される際には「選択的に結合する」なる用語は、抗体を参照する場合、抗体が非標的エピトープと実質的に交差反応しないような、指示された標的エピトープへの抗体の識別力のある結合を指す。本明細書で定義されるような最小サイズのペプチドエピトープは約5個のアミノ酸であり

40

50

、そしてペプチドエピトープは典型的には少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 15 または少なくとも 20 個のアミノ酸を含んでなる。ペプチドエピトープは非連續的でよく、すなわちそれはペプチドの一次構造において隣接しないが、ペプチドの二次、三次または四次構造により一緒にエピトープになるアミノ酸残基を含んでなる。さらにエピトープは例えば炭水化物部分、リボタンパク質もしくは糖脂質様の脂質部分、またはリン酸化されたアミノ酸様の化学的に修飾されたアミノ酸部分のようなアミノ酸配列以外の分子の一部を含んでなり得ることも留意される。この実施態様の態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 15 または少なくとも 20 個のアミノ酸を含んでなる、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合することができる。この実施態様のその他の態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体は、多くても 5、多くても 6、多くても 7、多くても 8、多くても 9、多くても 10、多くても 15 または多くても 20 個のアミノ酸を含んでなる、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合することができる。

## 【0059】

選択的結合には例えば結合アフィニティー、結合特異性および結合アビディティーのような結合特性が含まれる。David J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, pp. 240 (1998) 参照。結合アフィニティーとは、抗体がそのエピトープ結合部位に留まる時間の長さを指し、そして抗体がそのエピトープに結合する強さと見なすことができる。結合アフィニティーを抗体の平衡解離定数 (K D) と記載することができ、それは平衡時の K d / K a 比として定義される。ここで K a は抗体の会合速度定数であり、そして k d は抗体の解離速度定数である。結合アフィニティーは会合および解離双方により決定され、そして高い会合でも低い解離でも単独では高アフィニティーを確実にすることはできない。会合速度定数 (K a) または結合速度定数 (on-rate constant) (K on) は単位時間あたりの結合事象の数、または抗体および抗原がその抗体 - 抗原複合体に可逆的に会合する傾向を測定する。会合速度定数は M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> で表現され、そして以下のとおりに記号で表される：[A b] × [A g] × K on。会合速度定数が大きいほど、抗体はその抗原により迅速に結合するか、または抗体と抗原との間の結合アフィニティーがより高くなる。解離速度定数 (K d) または分離速度定数 (off-rate constant) (K off) は単位時間あたりの解離事象の数、抗体 - 抗原複合体がその構成分子、すなわち抗体および抗原に可逆的に分離（解離）する傾向を測定する。解離速度定数は s<sup>-1</sup> で表現され、そして以下のとおりに記号で表される：[A b + A g] × K off。解離速度定数が小さいほど、抗体はその抗原により強固に結合するか、または抗体と抗原との間の結合アフィニティーがより高くなる。平衡解離定数 (K D) は、形成された新しい抗体 - 抗原複合体が、抗体 - 抗原複合体が平衡して解離する速度に等しいその速度を測定する。平衡解離定数は M で表現され、そして K off / K on = [A b] × [A g] / [A b + A g] (式中、[A b] は抗体のモル濃度であり、[A g] は抗原のモル濃度であり、そして [A b + A g] は抗体 - 抗原複合体のモル濃度であり、ここで全ての濃度は、系が平衡にある場合のかかる構成要素のものである。平衡解離定数が小さいほど、抗体はその抗原により強固に結合するか、または抗体と抗原との間の結合アフィニティーがより高くなる。

## 【0060】

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

10

20

30

40

50

。別の実施態様では、BoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25抗体の結合アフィニティーは例えば $1 \times 10^{-5} M^{-1}s^{-1}$ を超える、 $1 \times 10^{-6} M^{-1}s^{-1}$ を超える、 $1 \times 10^{-7} M^{-1}s^{-1}$ を超える、または $1 \times 10^{-8} M^{-1}s^{-1}$ を超える会合速度定数を有し得る。別の態様では、BoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25抗体の結合アフィニティーは $1 \times 10^{-5} M^{-1}s^{-1}$ から $1 \times 10^{-8} M^{-1}s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-6} M^{-1}s^{-1}$ から $1 \times 10^{-8} M^{-1}s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-5} M^{-1}s^{-1}$ から $1 \times 10^{-7} M^{-1}s^{-1}$ 、または $1 \times 10^{-6} M^{-1}s^{-1}$ から $1 \times 10^{-7} M^{-1}s^{-1}$ の間の会合速度定数を有し得る。

10

## 【0061】

別の実施態様では、BoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25抗体の結合アフィニティーは $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満または $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ 未満の解離速度定数を有し得る。この実施態様のその他の態様では、BoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25抗体の結合アフィニティーは例えば $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $2.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $3.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $4.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $6.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $7.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $8.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満または $9.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満の解離速度定数を有し得る。別の実施態様では、BoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25抗体の結合アフィニティーは例えば $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ を超える、 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超えるまたは $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ を超える解離速度定数を有し得る。この実施態様のその他の態様では、BoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25抗体の結合アフィニティーは例えば $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超える、 $2.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超える、 $3.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超える、 $4.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超える、 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超える、 $6.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超える、 $7.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超える、 $8.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超える、または $9.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ を超える解離速度定数を有し得る。

20

## 【0062】

別の実施態様では、BoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25抗体の結合アフィニティーは $0.500 nM$ 未満の平衡解離定数を有し得る。この実施態様の態様では、BoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25抗体の結合アフィニティーは例えば $0.500 nM$ 未満、 $0.450 nM$ 未満、 $0.400 nM$ 未満、 $0.350 nM$ 未満、 $0.300 nM$ 未満、 $0.250 nM$ 未満、 $0.200 nM$ 未満、 $0.150 nM$ 未満、 $0.100 nM$ 未満または $0.050 nM$ 未満の平衡解離定数を有し得る。別の実施態様では、BoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25抗体の結合アフィニティーは $0.500 nM$ を超える平衡解離定数を有し得る。この実施態様の態様では、BoNT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する-SNAP-25抗体の結合アフィニティーは例えば $0.500 nM$ を超える、 $0.450 nM$ を超える、 $0.400 nM$ を超える、 $0.350 nM$ を超える、 $0.300 nM$ を超える、 $0.250 nM$ を超える、 $0.200 nM$ を超える、 $0.150 nM$ を超える、 $0.100 nM$ を超える、または $0.050 nM$ を超える平衡解離定数を有し得る。

40

## 【0063】

50

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

10

#### 【0064】

結合特異性はそのエピトープを含有する分子と、そのエピトープを含有しない分子との間で識別する抗体の能力である。結合特異性を測定する1つの方式は、そのエピトープを含有しない分子に関する抗体のK<sub>on</sub>会合速度に相対して、そのエピトープを含有する分子に関する抗体のK<sub>on</sub>会合速度を比較することである。例えばB<sub>o</sub>N<sub>T</sub>/A切断部位切斷可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5エピトープに関する - S N A P - 2 5抗体の会合速度定数(K<sub>a</sub>)を、例えはB<sub>o</sub>N<sub>T</sub>/A切断部位切斷可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を欠如するS N A P - 2 5エピトープまたはB<sub>o</sub>N<sub>T</sub>/A切断部位のインタクトな-P<sub>1</sub>'切斷可能結合を有するS N A P - 2 5エピトープのような、そのエピトープを含まないS N A P - 2 5に相対して比較することである。この実施態様の態様では、B<sub>o</sub>N<sub>T</sub>/A切断部位切斷可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5抗体は、その(複数の)エピトープを含まないS N A P - 2 5に関して例えれば $1 \times 10^0 M^{-1} s^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^1 M^{-1} s^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^2 M^{-1} s^{-1}$ 未満、 $1 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$ 未満、または $1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 未満の、会合速度定数(K<sub>a</sub>)を有する。この実施態様のその他の態様では、B<sub>o</sub>N<sub>T</sub>/A切断部位切斷可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5抗体は、その(複数の)エピトープを含まないS N A P - 2 5に関して例えば多くても $1 \times 10^0 M^{-1} s^{-1}$ 、多くても $1 \times 10^1 M^{-1} s^{-1}$ 、多くても $1 \times 10^2 M^{-1} s^{-1}$ 、多くても $1 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$ または多くても $1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ の、会合速度定数(K<sub>a</sub>)を有する。

20

#### 【0065】

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

40

50

は、そのエピトープを含まないSNAP-25に相対して、そのエピトープに関して例えれば多くても10倍多い、多くても100倍多い、多くても1,000倍多い、または多くても10,000倍多い会合速度定数(Ka)を有する。

#### 【0066】

B<sub>o</sub>NT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する -SNAP-25抗体の結合特異性を、例えはB<sub>o</sub>NT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を欠如するSNAP-25エピトープまたはB<sub>o</sub>NT/A切断部位のインタクトなP<sub>1</sub>-P<sub>1'</sub>切断可能結合を有するSNAP-25エピトープのような、そのエピトープを含まないSNAP-25に相対して、かかる -SNAP-25抗体がそのSNAP-25エピトープを識別することができる比として特徴付けすることもできる。この実施態様の態様では、B<sub>o</sub>NT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する -SNAP-25抗体は、そのエピトープを含まないSNAP-25に相対して、そのSNAP-25エピトープに関して例えは少なくとも2:1、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1、少なくとも6:1、少なくとも7:1、少なくとも8:1、少なくとも9:1、少なくとも10:1、少なくとも15:1、少なくとも20:1、少なくとも25:1、少なくとも30:1、少なくとも35:1または少なくとも40:1の結合特異性比を有する。この実施態様のなおその他の態様では、B<sub>o</sub>NT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する -SNAP-25抗体は、B<sub>o</sub>NT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を欠如するSNAP-25に相対して、そのSNAP-25エピトープに関して例えは少なくとも2:1、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1、少なくとも6:1、少なくとも7:1、少なくとも8:1、少なくとも9:1、少なくとも10:1、少なくとも15:1、少なくとも20:1、少なくとも25:1、少なくとも30:1、少なくとも35:1または少なくとも40:1の結合特異性比を有する。この実施態様のさらにその他の態様では、B<sub>o</sub>NT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する -SNAP-25抗体は、B<sub>o</sub>NT/A切断部位のインタクトなP<sub>1</sub>-P<sub>1'</sub>切断可能結合を有するSNAP-25に相対して、そのSNAP-25エピトープに関して例えは少なくとも2:1、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1、少なくとも6:1、少なくとも7:1、少なくとも8:1、少なくとも9:1、少なくとも10:1、少なくとも15:1、少なくとも20:1、少なくとも25:1、少なくとも30:1、少なくとも35:1または少なくとも40:1の結合特異性比を有する。

#### 【0067】

結合アビディティーは機能的アフィニティーとしても公知であり、多価抗体とその抗原との間の機能的結合力の合計を指す。抗体分子は1を超える結合部位を有し得て(例えはIgGに関して2個、IgMに関して10個)、そして多くの抗原は1を超える抗原性部位を含有する。抗体の結合アビディティーは個々の抗体結合部位の結合アフィニティーに依存するが、全ての抗体-抗原相互作用は抗体が完全に解離するために同時に破壊されなければならないので、結合アビディティーは結合アフィニティーよりも大きい。B<sub>o</sub>NT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する -SNAP-25抗体はその抗体に関する任意のおよび全てのエピトープに選択的に結合することができることとは想定される。

#### 【0068】

故に実施態様では、 -SNAP-25抗体はB<sub>o</sub>NT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する -SNAP-25抗体である。この実施態様の態様では、 -SNAP-25抗体は、カルボキシル末端グルタミンを有するSNAP-25エピトープに選択的に結合する -SNAP-25抗体、またはカルボキシル末端リジンを有するSNAP-25エピトープに選択

10

20

30

40

50

的に結合する - S N A P - 2 5 抗体である。この実施態様のその他の態様では - S N A P - 2 5 抗体は、配列番号：5 のグルタミン 1 9 7 に相当するカルボキシル末端 P<sub>1</sub> 残基を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体、または配列番号：1 6 のリジン 2 0 4 に相当するカルボキシル末端 P<sub>1</sub> 残基を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体である。この実施態様のさらにその他の態様では、 - S N A P - 2 5 抗体は、配列番号：3 2 、配列番号：3 3 、配列番号：3 4 、配列番号：3 5 、配列番号：3 6 、配列番号：3 7 、配列番号：3 9 、配列番号：4 0 、配列番号：4 1 、配列番号：4 2 、配列番号：4 3 または配列番号：4 4 、配列番号：1 4 7 または配列番号：1 4 8 のカルボキシル末端アミノ酸配列を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体である。

10

## 【0069】

本開示の態様は一部では B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法を含んでなる。本明細書に開示される免疫基盤の方法を、例えば真度、精度、検出限界（L O D）、定量限界（L O Q）、範囲、特異性、選択性、直線性、耐久性および系の適合性を含むいくつかのパラメーターにより評価することができる。方法の真度は分析方法の正確さ、または測定された値と従来の真の値として認められた値もしくは認められた参考値との間の一一致の近似性の測定である。方法の精度は均一な試料の複数回のサンプリングに手順を繰り返し適用した場合の、個々の試験結果の間の一一致の程度である。そのように、精度は 1 ) アッセイ内変動性； 2 ) 日内変動性（併行精度）；および 3 ) 日間変動性（室内再現精度）；および 4 ) 研究室間変動性（室間再現精度）；を評価する。変動係数（C V %）は観察されたまたは理論的平均値に相対して表現される精度の定量的測定値である。

20

## 【0070】

本明細書に開示される免疫基盤の方法は、バックグラウンドを超えて B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 を含んでなる - S N A P - 2 5 抗体 - 抗原複合体の存在を検出できなければならない。方法の検出限界（L O D）とは陰性対照またはブランクとは有意に異なるシグナルを上昇させる分析物の濃度を指し、バックグラウンドから区別することができる分析物の最低濃度を表す。

20

## 【0071】

故に実施態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は、陰性対照またはブランクとは有意に異なる量で B o N T / A の L O D を検出することができる。この実施態様の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば 1 0 n g 以下、9 n g 以下、8 n g 以下、7 n g 以下、6 n g 以下、5 n g 以下、4 n g 以下、3 n g 以下、2 n g 以下、1 n g 以下の B o N T / A の L O D を有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば 9 0 0 p g 以下、8 0 0 p g 以下、7 0 0 p g 以下、6 0 0 p g 以下、5 0 0 p g 以下、4 0 0 p g 以下、3 0 0 p g 以下、2 0 0 p g 以下、1 0 0 p g 以下の B o N T / A の L O D を有する。この実施態様のさらなる態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば 9 0 p g 以下、8 0 p g 以下、7 0 p g 以下、6 0 p g 以下、5 0 p g 以下、4 0 p g 以下、3 0 p g 以下、2 0 p g 以下、1 0 p g 以下の B o N T / A の L O D を有する。この実施態様のその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば 9 p g 以下、8 p g 以下、7 p g 以下、6 p g 以下、5 p g 以下、4 p g 以下、3 p g 以下、2 p g 以下、1 p g 以下の B o N T / A の L O D を有する。この実施態様のなおその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば 0 . 9 p g 以下、0 . 8 p g 以下、0 . 7 p g 以下、0 . 6 p g 以下、0 . 5 p g 以下、0 . 4 p g 以下、0 . 3 p g 以下、0 . 2 p g 以下、0 . 1 p g 以下の B o N T / A の L O D を有する。

30

## 【0072】

この実施態様の別の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば 1 0 n M 以下、9 n M 以下、8 n M 以下、7 n M 以下、6 n M 以下、5 n M 以下、4 n M 以下、3 n M 以下、2 n M 以下または 1 n M 以下の B o N T / A の L O D を有する。この実施態様のその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば 9 0 0 p M 以下、8

40

50

0.0 pM以下、7.00 pM以下、6.00 pM以下、5.00 pM以下、4.00 pM以下、3.00 pM以下、2.00 pM以下または1.00 pM以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば1.00 pM以下、9.0 pM以下、8.0 pM以下、7.0 pM以下、6.0 pM以下、5.0 pM以下、4.0 pM以下、3.0 pM以下、2.0 pM以下または1.0 pM以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のなおその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は1.0 pM以下のBoNT/A、9 pM以下、8 pM以下、7 pM以下、6 pM以下、5 pM以下、4 pM以下、3 pM以下、2 pM以下または1 pM以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば1,000 fM以下、900 fM以下、800 fM以下、700 fM以下、600 fM以下、500 fM以下、400 fM以下、300 fM以下、200 fM以下または100 fM以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば1.00 fM以下、9.0 fM以下、8.0 fM以下、7.0 fM以下、6.0 fM以下、5.0 fM以下、4.0 fM以下、3.0 fM以下、2.0 fM以下または1.0 fM以下のBoNT/AのLODを有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば1.0 fM以下、9 fM以下、8 fM以下、7 fM以下、6 fM以下、5 fM以下、4 fM以下、3 fM以下、2 fM以下または1 fM以下のボツリヌス神経毒AのLODを有する。

10

## 【0073】

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

20

## 【0074】

故に実施態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は陰性対照またはブランクとは有意に異なる量でBoNT/AのLOQを検出することができる。この実施態様の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば1.0 ng以下、9 ng以下、8 ng以下、7 ng以下、6 ng以下、5 ng以下、4 ng以下、3 ng以下、2 ng以下、1 ng以下のBoNT/AのLOQを有する。この実施態様のさらにその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば9.00 pg以下、8.00 pg以下、7.00 pg以下、6.00 pg以下、5.00 pg以下、4.00 pg以下、3.00 pg以下、2.00 pg以下、1.00 pg以下のBoNT/AのLOQを有する。この実施態様のさらなる態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば9.0 pg以下、8.0 pg以下、7.0 pg以下、6.0 pg以下、5.0 pg以下、4.0 pg以下、3.0 pg以下、2.0 pg以下、1.0 pg以下のBoNT/AのLOQを有する。この実施態様のその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば9 pg以下、8 pg以下、7 pg以下、6 pg以下、5 pg以下、4 pg以下、3 pg以下、2 pg以下、1 pg以下のBoNT/AのLOQを有する。この実施態様のなおその他の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば0.9 pg以下、0.8 pg以下、0.7 pg以下、0.6 pg以下、0.5 pg以下、0.4 pg以下、0.3 pg以下、0.2 pg以下、0.1 pg以下のBoNT/AのLOQを有する。

30

## 【0075】

この実施態様の別の態様では、本明細書に開示される免疫基盤の方法は例えば1.0 nM

40

50

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

#### 【0076】

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

#### 【0077】

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

#### 【0078】

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

10

20

30

40

50

なくとも 600 : 1 のシグナル対ノイズ比を有する。

【0079】

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

10

【0080】

方法の耐久性は、正常な（しかし変動する）試験条件下で同一の試料に関して得られた試験結果の室間再現精度である。手順の頑健性は、方法パラメーターにおける小さいが、慎重な変動により影響を受けずにあるその受容力の測定値であり、そして正常な利用におけるその信頼性の指標を提供する。故に耐久性は回避し難い変化を評価するが、頑健性は慎重な変化を評価する。耐久性および頑健性により評価される典型的なパラメーターには、凍結 / 解凍、インキュベーション時間、インキュベーション温度、試薬の寿命、試料調製物、試料貯蔵、細胞継代数、多くの毒素、精製間の変動性およびニッキング反応間の変動性の影響が含まれる。細胞基盤のアッセイに関する頑健性パラメーターには、細胞バンク（凍結の始め、中間および終わり）、細胞継代レベル、細胞播種密度、細胞ストック密度（培養何日か）、フラスコ中の細胞齢（播種までの待ち時間）、インキュベーション時間、様々なプレート、過量の血清、および試薬の供給源が含まれる。方法の系適合性は参考標準の分析による経時的な、試薬および装置の性能を含むアッセイ性能の決定である。設備、電子工学、アッセイ性能および分析されるべき試料が統合された系を構成するという事実を参照して FDA の指導では系適合性が強調される。用量対応答の対数をプロットする場合、参照物質の連続希釈および試料の連続希釈が併行曲線を生じさせるはずである平行性について試験することにより、系適合性を評価することができる。

20

【0081】

本開示の態様は一部では確立された細胞株からの細胞を含んでなる。本明細書で使用される際には「細胞」なる用語は、BoNT/A による BoNT/A 中毒に感受性が高い任意の真核細胞、または BoNT/A を取り込むことができる任意の真核細胞を指す。細胞なる用語は例えばネズミ、ラット、ブタ、ウシ、ウマ、靈長類およびヒト細胞のような種々の生物からの；例えばニューロン性および非ニューロン性のような種々の細胞型からの；細胞を包含し、そして同種の細胞集団、組織または生物から単離できるか、またはその一部でよい。本明細書で使用される際には「確立された細胞株」なる用語は「不死細胞株」または「形質転換された細胞株」と同義であり、そして生物、組織または器官供給源から誘導される細胞集団からの無制限な繁殖に関して選択された細胞の細胞培養物を指す。定義によれば、確立された細胞株は初代細胞の細胞培養物を除外する。本明細書で使用される際には「初代細胞」なる用語は新鮮な組織または器官から直接採取された細胞であり、そして無制限に繁殖する潜在能力を有さない。確立された細胞株は細胞の異種性集団または細胞の均一な集団を含んでなることができる。单一の細胞から誘導される確立された細胞株はクローニング細胞株と称される。確立された細胞株は、その細胞が全体的な細胞メカニズム（それにより BoNT/A がタンパク質分解により SNAP-25 基質を切断し、そして BoNT/A の BoNT/A 受容体への結合、神経毒 / 受容体複合体の内部移行、BoNT/A 軽鎖の細胞内小胞から細胞質への転位置および SNAP-25 のタンパク質分解による切断を含む）を行うために細胞に必要な全ての構成要素を内因的に発現するものでよい。それに代えて、確立された細胞株は、その細胞が全体的な細胞メカニズム（それにより BoNT/A がタンパク質分解により SNAP-25 基質を切断し、そして BoNT/A の BoNT/A 受容体への結合、神経毒 / 受容体複合体の内部移行、BoNT/A 軽鎖の細胞内小胞から細胞質への転位置および SNAP-25 のタンパク質分解に

30

40

50

よる切断を包含する)を行うために外因性供給源から少なくとも1つの構成要素を導入されてしまっているものでよい。遺伝子操作された細胞株とも称されるかかる確立された細胞株からの細胞は例えば外因性F G F R 2、外因性F G F R 3、外因性S V 2、外因性S N A P - 2 5または任意のその組み合わせを発現できる。

#### 【0082】

本開示の態様は一部ではB o N T / A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞を含んでなる。本明細書で使用される際には「B o N T / A中毒に感受性が高い(複数の)細胞」、「B o N T / AによるB o N T / A中毒に感受性が高い(複数の)細胞」または「B o N T / AによるB o N T / A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの(複数の)細胞」なる用語は全体的な細胞メカニズム(それによりB o N T / Aがタンパク質分解によりS N A P - 2 5基質を切断し、そしてB o N T / AのB o N T / A受容体への結合、神経毒/受容体複合体の内部移行、B o N T / A軽鎖の細胞内小胞から細胞質への転位置およびS N A P - 2 5のタンパク質分解による切断を包含する)を行うことができる(複数の)細胞を指す。定義によれば、B o N T / A中毒に感受性が高い(複数の)細胞は少なくとも1つのB o N T / A受容体および少なくとも1つのS N A P - 2 5基質を発現するか、または発現するように操作されなければならない。本明細書で使用される際には「B o N T / Aを取り込むことができる(複数の)細胞」または「B o N T / Aを取り込むことができる確立された細胞株を含んでなる(複数の)細胞」なる用語は全体的な細胞メカニズム(それによりB o N T / Aがタンパク質分解によりS N A P - 2 5基質を切断し、そしてB o N T / AのB o N T / A受容体への結合、神経毒/受容体複合体の内部移行、B o N T / A軽鎖の細胞内小胞から細胞質への転位置およびS N A P - 2 5のタンパク質分解による切断を包含する)を行うことができる細胞を指す。定義によれば、B o N T / Aを取り込むことができる(複数の)細胞は少なくとも1つのB o N T / A受容体および少なくとも1つのS N A P - 2 5基質を発現するか、または発現するように操作されなければならない。

10

20

30

40

#### 【0083】

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

#### 【0084】

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

50

確立された細胞株を含んでなる細胞は約 9 pM 以下、約 8 pM 以下、約 7 pM 以下、約 6 pM 以下、約 5 pM 以下、約 4 pM 以下、約 3 pM 以下、約 2 pM 以下または約 1 pM 以下の BoNT/A を取り込む能力を保有する。なおその他の態様では、確立された細胞株を含んでなる細胞は約 0.9 pM 以下、約 0.8 pM 以下、約 0.7 pM 以下、約 0.6 pM 以下、約 0.5 pM 以下、約 0.4 pM 以下、約 0.3 pM 以下、約 0.2 pM 以下または約 0.1 pM 以下の BoNT/A を取り込む能力を保有する。

#### 【 0 0 8 5 】

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

10

#### 【 0 0 8 6 】

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

20

30

40

#### 【 0 0 8 7 】

本明細書で使用される際には「非天然発生 BoNT/A」なる用語は、限定するものではないが、無作為変異誘発または合理的設計を用いて遺伝子操作により生成された改変されたアミノ酸配列を伴う BoNT/A、およびインビトロ化学合成により生成された BoNT/A を含む、その構造がヒトの用手操作を援用して修飾された任意の BoNT/A を指す。非天然発生 BoNT/A の非限定例は例えば「翻訳後修飾およびクロストリジウム神経毒」Steward, L.E. ら、米国特許第 7223577 号；「活性化可能なクロストリジウム毒素」Dolly, J.O. ら、米国特許第 7419676 号；「クロストリジウム神経毒組成物および修飾クロストリジウム神経毒」Steward, L.E. ら、米国特許出願公開第 2004/0220386 号；「内因性クロストリジウム毒素受容体系に関する増強されたターゲティング能力を有する修飾クロストリジウム毒素」Steward, L.E. ら、米国特許出願公開第 2008/0096248 号；「クロストリジウム毒素標的細胞に関する改変されたターゲティング能力を有する修飾クロストリジウム毒素」Steward, L.E. ら、米国特許出願公開第 2008/0161543 号；「クロストリジウム毒素標的細胞に関する増強された転位置能力および改変されたターゲティング活性を有する修飾クロストリジウム毒素」Steward, L.E. ら、米国特許出願公開第 2008/0241881 号（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。

50

## 【0088】

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

## 【0089】

別の実施態様では、検出されているBoNT/A活性は非天然発生BoNT/Aに由来する。この実施態様のその他の態様では、検出されているBoNT/A活性は配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：4と例えれば少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する非天然発生BoNT/Aバリエントに由来する。この実施態様のその他の態様では検出されているBoNT/A活性は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：4に相対して例えれば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の非隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生BoNT/Aバリエントに由来する。この実施態様のなおその他の態様では検出されているBoNT/A活性は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：4に相対して例えれば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生BoNT/Aバリエントに由来する。

## 【0090】

本開示の態様は一部ではSNAP-25を含んでなる。本明細書で使用される際には「SNAP-25」なる用語はBoNT/Aにより優先的に切断される天然発生SNAP-25または非天然発生SNAP-25を指す。本明細書で使用される際には「優先的に切断される」なる用語は、BoNT/AによるBoNT/A基質の切断速度が、BoNT/Aによる任意のその他の基質の切断速度よりも少なくとも1桁高いことを指す。この実施態様の態様では、BoNT/AによるBoNT/A基質の切断速度はBoNT/Aによる任意のその他の基質の切断速度よりも少なくとも2桁高い、少なくとも3桁高い、少なくとも4桁高い、または少なくとも5桁高い。

## 【0091】

本明細書で使用される際には「天然発生SNAP-25」なる用語は、限定するものではないが、翻訳後修飾、選択的スプライシングされた転写物または自然突然変異から生成されるSNAP-25アイソフォームおよびSNAP-25サブタイプを含む天然発生過程により生成される任意のSNAP-25を指す。天然発生SNAP-25には限定するものではないが、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23もしくは配列番号：24、または配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23もしくは配

10

20

30

40

50

列番号：24から例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上のアミノ酸を置換、欠失または付加するものが含まれる。

#### 【0092】

本明細書で使用される際には「非天然発生S N A P - 2 5」なる用語は、限定するものではないが、無作為変異誘発または合理的設計を用いて遺伝子操作により生成されたS N A P - 2 5、およびインビトロ化学合成により生成されたS N A P - 2 5を含む、その構造がヒトの用手操作を援用して修飾された任意のS N A P - 2 5を指す。非天然発生S N A P - 2 5の非限定例は例えば「クロストリジウム毒素に関するF R E Tプロテアーゼアッセイ」Steward, L.E.ら、米国特許第7332567号；「クロストリジウム毒素活性に関する親油性色素基盤のF R E Tアッセイ」Fernandez-Salasら、米国特許出願公開第2008/0160561号（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。非天然発生S N A P - 2 5は配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24から例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上のアミノ酸を置換、欠失または付加できる。  
10  
20

#### 【0093】

故に実施態様では、S N A P - 2 5は天然発生S N A P - 2 5である。この実施態様の態様では、S N A P - 2 5はS N A P - 2 5アイソフォームまたはS N A P - 2 5サブタイプである。この実施態様の態様では、天然発生S N A P - 2 5は配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24の天然発生S N A P - 2 5である。この実施態様のその他の態様では、S N A P - 2 5は、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24と例えば少なくとも70%のアミノ酸同一性、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する天然発生S N A P - 2 5である。  
30

#### 【0094】

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

号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24に相対して例えば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上の隣接アミノ酸置換、欠失または付加を有する非天然発生S N A P - 2 5である。

## 【0095】

S N A P - 2 5は内因性S N A P - 2 5または外因性S N A P - 2 5でよい。本明細書で使用される際には「内因性S N A P - 2 5」なる用語は、それが細胞のゲノム内で天然にコードされるので、S N A P - 2 5の外部供給源またはS N A P - 2 5をコードする遺伝材料の外部供給源を必要とせずに細胞が生来的にS N A P - 2 5を発現するように細胞に天然に存在するS N A P - 2 5を指す。内因性S N A P - 2 5の発現は例えば細胞分化のような環境刺激を伴っても、または伴わなくてもよい。定義によれば、内因性S N A P - 2 5は天然発生S N A P - 2 5またはそのバリエントのみでよい。例えば以下の確立された細胞株は内因性S N A P - 2 5を発現する：B E ( 2 ) - M 1 7、K e l l y、L A 1 - 5 5 n、N 1 E - 1 1 5、N 4 T G 3、N 1 8、Neuro - 2 a、N G 1 0 8 - 1 5、P C 1 2、S H - S Y 5 Y、S i M aおよびS K - N - B E ( 2 ) - C。

10

## 【0096】

本明細書で使用される際には「外因性S N A P - 2 5」なる用語は、ヒトの用手操作によりS N A P - 2 5の外部供給源またはS N A P - 2 5をコードする遺伝材料の外部供給源の導入を介して細胞において発現されるS N A P - 2 5を指す。外因性S N A P - 2 5の発現は例えば細胞分化のような環境刺激を伴っても、または伴わなくてもよい。非限定例としては、確立された細胞株からの細胞はS N A P - 2 5の一過性の、または安定したトランスフェクションにより外因性S N A P - 2 5を発現することができる。別の非限定例としては、確立された細胞株からの細胞はS N A P - 2 5のタンパク質トランスフェクションにより外因性S N A P - 2 5を発現することができる。外因性S N A P - 2 5は天然発生S N A P - 2 5もしくはそのバリエント、または非天然発生S N A P - 2 5もしくはそのバリエントでよい。

20

## 【0097】

故に実施態様では、確立された細胞株からの細胞は内因性S N A P - 2 5を発現する。この実施態様の態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性S N A P - 2 5は天然発生S N A P - 2 5である。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性S N A P - 2 5は配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24である。この実施態様のなおさらなる態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性S N A P - 2 5は例えばS N A P - 2 5アイソフォームまたはS N A P - 2 5サブタイプのような天然発生S N A P - 2 5である。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞により発現される内因性S N A P - 2 5は、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24と例えば少なくとも70%のアミノ酸同一性、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する天然発生S N A P - 2 5である。

30

## 【0098】

別の実施態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して外因性S

40

50

N A P - 2 5 を発現するために操作される。この実施態様の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して天然発生 S N A P - 2 5 を発現するために操作される。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 または配列番号：24 の天然発生 S N A P - 2 5 を発現するために操作される。この実施態様のなおその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して例えば S N A P - 2 5 アイソフォームまたは S N A P - 2 5 サブタイプのような天然発生 S N A P - 2 5 を発現するために操作される。この実施態様のさらにその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23 または配列番号：24 と例えば少なくとも 70% のアミノ酸同一性、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90% または少なくとも 95% のアミノ酸同一性を有する天然発生 S N A P - 2 5 を発現するために操作される。

#### 【 0 0 9 9 】

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

#### 【 0 1 0 0 】

B o N T / A への暴露の後に B o N T / A 基質の切断を検出するアッセイを用いて、細胞が内因性または外因性 S N A P - 2 5 を発現しているかどうかを評価することができる。これらのアッセイでは S N A P - 2 5 を発現する細胞において B o N T / A 処理の後に

10

20

30

40

50

S N A P - 2 5 切断生成物の作成を検出する。特異的ウェスタンプロット分析の非限定例、ならびに十分に特徴付けされた試薬、条件およびプロトコールを、限定するものではないが、Amersham Biosciences, Piscataway, NJ ; Bio - Rad Laboratories, Hercules, CA ; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL ; Promega Corporation, Madison, WI ; およびStratagene, Inc., La Jolla, CA. を含む商業用の製造供給元から容易に入手可能である。S N A P - 2 5 切断に関するこれらのおよび類似のアッセイは、内因性または外因性S N A P - 2 5 を発現する細胞を同定するのに有用であり得る。

#### 【 0 1 0 1 】

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

10

20

30

40

#### 【 0 1 0 2 】

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

#### 【 0 1 0 3 】

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

50

のではないが、翻訳後修飾、選択的スプライシングされた転写物、または自然突然変異から生成される B<sub>o</sub>NT / A 受容体アイソフォーム、および B<sub>o</sub>NT / A 受容体サブタイプを含む天然発生過程により生成される任意の B<sub>o</sub>NT / A 受容体を指す。天然発生 B<sub>o</sub>NT / A 受容体には、限定するものではないが、「ボツリヌス毒素スクリーニングアッセイ」Ester Fernandez - Salasら、米国特許出願公開第 2008 / 0003240 号；「ボツリヌス毒素スクリーニングアッセイ」Ester Fernandez - Salasら、米国特許出願公開第 2008 / 0182799 号；「SV2はボツリヌス神経毒Aに関するタンパク質受容体である」Min Dongら、Science (2006)；「シナプス性小胞タンパク質 2C はボツリヌス神経毒Aの横隔神経への取り込みを媒介する」S. Mahrhold et al, FEBS Lett. 580 (8) : 2011 - 2014 (2006)（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載されるもののような、芽細胞成長因子受容体 2 (FGFR2)、線維芽細胞成長因子受容体 3 (FGFR3)、シナプス性小胞糖タンパク質 2 (SV2) および GΤ1b 様複合体ガングリオシドが含まれる。天然発生 FGFR2 には限定するものではないが、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69 および配列番号：70、または配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69 および配列番号：70 から例えば 1 個以上、2 個以上、3 個以上、4 個以上、5 個以上、6 個以上、7 個以上、8 個以上、9 個以上、10 個以上、20 個以上、30 個以上、40 個以上、50 個以上、もしくは 100 個以上のアミノ酸を置換、欠失もしくは付加したものが含まれる。天然発生 FGFR3 には限定するものではないが、配列番号：25、配列番号：26 および配列番号：27、または配列番号：25、配列番号：26 および配列番号：27 から例えば 1 個以上、2 個以上、3 個以上、4 個以上、5 個以上、6 個以上、7 個以上、8 個以上、9 個以上、10 個以上、20 個以上、30 個以上、40 個以上、50 個以上、もしくは 100 個以上のアミノ酸を置換、欠失もしくは付加したものが含まれる。天然発生 SV2 には限定するものではないが、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30 および配列番号：31、または配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30 および配列番号：31 から例えば 1 個以上、2 個以上、3 個以上、4 個以上、5 個以上、6 個以上、7 個以上、8 個以上、9 個以上、10 個以上、20 個以上、30 個以上、40 個以上、50 個以上、もしくは 100 個以上のアミノ酸を置換、欠失もしくは付加したものが含まれる。  
10  
20  
30

#### 【0104】

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

#### 【0105】

本明細書で使用される際には「非天然発生 B<sub>o</sub>NT / A 受容体」なる用語は、限定するものではないが、無作為変異誘発または合理的設計を用いて遺伝子操作により生成された B<sub>o</sub>NT / A 受容体、およびインビトロ化学合成により生成された B<sub>o</sub>NT / A 受容体を含む、その構造がヒトの用手操作を援用して修飾された任意の B<sub>o</sub>NT / A 受容体を指す。非天然発生 B<sub>o</sub>NT / A 受容体の非限定例は例えば「ボツリヌス毒素スクリーニングアッセイ」Ester Fernandez - Salasら、米国特許出願公開第 2008 / 0003240 号；「ボツリヌス毒素スクリーニングアッセイ」Ester Fernandez - Salasら、米国特許出願公開第 2008 / 0182799 号（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。非天然発生 B<sub>o</sub>NT / A 受容体は配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31

40

50

号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70からの例えれば1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、または100個以上のアミノ酸を置換、欠失または付加できる。

#### 【0106】

故に実施態様では、BoNT/A受容体は例えばFGFR2、FGFR3またはSV2のような天然発生BoNT/A受容体である。この実施態様の態様では、BoNT/A受容体はBoNT/A受容体アイソフォームまたはBoNT/A受容体サブタイプである。  
この実施態様の態様では、天然発生BoNT/A受容体は配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70の天然発生BoNT/A受容体である。この実施態様のその他の態様ではBoNT/A受容体は、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70と例えれば少なくとも70%のアミノ酸同一性、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する天然発生BoNT/A受容体である。

10

20

30

40

#### 【0107】

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

#### 【0108】

BoNT/A受容体は内因性BoNT/A受容体または外因性BoNT/A受容体でよ

50

い。本明細書で使用される際には「内因性 B<sub>o</sub>NT / A 受容体」なる用語は、それが細胞のゲノム内で天然にコードされるので、B<sub>o</sub>NT / A 受容体の外部供給源またはB<sub>o</sub>NT / A 受容体をコードする遺伝材料の外部供給源を必要とせずに細胞が生来的にB<sub>o</sub>NT / A 受容体を発現するように細胞に天然に存在するB<sub>o</sub>NT / A 受容体を指す。内因性 B<sub>o</sub>NT / A 受容体の発現は例えば細胞分化またはプロモーター活性化のような環境刺激を伴っても、または伴わなくてもよい。例えば以下の確立された細胞株は少なくとも1つの内因性 B<sub>o</sub>NT / A 受容体を発現する：B E (2) - M 17、K e l l y、L A 1 - 55n、N 1 E - 115、N 4 T G 3、N 18、Neuro - 2a、N G 108 - 15、P C 12、S H - S Y 5 Y、S i M a およびS K - N - B E (2) - C。内因性 B<sub>o</sub>NT / A 受容体は天然発生 B<sub>o</sub>NT / A 受容体またはその天然発生バリアントのみでよい。

10

#### 【0109】

本明細書で使用される際には「外因性 B<sub>o</sub>NT / A 受容体」なる用語は、ヒトの用手操作によりB<sub>o</sub>NT / A 受容体の外部供給源またはB<sub>o</sub>NT / A 受容体をコードする遺伝材料の外部供給源の導入を介して細胞において発現されたB<sub>o</sub>NT / A 受容体を指す。外因性 B<sub>o</sub>NT / A 受容体の発現は例えば細胞分化またはプロモーター活性化のような環境刺激を伴っても、または伴わなくてもよい。非限定例としては、確立された細胞株からの細胞は例えばF G F R 2、F G F R 3 またはS V 2 のようなB<sub>o</sub>NT / A 受容体をコードするポリヌクレオチド分子の一過性の、または安定したトランスフェクションにより1つまたはそれより多い外因性 B<sub>o</sub>NT / A 受容体を発現することができる。別の非限定例としては、確立された細胞株からの細胞は、例えばF G F R 2、F G F R 3 またはS V 2 のようなB<sub>o</sub>NT / A 受容体のタンパク質トランスフェクションにより1つまたはそれより多い外因性 B<sub>o</sub>NT / A 受容体を発現することができる。外因性 B<sub>o</sub>NT / A 受容体は天然発生 B<sub>o</sub>NT / A 受容体もしくはその天然発生バリアント、または非天然発生 B<sub>o</sub>NT / A 受容体もしくはその非天然発生バリアントでよい。

20

#### 【0110】

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

30

#### 【0111】

別の実施態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して外因性 B<sub>o</sub>NT / A 受容体を発現するために操作される。この実施態様の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して天然発生 B<sub>o</sub>NT / A 受容体を発現するために操作される。この実施態様のその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28

40

50

、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：59、配列番号：60  
、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65  
、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：  
70の天然発生B<sub>o</sub>NT/A受容体を発現するために操作される。この実施態様のなお  
その他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して例えばB<sub>o</sub>NT/  
A受容体アイソフォームまたはB<sub>o</sub>NT/A受容体サブタイプのような天然発生B<sub>o</sub>NT/  
A受容体を発現するために操作される。この実施態様のさらにその他の態様では、  
確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して配列番号：25、配列番号：2  
6、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：3  
1、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：6  
3、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：6  
8、配列番号：69または配列番号：70と例えれば少なくとも70%のアミノ酸同一性、  
少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少  
なくとも95%のアミノ酸同一性を有する天然発生B<sub>o</sub>NT/A受容体を発現するために操  
作される。  
10

#### 【0112】

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

#### 【0113】

別の実施態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して外因性F  
G F R 2、外因性F G F R 3、外因性S V 2または任意のその組み合わせを発現するため  
に操作される。この実施態様の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または  
安定して天然発生F G F R 2、天然発生F G F R 3、天然発生S V 2または任意のその  
組み合わせを発現するために操作される。この実施態様のなおその他の態様では、確立さ  
れた細胞株からの細胞は一過性に、または安定して非天然発生F G F R 2、非天然発生F  
G F R 3、非天然発生S V 2または任意のその組み合わせを発現するために操作される。  
40

この実施態様のさらにその他の態様では、確立された細胞株からの細胞は一過性に、または安定して天然発生 F G F R 2 もしくは非天然発生 F G F R 2、天然発生 F G F R 3 もしくは非天然発生 F G F R 3、天然発生 S V 2 もしくは非天然発生 S V 2、または任意のその組み合わせを発現するために操作される。

#### 【 0 1 1 4 】

毒素取り込みに関する直接的および間接的アッセイを含む常法により、1つまたはそれより多い内因性または外因性 B o N T / A 受容体を発現する細胞を同定することができる。B o N T / A 結合または取り込み特性を決定するアッセイを用いて、細胞が B o N T / A 受容体を発現しているかどうかを評価することができる。かかるアッセイには、限定するものではないが、例えば [ 1 2 5 I ] B o N T / A 、 [ 1 2 5 I ] のような標識 B o N T / A を使用する架橋アッセイが含まれ、例えば「クロストリジウムボツリヌス C 型神経毒の様々な神経芽細胞腫細胞株への結合」Noriko Yokosawa et al., Infect. Immun. 57 (1) : 272 - 277 (1989) ; 「ボツリヌス C 1、D および E 型神経毒のニューロン細胞株およびシナプトソームへの結合」Noriko Yokosawa et al. Toxicon 29 (2) : 261 - 264 (1991) ; および「ラット脳シナプトソームにおけるクロストリジウムボツリヌス B 型神経毒に関するタンパク質受容体の同定」Tei - ichi Nishiki et al., J. Biol. Chem. 269 (14) : 10498 - 10503 (1994) を参照されたい。その他の非限定的なアッセイには、標識または未標識抗体を使用して B o N T / A 結合を検出する免疫細胞化学アッセイ（例えば「クロストリジウムボツリヌス C 型前駆体毒素の H T - 2 9 細胞への内部移行のための受容体およびトランスポーター」Atsushi Nishikawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 319 (2) : 327 - 333 (2004) 参照）および標識または未標識抗体を使用して結合毒素を検出する免疫沈降アッセイ（例えば「腸上皮細胞および赤血球に関するクロストリジウムボツリヌス C 型前駆体毒素の結合サブコンポーネントの分子特徴付け」Yukako Fujinaga et al., Microbiology 150 (Pt 5) : 1529 - 1538 (2004) 参照）が含まれる。これらのアッセイに有用な抗体には、限定するものではないが、B o N T / A に対して選択された抗体、例えば F G F R 2、F G F R 3 もしくは S V 2 のような B o N T / A 受容体に対して選択された抗体、および / または例えば G D 1 a、G D 1 b、G D 3、G Q 1 b もしくは G T 1 b のようなガングリオシドに対して選択された抗体が含まれる。抗体が標識されている場合、当業者に周知の技術を用いて、ウェスタンプロット分析、抗体の細胞位置の直接顕微鏡的観察、洗浄工程、フローサイトメトリー、電気泳動またはキャピラリー電気泳動後の細胞または基質結合抗体の測定を含む種々の手段により分子の結合を検出することができる。抗体が未標識である場合、結合分子の間接的検出のための標識二次抗体を用いることができ、そして標識抗体に関するように検出を進めることができる。B o N T / A 取り込み特性または特徴を決定するこれらのおよび類似のアッセイが内因性または外因性または B o N T / A 受容体を発現する細胞を同定するのに有用であり得るということは理解される。

#### 【 0 1 1 5 】

B o N T / A への暴露の後の分子の放出をモニタリングするアッセイを用いて、細胞が1つまたはそれより多い内因性または外因性 B o N T / A 受容体を発現しているかどうかを評価することもできる。これらのアッセイでは、B o N T / A 処理の後、B o N T / A 受容体を発現している細胞において分子の放出の阻止が生じるであろう。周知のアッセイには、ニューロンからの例えば [ 3 H ] ノルアドリナリンまたは [ 3 H ] ドーパミン放出のような放射標識カテコラミン放出の阻止を測定する（例えば「破傷風毒素およびボツリヌス毒素 F 型に感度が低いカルシウム依存性小胞伝達物質放出に関する証拠」A Fassio et al., Neuroscience 90 (3) : 893 - 902 (1999) ; および「カテコラミン放出のボツリヌス毒素 C 1 および E に対する感度により容易に放出可能なプールに設定された小胞の選択的なターゲティングが示唆される」Sara Stigliani et al., J. Neurochem. 85 (2) : 409 - 421 (2003) 参照）または蛍光定量的な手順を用いてカテコラミン放出を測定する（例えば「エクトアクセプター (ecto - acceptors) に結合し、そして細胞内伝達物質放出を阻止する毒素誘導体により表されるボツリヌス神経毒 A の内部移行における鎖間ジスル

10

20

30

40

50

フィドまたその関与するチオールの役割」Anton de Paiva et al., J. Biol. Chem. 268 (28) : 20838 - 20844 (1993) ; 「ボツリヌス毒素AまたはBによる25kDaのシナプトソーム関連タンパク質(SNAP-25)またはシナプトブレビンの切断後のインタクトな、および透過処理されたクロム親和性細胞の明確なエキソサイトーシス応答」Gary W. Lawrence et al., Eur. J. Biochem. 236 (3) : 877 - 886 (1996) ; および「インタクトな、および透過処理されたクロム親和性細胞においてボツリヌス神経毒C1はシンタキシンおよびSNAP-25の双方を切断する：カテコラミン放出のその遮断との相関」Patrick Foran et al., Biochemistry 35 (8) : 2630 - 2636 (1996) 参照) 方法が含まれる。その他の非限定例には、例えば下垂体前葉細胞または卵巣細胞のような内分泌細胞からのホルモン放出の阻止を測定するアッセイが含まれる。分子放出に関するこれらのおよび類似のアッセイが内因性または外因性またはBoNT/A受容体を発現する細胞を同定するのに有用であり得るということは理解される。

10

## 【0116】

BoNT/Aへの暴露の後にBoNT/A基質の切断を検出するアッセイを用いて、細胞が1つまたはそれより多い内因性または外因性BoNT/A受容体を発現しているかどうかを評価することもできる。これらのアッセイでは、BoNT/A処理後、BoNT/A受容体を発現する細胞においてBoNT/A基質切断生成物の作成またはインタクトなBoNT/A基質の消失を検出する。特異的ウェスタンプロット分析の非限定例、ならびに十分に特徴付けされた試薬、条件およびプロトコールを、限定するものではないが、Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL; Promega Corporation, Madison, WI; およびStratagene, Inc., La Jolla, CA. を含む商業的な製造供給元から容易に入手可能である。BoNT/A基質切断に関するこれらのおよび類似のアッセイは、内因性または外因性BoNT/A受容体を発現する細胞を同定するのに有用であり得る。

20

## 【0117】

非限定例としては、BoNT/A SNAP-25切断生成物またはSNAP-25の切断および未切斷双方の形態を認識する抗体を使用するウェスタンプロット分析を用いてBoNT/Aの取り込みに関して検定することができる。これらのアッセイに有用な-SNAP-25抗体の実例には、限定するものではないが、SMI-81 - SNAP-25マウスモノクローナル抗体(Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD)、CI71.1マウス - SNAP-25モノクローナル抗体(Synaptic Systems, Goettlingen, Germany)、CI71.2 - SNAP-25マウスモノクローナル抗体(Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、SP12 - SNAP-25マウスマノクローナル抗体(Abcam, Cambridge, MA)、 - SNAP-25ウサギポリクローナル抗血清(Synaptic Systems, Goettingen, Germany)、 - SNAP-25ウサギポリクローナル抗血清S9684(Sigma, St Louis, MO)および - SNAP-25ウサギポリクローナル抗血清(Abcam, Cambridge, MA)が含まれる。

30

## 【0118】

本開示の態様は、遺伝子用手操作または組換え操作を介して外因性SNAP-25および/または1つもしくはそれより多い外因性BoNT/A受容体を発現するように作られた細胞を提供する。遺伝子用手操作または組換え操作を介して外因性SNAP-25および/または1つもしくはそれより多い外因性BoNT/A受容体を発現するのに有用な細胞には、内因性SNAP-25および/または1つもしくはそれより多い内因性BoNT/A受容体を発現しても、またはしなくてもよいニューロン細胞および非ニューロン細胞が含まれる。かかる遺伝子用手操作または組換え操作された細胞は構成的、組織特異的、細胞特異的または誘導プロモーターエレメント、エンハンサー要素または双方の制御下で外因性SNAP-25および1つまたはそれより多い外因性BoNT/A受容体を発現できることはさらに理解される。外因性SNAP-25および/または1つもしくはそれより多い外因性BoNT/A受容体を発現するように細胞を遺伝子用手操作または組換え操作することができる限り、任意の細胞が有用であり、そしてBoNT/A中毒を起

40

50

こすことが可能であることは理解される。

【0119】

それによりBoNT/Aがタンパク質分解により例えばSNAP-25、FGFR2、FGFR3またはSV2のようなSNAP-25基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために、細胞に必要な構成要素をコードする外因性ポリヌクレオチド分子を細胞へ導入するために有用な方法には、限定するものではないが、例えばリン酸カルシウム媒介、ジエチル-アミノエチル(DEAE)デキストラン媒介、脂質媒介、ポリエチレンイミン(PEI)媒介、ポリリジン媒介およびポリブレン媒介のような化学媒介分配方法；例えばバイオリストイック粒子分配、マイクロインジェクション、プロトプラスト融合およびエレクトロポレーションのような物理学媒介方法；ならびに例えばレトロウイルス媒介トランスフェクションのようなウイルス媒介分配方法が含まれ、例えば「クローン化された遺伝子の培養哺乳動物細胞への導入」Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3<sup>rd</sup> ed. pp. 16.1 - 16.62 (2001)；「哺乳動物細胞における外来遺伝子の移行および発現」Alessia Colosimo et al., Biotechniques 29 (2) : 314 - 318, 320 - 322, 324 (2000)；「ニューロンへの遺伝子移入のための技術」Philip Washbourne & A. Kimberley McAllister, Philip Washbourne & A. Kimberley McAllister, Curr. Opin. Neurobiol. 12 (5) : 566 - 573 (2002)；およびCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, pp 9.16.4 - 9.16.11 (2000)（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）を参照されたい。ポリヌクレオチド分子を細胞に導入するための具体的な方法の選択は一部では、それによりBoNT/Aがタンパク質分解によりSNAP-25基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な構成要素を、細胞が一過性に、または安定して含有するかどうかに依存することは当業者には理解される。それによりBoNT/Aがタンパク質分解によりSNAP-25基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な構成要素をコードするポリヌクレオチド分子の非限定例は以下のとおりである：配列番号：130、配列番号：131、配列番号：132、配列番号：133、配列番号：134、配列番号：135、配列番号：136、配列番号：137または配列番号：138のFGFR2ポリヌクレオチド分子；配列番号：139、配列番号：140または配列番号：141のFGFR3ポリヌクレオチド分子；配列番号：142、配列番号：143または配列番号：144のSV2ポリヌクレオチド分子；および配列番号：145または配列番号：146のSNAP-25ポリヌクレオチド分子。

【0120】

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

【0121】

物理学媒介方法は当業者に周知であり、そして例えば「バイオリストイックス技術を用いるニューロンにおけるプラスミド媒介遺伝子移入」Jeike E. Biewenga et al., J. Neurosci. Methods. 71 (1) : 67 - 75 (1997)；「バイオリストイックおよびジオリストイックトランスフェクション：遺伝子銃を使用してDNAおよび親油性色素を哺乳動物細胞に分配する」John O'Brien & Sarah C. R. Lummis, Methods 33 (2) : 121 - 125 (2004)

10

20

30

40

50

) ; 「インピトロおよびインピボ電場媒介透過処理、遺伝子移入および発現」M. Golzio et al., Methods 33 (2) : 126 - 135 (2004) ; および「初代細胞への遺伝子移入のための新しい非ウイルス方法」Oliver Greschet al., Methods 33 (2) : 151 - 163 (2004) (その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする)に記載される。

### 【0122】

ウイルス媒介分配方法は当業者に周知であり、そして例えば「アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスベクター」Chooi M. Lai et al., DNA Cell Biol. 21 (12) : 895 - 913 (2002) ; 「アルファウイルス基盤発現ベクター：計画および適用」Ilya Frolov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (21) : 11371 - 11377 (1996) ; 「DNAの哺乳動物への分配のためのレンチウイルスベクター」Roland Wolkowicz et al., Methods Mol. Biol. 246 : 391 - 411 (2004) ; 「バキュロウイルスベクター：新規哺乳動物細胞遺伝子分配ベヒクルおよびその適用」A. Huser & C. Hofmann, Am. J. Pharmacogenomics 3 (1) : 53 - 63 (2003) ; 「哺乳動物細胞の形質導入のためのレトロウイルスおよびレンチウイルス基盤ベクターの一過性生成」Tiziana Tonini et al., Methods Mol. Biol. 285 : 141 - 148 (2004) ; 「テトラサイクリン応答プロモーターによる真核細胞における遺伝子発現の厳格な制御」Manfred GossenおよびHermann Bujard、米国特許第5464758号；「遺伝子発現を調節するための方法」Hermann BujardおよびManfred Gossen、米国特許第5814618号；「昆虫ステロイドホルモン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび同一物で形質転換された細胞」David S. Hogness、米国特許第5514578号；「昆虫エクジソン受容体をコードするポリヌクレオチド」David S. Hogness、米国特許第6245531号；「C末端ホルモン結合ドメイントランケーションを有するプロゲステロン受容体」Elisabetta Vegetoら、米国特許第5364791号；「変異したステロイドホルモン受容体、その使用のための方法および遺伝子治療のための分子スイッチ」Elisabetta Vegetoら、米国特許第5874534号(その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする)に記載される。かかるウイルス媒介分配方法を標準的な手順により調製することができ、そして市販により入手可能であり、例えばViraPower(商標)アデノウイルス発現系(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)およびViraPower(商標)アデノウイルス発現系説明マニュアル25-0543バージョンA、Invitrogen, Inc. (2002年6月15日)；ならびにAdEasy(商標)アデノウイルスベクター系(Stratagene, Inc., La Jolla, CA)およびAdEasy(商標)アデノウイルスベクター系説明マニュアル064004f(Stratagene, Inc.)を参照されたい。さらにかかるウイルス媒介分配系を標準的な方法により調製することができ、そして市販により入手可能であり、例えばBD(商標)Tet-OffおよびTet-On遺伝子発現系(BD Biosciences - Clonetech, Palo Alto, CA)およびBD(商標)Tet-OffおよびTet-On遺伝子発現系ユーチュアルPT3001-1(BD Biosciences Clonetech)(2003年3月14日)、Gene Switch(商標)系(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)および哺乳動物細胞のためのGene Switch(商標)系Aミフェブリストン調節発現系バージョンD、25-0313(Invitrogen, Inc.)(2002年11月4日)；ViraPower(商標)レンチウイルス発現系(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)およびViraPower(商標)レンチウイルス発現系説明マニュアル25-0501バージョンE(Invitrogen, Inc.)(2003年12月8日)；ならびにComplete Control(登録商標)レトロウイルス誘導哺乳動物発現系(Stratagene, La Jolla, CA)およびComplete Control(登録商標)レトロウイルス誘導哺乳動物発現系説明マニュアル064005eを参照されたい。

### 【0123】

故に実施態様では、BoNT/A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、それによりBoNT/Aがタンパク質分解によりSNAP-25基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な構成要素をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。別の実施態様では、BoNT/A中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、それによりBoNT/Aがタンパク質分解によりSNAP-25基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な複数の構成要素をコードする

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。この実施態様の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、F G F R 2、F G F R 3、S V 2またはS N A P - 2 5をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。この実施態様の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：1 3 0、配列番号：1 3 1、配列番号：1 3 2、配列番号：1 3 3、配列番号：1 3 4、配列番号：1 3 5、配列番号：1 3 6、配列番号：1 3 7または配列番号：1 3 8のF G F R 2をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。この実施態様のその他の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：1 3 9、配列番号：1 4 0または配列番号：1 4 1のF G F R 3をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。この実施態様のなおその他の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：1 4 2、配列番号：1 4 3または配列番号：1 4 4のS V 2をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。この実施態様のなおその他の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：1 4 5または配列番号：1 4 6のS N A P - 2 5をコードするポリヌクレオチド分子を一過性に含有する。

10

#### 【0124】

別の実施態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、それによりB o N T / A がタンパク質分解によりS N A P - 2 5基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な構成要素をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。別の実施態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、それによりB o N T / A がタンパク質分解によりS N A P - 2 5基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な複数の構成要素をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。この実施態様の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞はF G F R 2、F G F R 3、S V 2またはS N A P - 2 5をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。この実施態様の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：1 3 0、配列番号：1 3 1、配列番号：1 3 2、配列番号：1 3 3、配列番号：1 3 4、配列番号：1 3 5、配列番号：1 3 6、配列番号：1 3 7または配列番号：1 3 8のF G F R 2をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。この実施態様のその他の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は配列番号：1 3 9、配列番号：1 4 0または配列番号：1 4 1のF G F R 3をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。この実施態様のなおその他の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：1 4 2、配列番号：1 4 3または配列番号：1 4 4のS V 2をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。この実施態様のなおその他の態様では、B o N T / A 中毒に感受性が高い確立された細胞株からの細胞は、配列番号：1 4 5または配列番号：1 4 6のS N A P - 2 5をコードするポリヌクレオチド分子を安定して含有する。

20

#### 【0125】

前記で言及したように、それによりB o N T / A がタンパク質分解により例えば本明細書に開示されるS N A P - 2 5、F G F R 2、F G F R 3またはS V 2のようなS N A P - 2 5基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な、外因性構成要素を細胞に導入することができる。かかる外因性構成要素を分配剤と共に細胞集団に導入するために有用な任意のおよび全ての方法は、この方法が所定の細胞集団内の細胞の少なくとも50%に本明細書に開示される外因性構成要素を一過性に導入するという条件で有用であり得る。故にこの実施態様の態様は所定の細胞集団の例えば少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%が、それによりB o N T / A がタンパク質分解により例えば本明細書に開示されるS N A P - 2 5、F G F R 2、F G F R 3またはS V 2のようなS N A P - 2 5基質を切断する全体的な細胞メカニズムを行うために細胞に必要な外因性構成要素を一過性に含有する細胞集団を含み得る。本明細書で使用される際には「分配剤」なる用語は、共有結合で連結された、

30

40

50

非共有結合で連結された、または任意のその他の様式で随伴されたポリペプチドの細胞への内部移行を可能に、または増強する任意の分子を指す。故に「分配剤」なる用語は、限定するものではないが、タンパク質。ペプチド、ペプチド擬似物質、小型分子、ポリヌクレオチド分子、リポソーム、脂質、ウイルス、レトロウイルスおよび限定するものではないが、共有結合で、または非共有結合で連結された分子を細胞膜、細胞の細胞質または核に輸送する細胞を包含する。「分配剤」なる用語が受容体媒介エンドサイトーシスを介して機能する分配剤および受容体媒介エンドサイトーシスとは独立しているものを含む任意のメカニズムにより内部移行する分子を包含することはさらに理解される。

## 【0126】

分配剤は例えれば化学的抱合または遺伝子的に生成された融合タンパク質によるよう、10  
共有結合で連結されたF G F R 2、F G F R 3、S V 2またはS N A P - 2 5 様の構成要素の細胞取り込みを可能に、または増強する薬剤でもよい。分配剤に共有結合で連結する方法およびかかる薬剤を使用する方法は例えば「タンパク質形質導入系およびその使用方法」Steven F. Dowdy、国際公開第W O 0 0 / 3 4 3 0 8号；「活性分子の細胞内アドレッシングのためのベクターとして使用することができるペプチド」Gerard ChassaingおよびAlain Prochiantz、米国特許第6 0 8 0 7 2 4号；「T A T由来の輸送部分を含んでなる融合タンパク質」Alan Frankelら、米国特許第5 6 7 4 9 8 0号；「T A T由来の輸送ポリペプチド抱合体」Alan Frankelら、米国特許第5 7 4 7 6 4 1号；「T A T由来の輸送ポリペプチドおよび融合タンパク質」Alan Frankelら、米国特許第5 8 0 4 6 0 4号；「輸送タンパク質の使用」Peter F. J. O'Hareら、米国特許第6 7 3 4 1 6 7号；「生物学的に活性な分子の細胞への移入のための方法」Yao - Zhong LinおよびJack J. Hawiger、米国特許第5 8 0 7 7 4 6号；「生物学的に活性な分子の細胞への移入のための方法」Yao - Zhong LinおよびJack J. Hawiger、米国特許第6 0 4 3 3 3 9号；「細胞膜転位置活性を有するタンパク質の遺伝子操作のための配列および方法」Yao - Zhong Linら、米国特許第6 2 4 8 5 5 8号；「細胞膜転位置活性を有するタンパク質の遺伝子操作のための配列および方法」Yao - Zhong Linら、米国特許第6 4 3 2 6 8 0号；「生物学的に活性な分子の細胞への移入のための方法」Jack J. Hawigerら、米国特許第6 4 9 5 5 1 8号；「細胞膜転位置活性を有するタンパク質の遺伝子操作のための配列および方法」Yao - Zhong Linら、米国特許第6 7 8 0 8 4 3号；「生物学的膜をわたる輸送を増強するための方法および組成物」Jonathan B. RothbardおよびPaul A Wender、米国特許第6 3 0 6 9 9 3号；「生物学的膜をわたる輸送を増強するための方法および組成物」Jonathan B. RothbardおよびPaul A Wender、米国特許第6 4 9 5 6 6 3号；ならびに「タンパク質分配のための融合タンパク質」Pamela B. Davisら、米国特許第6 2 8 7 8 1 7号（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。

## 【0127】

分配剤はF G F R 2、F G F R 3、S V 2またはS N A P - 2 5 様の非共有結合で随伴された構成要素の細胞取り込みを可能に、または増強する薬剤でもよい。共有結合連結の不在下で機能する方法およびかかる薬剤を使用する方法は例えば「ペプチド媒介トランスフェクション剤および使用の方法」Gilles Divitaら、米国特許第6 8 4 1 5 3 5号；「細胞内タンパク質分配組成物および使用の方法」Philip L FelgnerおよびOlivier Zelphati、米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 0 0 8 8 1 3号；ならびに「小型分子、タンパク質および核酸の細胞内分配」Michael Karas、米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 2 0 9 7 9 7号（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。かかるペプチド分配剤を標準的な方法により調製および使用することができ、そして市販により入手可能であり、例えばCHARIOT（商標）試薬（Active Motif, Carlsbad, CA）；BIO - PORTER（登録商標）試薬（Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA）、BIO TREK（商標）タンパク質分配試薬（Stratagene, La Jolla, CA）およびPRO - JECT（商標）タンパク質トランスフェクション試薬（Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL）を参照されたい。

## 【0128】

10

20

30

40

50

本開示の態様は一部では B o N T / A を含んでなる試料を含んでなる。本明細書で使用される際には「B o N T / A を含んでなる試料」なる用語は活性な B o N T / A を含有するかまたは潜在的に含有する任意の生物学的物質を指す。限定するものではないが、精製された、部分的に精製されたまたは未精製の B o N T / A ; 天然または非天然発生配列を有する組換え一本鎖または二鎖毒素；修飾されたプロテアーゼ特異性を有する組換え B o N T / A ; 改変された細胞特異性を有する組換え B o N T / A ; バルク B o N T / A ; 例えれば BOTOX (登録商標) 、 DYSKORT (登録商標) / RELOXIN (登録商標) 、 XEOMIN (登録商標) 、 PURTOX (登録商標) 、 NEURONOX (登録商標) 、 B T X - A を含む処方された B o N T / A 生成物、および；例えば細菌、酵母、昆虫または哺乳動物供給源からの細胞または粗製、分画化もしくは部分的に精製された細胞ライゼート；血液、血漿または血清；生の、調理された、部分的に調理されたまたは加工された食物；飲料；動物飼料；土壤試料；水試料；池底質；ローション；化粧品；ならびに臨床処方物を含む種々の試料を本明細書に開示される方法に従って検定することができる。試料なる用語は限定するものではないが、哺乳動物組織試料、ヒツジ、ウシおよびブタ組織試料のような家畜組織試料；靈長類組織試料；ならびにヒト組織試料を含む組織試料を包含することは理解される。かかる試料は限定するものではないが、乳児腸試料のような腸試料、および創傷から得られた組織試料を包含する。非限定例としては、ピコモル濃度量の B o N T / A 活性を検出する方法は、食物もしくは飲料試料中の B o N T / A の存在もしくは活性を決定するために；例えれば B o N T / A に暴露された、または 1 つもしくはそれより多いボツリヌス症の病徵を有するヒトもしくは動物からの試料を検定するために；バルク B o N T / A の生成および精製の間の活性を追跡するために；医薬用もしくは化粧用適用において使用される処方された B o N T / A 生成物を検定するために；または - B o N T / A 中和抗体の存在または不在に関して対象の血清を検定するために；有用であり得る。

10

20

30

40

#### 【 0 1 2 9 】

故に実施態様では、 B o N T / A を含んでなる試料は任意の量の B o N T / A を含んでなる試料である。この実施態様の態様では、 B o N T / A を含んでなる試料は約 1 0 0 n g 以下、約 1 0 n g 以下、約 1 n g 以下、約 1 0 0 p g 以下、約 1 0 p g 以下または約 1 p g 以下の B o N T / A を含んでなる。この実施態様のその他の態様では、 B o N T / A を含んでなる試料は約 1 μ M 以下、約 1 0 0 n M 以下、約 1 0 n M 以下、約 1 n M 以下、約 1 0 0 p M 以下、約 1 0 p M 以下、約 1 p M 以下、約 1 0 0 f M 以下、約 1 0 f M 以下または約 1 f M 以下の B o N T / A を含んでなる。

#### 【 0 1 3 0 】

本開示の態様は一部では処理された細胞から、 B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離することを含んでなる。本明細書で使用される際には「B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素」なる用語は、 S N A P - 2 5 切断生成物を含有する細胞構成要素を指す。限定するものではないが、細胞溶解プロトコール、スピニカラム精製プロトコール、免疫沈降、アフィニティー精製およびタンパク質クロマトグラフィーを含む、 S N A P - 2 5 構成要素を富化または単離するために適当な任意の方法が有用であり得るということは想定される。

#### 【 0 1 3 1 】

本開示の態様は一部では固相支持体に連結された - S N A P - 2 5 抗体を含んでなる。本明細書で使用される際には「固相支持体」なる用語は「固相」と同義であり、そして本明細書において開示される - S N A P - 2 5 抗体の固定のために使用することができる任意のマトリックスを指す。固相支持体の非限定例には、例えはチューブ；プレート；カラム；ピンまたは「ディップスティック」；磁性粒子、ビーズまたは例えはアガロース、セファロース、シリカおよびプラスチックのようなその他の球状もしくは纖維状のクロマトグラフィー媒質；ならびに例えはニトロセルロースおよびポリフッ化ビニリデン ( P V D F ) のようなシートまたは膜が含まれる。例えはガラス、炭素、ポリスチレン、塩化

50

ポリビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、ジアゾセルロースまたはデンプンのような多様な材料を使用して固相支持体を構築することができる。選択される固相支持体は、可溶性または未結合材料からそれを容易に分離させる物理学的特性を有し得て、そして一般に例えば過剰の試薬、反応副産物または溶媒のような未結合材料を（例えば洗浄、濾過、遠心等により）固相支持体結合アッセイ構成要素から分離またはそうでなければ除去することを可能にする。固相支持体の作成および使用の仕方の非限定例は例えばMolecular Cloning, A Laboratory Manual, supra, (2001)；およびCurrent Protocols in Molecular Biology, supra, (2004)（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に記載される。

## 【0132】

10

本開示の態様は一部ではB o N T / A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5抗体およびB o N T / A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出することを含んでなる。シグナル対ノイズ比がバックグラウンドシグナルからの、抗体 - 抗原複合体からのシグナルを統計的に有意な程度まで区別することができるという条件で、任意の検出系を使用してこの開示された免疫基盤の方法の態様を実行できるということは想定される。免疫基盤の検出系の非限定例には、ウェスタンプロットティングおよびドットプロットティング様の免疫プロット分析、免疫沈降分析、酵素結合性免疫吸着分析（E L I S A）およびサンドイッチE L I S Aが含まれる。撮像またはリン光体撮像を伴うオートラジオグラフィー（A U）、化学発光（C L）、電気化学発光（E C L）、生物発光（B L）、蛍光、共鳴エネルギー転移、平面偏光、比色分析またはフローサイトメトリー（F C）を用いてシグナルの検出を達成することができる。免疫基盤の検出系の記載は例えば「化学発光」Michael M.Ra uhut, Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (Ed. Grayson, 3rd ed, John Wiley and Sons, 1985)；「電気化学発光の分析適用における最近の動向の概説」A. W. Knight, Trends Anal. Chem. 18 (1) : 47 - 62 (1999)；「化学分析における電気化学発光の最近の適用」K.A.Fahnrich et al. Talanta 54 (4) : 531 - 559 (2001)；「分子クローニングにおいて一般的に使用される技術」pp. A8.1 - A8 - 55 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3<sup>rd</sup> ed. 2001)；「検出系」pp. A9.1 - A9 - 49 (Sambrook & Russell, eds., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3<sup>rd</sup> ed. 2001)；Electrogenerated Chemiluminescence (Ed. Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004)（その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）に開示される。

20

30

30

## 【0133】

40

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

50

I S A を実施するために必要な試薬およびプロトコールは市販により入手可能である。

【 0 1 3 4 】

故に実施態様では、B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在の検出を、免疫プロット分析、免疫沈降分析、E L I S A またはサンドイッチ E L I S A を使用して実施することができる。この実施態様の態様では、A U、C L、E C L もしくは B L 免疫プロット分析、A U、C L、E C L、B L もしくは F C 免疫沈降分析、A U、C L、E C L、B L もしくは F C E L I S A 、または A U、C L、E C L、B L もしくは F C サンドイッチ E L I S A を使用して検出を実施する。

10

【 0 1 3 5 】

シングルプレックスまたはマルチプレックス様式で本開示の態様を実行することができる。シングルプレックス様式で実行される B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法は、- S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在のみを検出するものである。マルチプレックス様式で実行される B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法は、1つまたはそれより多い抗体 - 抗原複合体の存在を同時発生的に検出するものであり；その1つは - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体であり；そして（複数の）その他のものは第2、第3、第4等の異なるタンパク質に対する抗体 - 抗原複合体である。例えば検出される - S N A P - 2 5 / S N A P - 2 5 抗体 - 抗原複合体の量を、第2のタンパク質に関して検出される抗体 - 抗原複合体の量に対して正規化することにより試料対試料変動性を最小化する内部対照として第2のタンパク質を使用することができる。そのように、第2のタンパク質は通常ハウスキーピングタンパク質のような、細胞により一貫して発現されるものである。有用な第2のタンパク質の非限定例には、例えばグリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H )、シンタキシン、サイトカインが含まれる。マルチプレックス様式で免疫基盤のアッセイを実施する方法は例えば「マイクロアレイ形式のマルチプレックスサンドイッチアッセイ」U. B. Nielsen and B. H. Geierstanger, J. Immunol. Methods. 290 (1 - 2) : 107 - 120 (2004) ; 「抗体アレイを使用する定量的タンパク質プロファイリング」R. Barry and M. Soloviev, Proteomics, 4 (12) : 3717 - 3726 (2004) ; 「マルチプレックス分子診断学およびエマージングマイクロアレイテクノロジーを用いるイムノアッセイ」M. M. Ling et al., Expert Rev Mol Diagn. 7 (1) : 87 - 98 (2007) ; 「炎症および加齢研究におけるサイトカイン測定のための E L I S A およびマルチプレックステクノロジー」S. X. Leng et al., J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63 (8) : 879 - 884 (2008) (その各々をその全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする) に記載される。

20

【 0 1 3 6 】

故に1つの実施態様では、B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法を、- S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在のみを検出することによりシングルプレックス様式で実行する。別の実施態様では、B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法を、- S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 切断生成物および例えば G A P D H またはシンタキシンのような S N A P - 2 5 以外のタンパク質に対する少なくとも1つのその他の抗体 - 抗原複合体を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を同時発生的に検出することによりマルチプレックス様式で実行する。

30

【 0 1 3 7 】

本開示の態様は一部では B o N T / A 免疫抵抗性を決定する方法を提供する。本明細書

40

50

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

#### 【0138】

本開示の態様は一部では、 - B o N T / A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られる被験試料を提供する。本明細書で使用される際には「被験試料」なる用語は、少なくとも1つの - B o N T / A 抗体を含有するか、または潜在的に含有する任意の生物学的物質を指す。 - B o N T / A 抗体は抗B o N T / A 中和抗体または抗B o N T / A 非中和抗体でよい。本明細書で使用される際には「抗B o N T / A 中和抗体」なる用語は、生理学的条件下で毒素がB o N T / A 治療におけるその効果を奏すことを低減または防御するような様式でB o N T / A 毒素の領域に結合するであろう任意の

- B o N T / A 抗体を意味する。本明細書で使用される際には「 - B o N T / A 非中和抗体」なる用語は、生理学的条件下でB o N T / A 毒素の領域に結合するが、毒素がB o N T / A 治療におけるその効果を奏することを防衛しないであろう任意の - B o N T / A 抗体を意味する。限定するものではないが、血液、血漿、血清およびリンパ液を含む

- B o N T / A 抗体を含有し得る任意のおよび全ての試料をこの方法において使用することができるということは想定される。加えて限定するものではないが、鳥類ならびにマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ロバ、ウシ、靈長類およびヒトを含む哺乳動物を含む、B o N T / A 毒素に対して - B o N T / A 抗体を上昇させることができが可能な任意のおよび全ての生物が試料のための供給源として役立ち得る。血液収集および血清調製のための具体的なプロトコールの非限定例は、例えばMarjorie Schaub Di Lorenzo & Susan King Strasinger, BLOOD COLLECTION IN HEALTHCARE (F.A. Davis Company, 2001) ; およびDiana Garza & Kathleen Beagan - McBride, PHLEBOTOMY HANDBOOK : BLOOD COLLECTION ESSENTIALS (Prentice Hall, 6<sup>th</sup> ed., 2002) に記載される。これらのプロトコールは日常的な手順であり、十分に当業者の、およびは本明細書の教示からの範囲内である。B o N T / A 毒素に対する暴露の前、単回のB o N T / A 処置の後、多回のB o N T / A 毒素処置の後、B o N T / A 治療に対する抵抗性の発症の前、またはB o N T / A 治療に対する抵抗性の発症の後に生物から被験試料を入手することができる。

#### 【0139】

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

10

20

30

40

50

セイで試験して陽性である個体；および超免疫性を示す個体、例えばB o N T / Aワクチン接種された個体を含む。

【0140】

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

10

【0141】

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

20

【0142】

本開示の態様は一部では工程(d)で検出されたB o N T / A 切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5の量を工程(e)で検出されたB o N T / A 切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5の量と比較することを提供する。実施態様では被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量は、対照試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量と比較して高い。この実施態様の態様では、陽性対照試料と比較して、被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量が多いことは、哺乳動物におけるB o N T / A免疫抵抗性の低減または欠如を示す。この実施態様の別の態様では、陰性対照試料と比較して被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量が均等であることは、哺乳動物におけるB o N T / A免疫抵抗性の低減または欠如を示す。別の実施態様では、対照試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量と比較して、被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量が少ない。この実施態様の態様では、陽性対照試料と比較して、被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量が少ないかまたは均等であることは、哺乳動物におけるB o N T / A免疫抵抗性の増大または存在を示す。この実施態様の別の態様では、陰性対照試料と比較して、被験試料中のS N A P - 2 5切断生成物の量が少ないことは、哺乳動物におけるB o N T / A免疫抵抗性の増大または存在を示す。

40

【0143】

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

50

様では、B o N T / A のアッセイ量は律速である。この実施態様の別の態様では、被験試料のアッセイ量は律速である。

【 0 1 4 4 】

本開示の態様をまた以下のようにも記載できる：

1. B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原に連結された可動性リンカーに連結された担体を含んでなる組成物。

【 0 1 4 5 】

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

【 0 1 4 6 】

3. S N A P - 2 5 抗原が配列番号： 1 4 7 を含んでなる 1 の組成物。

10

【 0 1 4 7 】

4. 可動性リンカーおよび S N A P - 2 5 抗原アミノ酸配列が配列番号： 3 8 または配列番号： 4 6 である 1 の組成物。

【 0 1 4 8 】

5. S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する単離された - S N A P - 2 5 抗体。

20

【 0 1 4 9 】

6. - S N A P - 2 5 抗体が S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含まないエピトープに関して  $1 \times 1 0^{-1} M$   $\cdot^{-1} s^{-1}$  未満の会合速度定数を有し；そして - S N A P - 2 5 抗体がエピトープに関して  $0.450 nM$  未満の平衡解離定数を有する 5 の単離された - S N A P - 2 5 抗体。

.

【 0 1 5 0 】

7. 単離された - S N A P - 2 5 抗体が配列番号： 7 2 、配列番号： 7 4 、配列番号： 7 6 、配列番号： 8 0 および配列番号： 8 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変領域；ならびに配列番号： 8 4 、配列番号： 8 6 、配列番号： 8 8 、配列番号： 9 0 および配列番号： 9 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変領域を有する 5 の単離された - S N A P - 2 5 抗体。

30

【 0 1 5 1 】

8. 単離された - S N A P - 2 5 抗体が少なくとも配列番号： 9 3 の V<sub>H</sub> C D R 1 、配列番号： 9 4 の V<sub>H</sub> C D R 1 、配列番号： 9 5 の V<sub>H</sub> C D R 1 、配列番号： 1 1 8 の V<sub>H</sub> C D R 1 、配列番号： 1 1 9 の V<sub>H</sub> C D R 1 または配列番号： 1 2 0 の V<sub>H</sub> C D R 1 を含んでなる 5 の単離された - S N A P - 2 5 抗体。

.

【 0 1 5 2 】

9. 単離された - S N A P - 2 5 抗体が少なくとも配列番号： 9 6 の V<sub>H</sub> C D R 2 、配列番号： 9 7 の V<sub>H</sub> C D R 2 、配列番号： 9 8 の V<sub>H</sub> C D R 2 、配列番号： 9 9 の V<sub>H</sub> C D R 2 、配列番号： 1 2 1 の V<sub>H</sub> C D R 2 、配列番号： 1 2 2 の V<sub>H</sub> C D R 2 または配列番号： 1 2 3 の V<sub>H</sub> C D R 2 を含んでなる 5 の単離された - S N A P - 2 5 抗体。

40

【 0 1 5 3 】

10. 単離された - S N A P - 2 5 抗体が少なくとも配列番号： 1 0 0 の V<sub>H</sub> C D R 3 、配列番号： 1 0 1 の V<sub>H</sub> C D R 3 、配列番号： 1 0 2 の V<sub>H</sub> V<sub>H</sub> C D R 3 または配列番号： 1 2 4 の V<sub>H</sub> C D R 3 を含んでなる 5 の単離された - S N A P - 2 5 抗体。

.

【 0 1 5 4 】

11. 単離された - S N A P - 2 5 抗体が少なくとも配列番号： 1 0 3 の V<sub>L</sub> C D R 1 、配列番号： 1 0 4 の V<sub>L</sub> C D R 1 、配列番号： 1 0 5 の V<sub>L</sub> C D R 1 、配列番号： 1 0 6 の V<sub>L</sub> C D R 1 、配列番号： 1 0 7 の V<sub>L</sub> C D R 1 、配列番号： 1 2 5 の V<sub>L</sub> C D R 1 、配列番号： 1 2 6 の V<sub>L</sub> C D R 1 、配列番号： 1 2 7 の V<sub>L</sub> C D R 1 、配列番号： 1 2 8 の V<sub>L</sub> C D R 1 または配列番号： 1 2 9 の V<sub>L</sub> C D R 1 を含んでなる 5 の単離された

50

- S N A P - 2 5 抗体。

【 0 1 5 5 】

12. 単離された - S N A P - 2 5 抗体が少なくとも配列番号：108のV<sub>L</sub> C D R 2、配列番号：109のV<sub>L</sub> C D R 2、配列番号：110のV<sub>L</sub> C D R 2、配列番号：111のV<sub>L</sub> C D R 2または配列番号：112のV<sub>L</sub> C D R 2を含んでなる5の単離された - S N A P - 2 5 抗体。

【 0 1 5 6 】

13. 単離された - S N A P - 2 5 抗体が少なくとも配列番号：113のV<sub>L</sub> C D R 3、配列番号：114のV<sub>L</sub> C D R 3、配列番号：115のV<sub>L</sub> C D R 3、配列番号：116のV<sub>L</sub> C D R 3または配列番号：117のV<sub>L</sub> C D R 3を含んでなる5の単離された - S N A P - 2 5 抗体。 10

【 0 1 5 7 】

14. 単離された - S N A P - 2 5 抗体が配列番号：93、配列番号：121および配列番号：100を含んでなる重鎖可変領域；ならびに配列番号：105、配列番号：110および配列番号：115を含んでなる軽鎖可変領域を含んでなる5の単離された - S N A P - 2 5 抗体。

【 0 1 5 8 】

15. 単離された - S N A P - 2 5 抗体が配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：147または配列番号：148のS N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する5の単離された - S N A P - 2 5 抗体。 20

【 0 1 5 9 】

16. 単離された - S N A P - 2 5 抗体が配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43または配列番号：44のS N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する5の単離された - S N A P - 2 5 抗体。

【 0 1 6 0 】

17. (a) 確立された細胞株からの細胞をB o N T / Aを含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞はB o N T / AによるB o N T / A中毒に感受性が高い；(b) 処理された細胞からB o N T / A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5 切断生成物を含んでなるS N A P - 2 5 構成要素を単離すること；(c) S N A P - 2 5 構成要素を - S N A P - 2 5 抗体と接触させること、ここで - S N A P - 2 5 抗体はS N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；ならびに(d) - S N A P - 2 5 抗体およびS N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体 - 抗原複合体による検出はB o N T / A活性の指標である；の工程を含んでなるB o N T / A活性を検出する方法。 30

【 0 1 6 1 】

18. (a) 確立された細胞株からの細胞をB o N T / Aを含んでなる試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞はB o N T / AによるB o N T / A中毒に感受性が高い；(b) 処理された細胞からB o N T / A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するS N A P - 2 5 切断生成物を含んでなるS N A P - 2 5 構成要素を単離すること；(c) S N A P - 2 5 構成要素を固相支持体に連結された - S N A P - 2 5 抗体と接触させること、ここで - S N A P - 2 5 抗体はS N A P - 2 5 切断生成物からのB o N T / A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；ならびに(d) - S N A P - 2 5 抗体およびS N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体 - 抗原複合体による検出はB o N T / A活性の指標である；の工程を含んでなるB o N T / A活性を検出する方法。 40

【 0 1 6 2 】

19. (a) 確立された細胞株からの細胞をB o N T / Aを含んでなる試料で処理する

10

20

30

40

50

こと、ここで確立された細胞株からの細胞はB<sub>o</sub>NT/AによるB<sub>o</sub>NT/A中毒に感受性が高い；(b)処理された細胞からB<sub>o</sub>NT/A切断部位切斷可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25切斷生成物を含んでなるSNAP-25構成要素を単離すること；(c)SNAP-25構成要素を固相支持体に固定すること；(d)SNAP-25構成要素を-SNAP-25抗体と接触させること、ここで-SNAP-25抗体はSNAP-25切斷生成物からのB<sub>o</sub>NT/A切断部位切斷可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；ならびに(e)-SNAP-25抗体およびSNAP-25切斷生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；ここで抗体-抗原複合体による検出はB<sub>o</sub>NT/A活性の指標である；の工程を含んでなるB<sub>o</sub>NT/A活性を検出する方法。

10

## 【0163】

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

20

## 【0164】

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

30

## 【0165】

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

40

## 【0166】

23.(a)-B<sub>o</sub>NT/A中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料にB<sub>o</sub>NT/Aを添加すること；(b)確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞はB<sub>o</sub>NT/A中毒に感受性が高い；(c)処理された細胞からB<sub>o</sub>NT/A切断部位切斷可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25切斷生成物を含んでなるSNAP-25構成要

50

素を単離すること；(d) S N A P - 2 5 構成要素を - S N A P - 2 5 抗体と接觸させること、ここで - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；(e) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；(f) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b - e を繰り返すことであって、陰性対照試料は B o N T / A および、 - B o N T / A 中和抗体を含有しないことが解っている血清を含んでなる；ならびに(g) 工程 e で検出された抗体 - 抗原複合体の量を工程 f で検出された抗体 - 抗原複合体の量と比較すること、ここで工程 f で検出された抗体 - 抗原複合体の量に相対して工程 e で検出された抗体 - 抗原複合体のより少ない検出量は - B o N T / A 中和抗体の存在の指標である；の工程を含んでなる哺乳動物における B o N T / A 免疫抵抗性を決定する方法。

10

20

30

40

50

## 【0167】

24. (a) - B o N T / A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料に B o N T / A を添加すること；(b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T / A 中毒に感受性が高い；(c) 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離すること；(d) S N A P - 2 5 構成要素を固相支持体に連結された - S N A P - 2 5 抗体と接觸させること、ここで - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；(e) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；(f) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b - e を繰り返すことであって、陰性対照試料は B o N T / A および、 - B o N T / A 中和抗体を含有しないことが解っている血清を含んでなる；ならびに(g) 工程 e で検出された抗体 - 抗原複合体の量を工程 f で検出された抗体 - 抗原複合体の量と比較すること、ここで工程 f で検出された抗体 - 抗原複合体の量に相対して工程 e で検出された抗体 - 抗原複合体のより少ない検出量は - B o N T / A 中和抗体の存在の指標である；の工程を含んでなる哺乳動物における B o N T / A 免疫抵抗性を決定する方法。

## 【0168】

25. (a) - B o N T / A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料に B o N T / A を添加すること；(b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T / A 中毒に感受性が高い；(c) 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離すること；(d) S N A P - 2 5 構成要素を固相支持体に固定すること；(e) S N A P - 2 5 構成要素を - S N A P - 2 5 抗体と接觸させること、ここで - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；(f) - S N A P - 2 5 抗体および S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること；(g) 被験試料の代わりに陰性対照試料で工程 b - f を繰り返すことであって、陰性対照試料は B o N T / A および、 - B o N T / A 中和抗体を含有しないことが解っている血清を含んでなる；ならびに(h) 工程 f で検出された抗体 - 抗原複合体の量を工程 g で検出された抗体 - 抗原複合体の量に相対して工程 f で検出された抗体 - 抗原複合体のより少ない検出量は - B o N T / A 中和抗体の存在の指標である；の工程を含んでなる哺乳動物における B o N T / A 免疫抵抗性を決定する方法。

## 【0169】

26. (a) - B o N T / A 中和抗体の存在または不在に関して試験中の哺乳動物から得られた被験試料に B o N T / A を添加すること；(b) 確立された細胞株からの細胞を被験試料で処理すること、ここで確立された細胞株からの細胞は B o N T / A を取り込

むことができる；(c)処理された細胞からB<sub>o</sub>NT/A切断部位切斷可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25切斷生成物を含んでなるSNAP-25構成要素を単離すること；(d)SNAP-25構成要素を-SNAP-25抗体と接触させること、ここで-SNAP-25抗体はSNAP-25切斷生成物からのB<sub>o</sub>NT/A切断部位切斷可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する；(e)-SNAP-25抗体およびSNAP-25切斷生成物を含んでなる抗体-抗原複合体の存在を検出すること；(f)被験試料の代わりに陰性対照試料で工程b-eを繰り返すことであって、陰性対照試料はB<sub>o</sub>NT/Aおよび、-B<sub>o</sub>NT/A中和抗体を含有しないことが解っている血清を含んでなる；ならびに(g)工程eで検出された抗体-抗原複合体の量を工程fで検出された抗体-抗原複合体の量と比較すること、ここで工程fで検出された抗体-抗原複合体の量に相対して工程eで検出された抗体-抗原複合体のより少ない検出量は-B<sub>o</sub>NT/A中和抗体の存在の指標である；の工程を含んでなる哺乳動物におけるB<sub>o</sub>NT/A免疫抵抗性を決定する方法。

## 【0170】

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

## 【0171】

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

## 【0172】

10

20

30

40

50

29. 細胞が B o N T / A 約 5 0 0 p M 以下による、約 4 0 0 p M 以下による、約 3 0 0 p M 以下による、約 2 0 0 p M 以下による、約 1 0 0 p M 以下による B o N T / A 中毒に感受性が高い 1 7 - 2 2 および 2 3 - 2 5 の方法。

【 0 1 7 3 】

30. 細胞が約 5 0 0 p M 以下、約 4 0 0 p M 以下まで、約 3 0 0 p M 以下まで、約 2 0 0 p M 以下まで、約 1 0 0 p M 以下までの B o N T / A を取り込むことができる 2 0 - 2 2 および 2 6 - 2 8 の方法。

【 0 1 7 4 】

31. 試料が約 1 0 0 n g 以下、約 1 0 n g 以下、約 1 n g 以下、1 0 0 f g 以下、1 0 f g 以下または 1 f g 以下の B o N T / A を含んでなる 1 7 - 2 2 の方法。 10

【 0 1 7 5 】

32. 試料が約 1 0 0 n M 以下、約 1 0 n M 以下、約 1 n M 以下、約 1 0 0 p M 以下、約 1 0 p M 以下、約 1 p M 以下、約 1 0 0 f M 以下、約 1 0 f M 以下または約 1 f M 以下の B o N T / A を含んでなる 1 7 - 2 2 の方法。

【 0 1 7 6 】

33. - S N A P - 2 5 抗体が 5 - 1 6 の単離された - S N A P - 2 5 抗体である 1 7 - 2 8 の方法。

【 0 1 7 7 】

34. 抗体 - 抗原複合体の存在が免疫プロット分析、免疫沈降分析、E L I S A またはサンドイッチ E L I S A により検出される 1 7 - 2 8 の方法。 20

【 0 1 7 8 】

35. 免疫基盤の方法が下の漸近線 (the lower asymptote) に関して少なくとも 3 : 1 、少なくとも 5 : 1 、少なくとも 1 0 : 1 、少なくとも 2 0 : 1 、少なくとも 5 0 : 1 または少なくとも 1 0 0 : 1 のシグナル対ノイズ比を有する 1 7 - 2 8 の方法。

【 0 1 7 9 】

36. 免疫基盤の方法が上の漸近線 (the higher asymptote) に関して少なくとも 1 0 : 1 、少なくとも 2 0 : 1 、少なくとも 5 0 : 1 、少なくとも 1 0 0 : 1 、少なくとも 2 0 0 : 1 、少なくとも 3 0 0 : 1 、少なくとも 4 0 0 : 1 、少なくとも 5 0 0 : 1 または少なくとも 6 0 0 : 1 のシグナル対ノイズ比を有する 1 7 - 2 8 の方法。 30

【 0 1 8 0 】

37. 免疫基盤の方法が例えば少なくとも 1 0 0 n g 、少なくとも 5 0 n g 、少なくとも 1 0 n g 、少なくとも 5 n g 、少なくとも 1 0 0 p g 、少なくとも 5 0 p g 、少なくとも 1 0 p g 、少なくとも 5 p g 、少なくとも 1 0 0 f g 、少なくとも 5 0 f g 、少なくとも 1 0 f g または少なくとも 5 f g の E C<sub>50</sub> 活性を検出することができる 1 7 - 2 8 の方法。

【 0 1 8 1 】

38. 免疫基盤の方法が例えば少なくとも 1 0 n M 、少なくとも 5 n M 、少なくとも 1 0 0 p M 、少なくとも 5 0 p M 、少なくとも 1 0 p M 、少なくとも 5 p M 、少なくとも 1 0 0 f M 、少なくとも 5 0 f M 、少なくとも 1 0 f M 、少なくとも 5 f M または少なくとも 1 f M の E C<sub>50</sub> 活性を検出することができる 1 7 - 2 8 の方法。 40

【 0 1 8 2 】

39. 免疫基盤の方法が例えば 1 0 p g 以下、9 p g 以下、8 p g 以下、7 p g 以下、6 p g 以下、5 p g 以下、4 p g 以下、3 p g 以下、2 p g 以下、1 p g 以下の B o N T / A の L O D を有する 1 7 - 2 8 の方法。

【 0 1 8 3 】

40. 免疫基盤の方法が例えば 1 0 0 f M 以下、9 0 f M 以下、8 0 f M 以下、7 0 f M 以下、6 0 f M 以下、5 0 f M 以下、4 0 f M 以下、3 0 f M 以下、2 0 f M 以下または 1 0 f M 以下の B o N T / A の L O D を有する 1 7 - 2 8 の方法。

【 0 1 8 4 】

41. 免疫基盤の方法が例えば 1 0 p g 以下、9 p g 以下、8 p g 以下、7 p g 以下、

50

6 p g 以下、5 p g 以下、4 p g 以下、3 p g 以下、2 p g 以下、1 p g 以下の B o N T / A の L O Q を有する 17 - 28 の方法。

【0185】

42. 免疫基盤の方法が例えば 100 f M 以下、90 f M 以下、80 f M 以下、70 f M 以下、60 f M 以下、50 f M 以下、40 f M 以下、30 f M 以下、20 f M 以下または 10 f M 以下の B o N T / A の L O Q を有する 17 - 28 の方法。

【0186】

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

10

【実施例 1】

【0187】

候補細胞株のスクリーニング

以下の実施例は B o N T / A 中毒に感受性が高い、または本明細書に開示される B o N T / A 活性を検出する方法に必要な B o N T / A 取り込み受容力を有する確立された細胞株を同定する仕方を例証する。

1. 候補細胞株のストック培養物の成長

細胞株を成長させるために、試験中の細胞株からの適当な密度の細胞を適当な成長培地 30 mL (表 1 参照) を含有する 162 cm<sup>2</sup> の組織培養フラスコに蒔き、そして 37 のインキュベーター中 5 % または 10 % 二酸化炭素下で、細胞が望ましい密度に到達するまで成長させた。

20

【0188】

【表1-1】

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

10

20

【表1-2】

SK-N-D Z SK-N-F 1	90%DMEM、10%熱不活化ウシ胎仔血清、4mMグルタミン、4mMグルコース、0.1mM非必須アミノ酸、1.5g/L NaHCO <sub>3</sub>	
BE(2)-C BE(2)-M 17 CHP-212 LA-1-55 n LA-N-1 MC-1XC SK-N-BE (2) SH-SY5Y	EMEM (11090-081, Gibco)、Ham's F12 (11765-054, Gibco)、10%熱不活化ウシ胎仔血清、2mMグルタミン、0.1mM非必須アミノ酸	10
NB4 1A3	Ham's F10 (12471-017, Gibco)、2.5%熱不活化ウシ胎仔血清、15%熱不活化ウマ血清、2mMグルタミン	
Neuro-2a	EMEM、10%熱不活化ウシ胎仔血清、2mMグルタミン、0.1mM非必須アミノ酸、1.5g/L NaHCO <sub>3</sub> 、1mMピルビン酸ナトリウム	20

【0189】

## 2. 1 nM Bont/Aを使用する候補細胞株の単回用量スクリーニング

細胞基盤のアッセイの感度を改善するために試験される1つのパラメーターは、クロストリジウム神経毒を取り込み、そして基質表面に接着する良好な受容力を呈する適当な細胞株を同定することであった。最初に細胞株を、1 nM Bont/Aを取り込むその能力および表面に付着するその能力に関して試験した。細胞株が1 nM Bont/Aを取り込むことができるかどうかを決定するために、試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を、適切な血清成長培地（表1）1 mLを含有する24ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた播種した。細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、細胞が望ましい密度に到達するまで成長させた（およそ18から24時間）。成長培地を各ウェルから吸引し、そして1) 毒素を含有しない新鮮成長培地（未処理細胞株）または2) 1 nM Bont/A複合体を含有する新鮮成長培地（処置細胞株）のいずれかで置き換えた。一晩インキュベートした後、成長培地を吸引し、そして各ウェルを1×PBS 200 μLで灌ぐことにより細胞を洗浄した。細胞を採取するために、1×PBSを吸引し、2×SDS負荷バッファー50 μLを添加することにより細胞を溶解し、ライゼートを清浄な試験管に移し、そして試料を95℃まで5分間加熱した。

【0190】

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

20) ソルビタンモノラウレアート)、2%ウシ血清アルブミン(B S A)、5%脱脂粉乳を含有する溶液中、室温で2時間インキュベートすることによりP V D F膜を遮断した。遮断された膜を1)一次抗体として-S N A P - 2 5マウスモノクローナル抗体(S M I - 8 1 ; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD)の1:5,000希釈;または2)一次抗体としてS 9 6 8 4 - S N A P - 2 5ウサギポリクローナル抗血清(Sigma, St. Louis, MO)の1:5,000希釈のいずれかを含有するT B S、0.1%T W EEN - 20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレアート)、2%B S Aおよび5%脱脂粉乳中、4で一晩インキュベートした。-S N A P - 2 5マウスモノクローナルおよびウサギポリクローナル抗体の双方はS N A P - 2 5未切斷基質およびS N A P - 2 5切斷生成物の双方を検出することができ、B o N T / A取り込みの量を評価するためのパラメーターとして、各細胞株における全体的なS N A P - 2 5発現およびB o N T / A処理後に切斷されたS N A P - 2 5のパーセントを評価することができる。一次抗体でプロービングされたプロットをT B S、TWEEN - 20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレアート)で、各回15分間で3回洗浄した。洗浄した膜を1)二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合されたヤギポリクローナル抗マウス免疫グロブリンG、重および軽鎖(I g G、H + L)抗体(Zymed, South San Francisco, CA)の1:10,000希釈;または2)二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合されたヤギポリクローナル抗ウサギ免疫グロブリンG、重および軽鎖(I g G、H + L)抗体(Zymed, South San Francisco, CA)の1:10,000希釈のいずれかを含有するT B S、0.1%TWEEN - 20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレアート)、2%B S Aおよび5%脱脂粉乳中で室温で2時間インキュベートした。二次抗体でプロービングされたプロットをT B S、0.1%TWE EN - 20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレアート)中、各回15分間で3回洗浄した。標識S N A P - 2 5生成物のシグナル検出をECL Plus(商標)ウェスタンプロット検出系(GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)を用いて可視化し、そして膜を撮像し、そして切斷されたパーセントをTyphoon 9410変数形式撮像装置および撮像装置分析ソフトウェア(GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)で定量化した。ピクセルサイズ(100から200ピクセル)およびP M T電圧設定(350から600、通常400)の選択は個々のプロットに依存した。表2は1nM B o N T / Aで処理したときにS N A P - 2 5切斷生成物が検出された細胞株を示す。以下の細胞株は1nM B o N T / Aの取り込みおよび基質表面への適切な付着の双方を呈した:B E (2) - M 1 7、I M R - 3 2、K e l l y、L A 1 - 5 5 n、N 1 E - 1 1 5、N 4 T G 3、N 1 8、Neuro - 2 a、N G 1 0 8 - 1 5、P C 1 2、S H - S Y 5 Y、S i M aおよびS K - N - B E (2) - C。

#### 【0191】

細胞株が表面に付着できるかどうかを決定するために、試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を、適切な成長培地(表1)1mLを含有する24ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。細胞を37のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、細胞が望ましい密度に到達するまで成長させた(およそ18から24時間)。播種された細胞の全数に相対して、組織プレートの底部ウェル表面に接着した細胞のパーセンテージにより細胞付着を評価した。細胞株C H P - 1 2 6、I M R - 3 2、L A - N - 1、M C - I X C、N G 1 1 5 - 4 0 1 L、S K - N - B E (2) - C、S K - N - F 1およびS K - N - M Cは50%未満の付着を呈したので(表2)、各細胞株は適当ではないと見なされた。試験された全てのその他の細胞株は適当な付着特徴を呈した(表2)。

10

20

30

40

【表2-1】

表2 1nM B oNT/Aを使用する候補細胞株の単回用量スクリーニング				
細胞株	記載	供給源	1nM B oNT/A取り込み	付着
BE(2)-C	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2268	なし	>60%
BE(2)-M17	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2267	あり	>60%
CHP-126	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 304	なし	<50%
CHP-212	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2273	なし	>60%
HCN-1a	大脳皮質ニューロン	ATCC CRL-10442	なし	>60%
HCN-2	大脳皮質ニューロン	ATCC CRL-10742	なし	>60%
IMR-32	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-127	あり	<50%
Kelly	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 92110411	あり	>60%
Kelly	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 355	あり	>60%
LA1-55n	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 06041203	あり	>60%
LA-N-1	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 06041201	—	<25%
MC-IXC	ヒト神経上皮腫	ATCC CRL-2270	—	<25%
MHH-NB-11	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 157	なし	>60%
N1E-115	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-2263	あり	>60%

10

20

30

40

【表2-2】

N4TG3	マウス神経芽細胞腫	DSMZ ACC 10 1	なし	>60%
N18TG2	マウス神経芽細胞腫	DSMZ ACC 10 3	なし	>60%
NB4 1A3	マウス神経芽細胞腫	ECACC 891214 05	なし	>60%
ND3	マウス神経芽細胞腫／一次新生仔ラットDRGハイブリッド	ECACC 920909 01	なし	>60%
ND7／23	マウス神経芽細胞腫／一次ラットDRGハイブリッド	ECACC 920909 03	なし	>60%
ND8	マウス神経芽細胞腫／一次新生仔ラットDRGハイブリッド	ATCC	なし	>60%
ND8／34	マウス神経芽細胞腫	ECACC 920909 04	なし	>60%
ND15	マウス神経芽細胞腫／一次新生仔ラットDRGハイブリッド	ECACC 920909 07	なし	>60%
ND27	マウス神経芽細胞腫／一次ラットDRGハイブリッド	ECACC 920909 12	なし	>60%
NB69	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 990728 02	なし	>60%
NDC	マウス神経芽細胞腫／一次新生仔ラットDRGハイブリッド	ECACC 920909 13	なし	>60%
Neuro-2a	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-1 31	あり	>60%
NG108-15	マウス神経芽細胞腫／ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 881123 02	あり	>60%
NG115-40 1L	マウス神経芽細胞腫／ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 870320 03	なし	<50%
NS20Y	マウス神経芽細胞腫	DSMZ ACC 94	なし	>60%
PC12	ラットクロム親和性細胞腫	ATCC CRL-1 721	あり	>60%
SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 266	あり	>60%
SiMa	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 16 4	あり	>60%

10

20

30

40

【表2-3】

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

10

20

## 【実施例2】

## 【0192】

候補細胞株における神経毒取り込みに関する成長条件の評価

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

1. 候補細胞株の神経毒取り込みに及ぼす細胞分化の効果

細胞分化が神経毒取り込みを改善したかどうかを決定するために、1 nM BoNT/Aの取り込みを呈する細胞株を血清不含培地に移して分化を誘起した。試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を、アール塩を伴う2 mM GlutaMAX(商標)I、0.1 mM 非必須アミノ酸、10 mM HEPES、1 mM ピルビン酸ナトリウム、100単位 / mL ペニシリンおよび100 µg / mL ストレプトマイシンを伴う最小必須培地を含有する血清不含培地1 mLを含有する24ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。これらの細胞を37 °Cのインキュベーター中5%二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで(およそ2から3日)インキュベートした。対照として、試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を適切な成長培地(表1)1 mLを含有する24ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。これらの未分化対照細胞を37 °Cのインキュベーター中5%二酸化炭素下で、細胞が望ましい密度に到達するまで(およそ18から24時間)成長させた。分化型および未分化型対照培養物の双方からの培地を各ウェルから吸引し、そして0(未処理試料)、0.1 nM、0.3 nMまたは1 nM BoNT/A複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。一晩インキュベートした後、実施例1に記載されるように細胞を洗浄し、そして採取した。

30

40

## 【0193】

S N A P - 2 5 切断生成物の存在を検出するために、採取された試料を12%26ウェルCriterionゲル(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を使用してS D S - P A G Eにより分離する以外は実施例1に記載されるように、各採取された試料からのアリコートをウェスタンプロットにより分析し、そしてウサギポリクローナル-S N A P - 2 5<sub>1,9,7</sub>抗体血清を一次抗体として使用した(実施例4参照)。表3は0.1 nM BoNT/Aで処理したときにS N A P - 2 5 切断生成物を呈した細胞株を示す。試験された細胞株のうち、SiMaおよびNeuro-2a細胞株のみが未分化状態で0.1 nM BoNT

50

/ A の取り込みを呈した。しかしながら、SiMa および Neuro - 2a に加えて、細胞株 N18、LA1 - 55n、PC12 および SH - SY5Y 全てが分化した状態で 0.1 nM B o N T / A の取り込みを呈した。

## 【0194】

## 【表3-1】

表3 候補細胞株の神経毒取り込みに及ぼす細胞分化の効果

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

## 【表3-2】

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

## 【0195】

## 2. 分化型候補細胞株の神経毒取り込みに及ぼすガングリオシド処理の効果

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

10

20

30

40

50

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

10

## 【0196】

S N A P - 25 切断生成物の存在を検出するために、採取された試料を 12 % 26 ウェル Criterion ゲル (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を使用して SDS-PAGE により分離する以外は実施例 1 に記載されるように、各採取された試料からのアリコートをウェスタンプロットにより分析し、そしてウサギポリクローナル - S N A P - 25<sub>1,9,7</sub> 抗体血清を一次抗体として使用した (実施例 4 参照)。表 4 は BoNT/A を取り込む分化型細胞株の能力に及ぼすガングリオシド処理の効果を示す。これらの結果により、ウェスタンプロットにおいて S N A P - 25 切断生成物の検出可能なバンドを生成する最低濃度の BoNT/A が示される。

20

## 【0197】

## 【表 4 - 1】

表 4 候補細胞株の神経毒取り込みに及ぼすガングリオシド処理の効果

細胞株	記載	供給源	BoNT/A 取り込み	
			24 時間インキュベーション	48 時間インキュベーション
BE(2)-M17	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-267	237.5 pM	118.8 pM
Kelly	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 355	未試験	未試験
LA1-55n	ヒト神経芽細胞腫	ECACC 06041203	15 pM	7.4 pM
N1E-115	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-263	未試験	未試験
N4TG3	マウス神経芽細胞腫	DSMZ ACC 101	未試験	未試験

30

40

【表4-2】

N18	マウス神経芽細胞腫／ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 881123 01	14.8pM	7.4pM
Neuro-2a	マウス神経芽細胞腫	ATCC CCL-1 31	7.4pM	7.4pM
NG108-15	マウス神経芽細胞腫／ラット神経膠腫ハイブリッド	ECACC 881123 02	未試験	未試験
PC12	ラットクロム親和性細胞腫	ATCC CRL-1 721	7.4pM	7.4pM
SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 266	未試験	未試験
SiMa	ヒト神経芽細胞腫	DSMZ ACC 16 4	1.9pM	1.9pM
SK-N-BE (2) -C	ヒト神経芽細胞腫	ATCC CRL-2 271	未試験	未試験

10

20

【0198】

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

細胞分化を誘起する処置改善が神経毒取り込みを改善できるかどうかを決定するために、SiMa、Neuro-2aおよびPC12細胞株を種々の血清不含培地中で成長させて分化を誘起した。試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を、種々の被験血清不含培地1mLを含有する24ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。試験されたパラメーターは1) BONT/A取り込みに及ぼす異なる基礎培地の効果(MEMおよびRPMI1649)；2) BONT/A取り込みに及ぼす神経栄養因子の存在または不在の効果(N2サプリメントおよびB27サプリメント)；3) BONT/A取り込みに及ぼす分化因子の存在または不在の効果(レチノイン酸および神経成長因子)；および4) BONT/A取り込みに及ぼす血清の存在または不在の効果(血清不含培地および血清使用量低減培地)であった。対照として、試験中の細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を对照血清不含培地(最小必須培地、アール塩を伴う2mM GlutaMAX(商標)I、0.1mM非必須アミノ酸、1.0mM HEPES、1mMピルビン酸ナトリウム、100単位/mLペニシリンおよび100μg/mLストレプトマイシン)1mLを含有する24ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。これらの細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで(およそ2から3日)インキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そして0(未処理試料)、0.005pM、0.015pM、0.05pM、0.14pM、0.42pM、1.2pM、3.7pM、11pM、33pM、100pMおよび300pMのBONT/A複合体のいずれかを含有する新鮮血清不含培地で置き換えた。加えて、分化型細胞をBONT/Aで24時間処理し、続いて培地交換し、そして新鮮培地中毒素を伴わずに48時間インキュベートしてSNA P-25切断生成物の蓄積を可能にした。次いで実施例1に記載されるように細胞を洗浄し、そして採取した。

30

40

【0199】

【表5】

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

## 【0200】

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

## 【0201】

10

20

30

40

【表6-1】

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

10

20

30

40

【表6-2】

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

## 【実施例3】

## 【0202】

B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基で遊離カルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の開発

以下の実施例は B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合することができる - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の作成の仕方を例証する。

1. - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の作成

S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合するモノクローナル - S N A P - 2 5

50

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

#### 【0203】

本明細書に開示されるその他のSNAP-25抗原に基づいた類似の計画を用いて、SNAP-25切断生成物からのBoNT/A切断部位切断可能結合からのP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する-SNAP-25モノクローナル抗体を開発した。例えば配列番号：38のSNAP-25抗原の代わりに配列番号：45のSNAP-25抗原をKLHに抱合させることができる。別の実例としては、配列番号：38のSNAP-25抗原からのヒトSNAP-25のアミノ酸186-197を配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43または配列番号：44と置き換えることができる。

#### 【0204】

##### 2. -SNAP-25モノクローナル抗体の存在に関するスクリーニング

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

10

20

30

40

50

) ソルビタンモノラウレアート) 200 μL 中、各回 5 分間で 4 回洗浄した。洗浄されたプレートを、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合されたヤギポリクローナル抗マウス IgG 抗体 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) の 1 : 10,000 希釀を含有する 1 × TBS 中、37 度で 1 時間インキュベートした。二次抗体でプロービングされたプレートを TBS、0.1% Tween-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレアート) 200 μL 中 4 回洗浄した。標識 SNAP-25 生成物の発色検出を ImmunoPure TMB 基質キット (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) を使用する発色検出により可視化した。BirA-HisTag (登録商標) - SNAP-25<sub>134-197</sub> コーティングされたプレートは黄色を発色したが、BirA-HisTag (登録商標) - SNAP-25<sub>134-206</sub> コーティングされたプレートは発色せず、それにより SNAP-25 抗体が SNAP-25<sub>197</sub> 切断生成物を優先的に認識することが示された。結果により、免疫に使用された 6 匹のマウスのうち 3 匹のマウス (マウス 2、マウス 3 およびマウス 4) がより高い力価および BONT/A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する SNAP-25 抗原に対するさらなる特異性を有した。

#### 【0205】

ELISA 軽鎖活性アッセイを用いてこれらの結果を確認した。以下の基質溶液およそ 100 μL を添加することにより 96 ウェル Reacti-Bind ストレプトアビジンコーティングされたプレート (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) を調製した：列 A-C を 12 の異なる濃度の BirA-HisTag (登録商標) - SNAP-25<sub>134-197</sub> 100 μL でコーティングした；列 D-H を 10 μg/mL の BirA-HisTag (登録商標) - SNAP-25<sub>134-206</sub> 100 μL でコーティングした。基質溶液を吸引し、そして TBS、0.1% Tween-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレアート) 200 μL で各ウェルを 3 回濯ぐことによりプレートを洗浄した。BONT/A の希釀を BONT/A インキュベーションバッファー (50 mM HEPES、pH 7.4、1% ワシ胎仔血清、10 μM ZnCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオスレイトール) 中 37 度 20 分間予備還元し、そして予備還元された BONT/A 100 μL を、基質でコーティングされたプレートに添加し、そして 37 度 90 分間インキュベートした。BONT/A インキュベーションバッファーを吸引し、そして TBS、0.1% Tween-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレアート) 200 μL で各プレートを 3 回濯ぐことにより BONT/A 処理プレートを洗浄した。試験中の抗体含有血清の 1 : 10 から 1 : 100 希釀を含有する 1 × TBS 中 0.5% BSA 中で、洗浄されたプレートを 37 度で 1 時間インキュベートした。一次抗体でプロービングされたプレートを TBS、0.1% Tween-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレアート) 200 μL 中、各回 5 分間で 4 回洗浄した。洗浄されたプレートを、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合されたヤギポリクローナル抗マウス IgG 抗体 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) の 1 : 10,000 希釀を含有する 1 × TBS 中、37 度で 1 時間インキュベートした。二次抗体でプロービングされたプレートを TBS、0.1% Tween-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレアート) 200 μL 中 4 回洗浄した。標識 SNAP-25 生成物の発色検出を ImmunoPure TMB 基質キット (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) を使用する発色検出により可視化した。6 匹全ての免疫マウス (マウス 1、マウス 2、マウス 3、マウス 4、マウス 5 およびマウス 6) から誘導された抗体含有血清を使用して、SNAP-25<sub>197</sub> 切断生成物の存在と相關した黄色の発色が BONT/A 処理試料において検出されたが、未処理対照では検出されなかった。故に比較 ELISA 分析により、免疫に使用されたマウスのうち 3 匹のマウス (マウス 2、マウス 3 およびマウス 4) がより高い力価および BONT/A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する SNAP-25 抗原に対するさらなる特異性を有した。

#### 【0206】

細胞基盤の切断アッセイに関しては、適当な密度の PC12 細胞を、適切な血清培地 (表 1) 3 mL を含有する 60 mm<sup>2</sup> 細胞培養プレートに蒔いた。細胞を 37 度のインキュ

10

20

30

40

50

ベーター中 5 % 二酸化炭素下で、細胞が適切な密度に到達するまで成長させた。室温で 5 分間インキュベートした、LipofectAmine 2000 ( Invitrogen Inc., Carlsbad, CA ) 1.5  $\mu$ L を含有する OPTI-MEM 還元血清培地 250  $\mu$ L を、pQBI-25/GFP-BONT/A-LC 発現構築物 ( 配列番号 : 51 ) 10  $\mu$ g を含有する OPTI-MEM 還元血清培地 250  $\mu$ L に添加することによりトランスフェクション溶液 500  $\mu$ L を調製した。pQBI-25/GFP-BONT/A-LC 発現構築物は pQBI-25 発現ベクター ( Qbiogene Inc., Carlsbad, CA ) を含んでなり、そのプロモーターエレメントは配列番号 : 52 の GFP-BONT/A 軽鎖をコードするポリヌクレオチドに機能的に連結されている。このトランスフェクション混合物を室温でおよそ 20 分間インキュベートした。培地を新鮮な未補充培地で置き換え、そしてトランスフェクション溶液 500  $\mu$ L を細胞に添加した。次いで細胞を 37 のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下でおよそ 6 から 18 時間インキュベートした。実施例 2 に記載されるように細胞を洗浄および採取した。SNAP-25<sub>1,9,7</sub> 切断生成物の存在を検出するために、使用された一次抗体が抗体含有血清の 1 : 1,000 希釈であり、そして使用された二次抗体がマウス - IgG 西洋ワサビペルオキシダーゼ ( Pierce Biotechnology, Rockford, IL ) の 1 : 20,000 希釈であった以外は実施例 2 に記載されるように、各採取された試料からのアリコートをウェスタンプロットにより分析した。3 匹のマウス ( マウス 2 、マウス 3 およびマウス 4 ) から誘導された抗体含有血清を使用して、SNAP-25<sub>1,9,7</sub> 切断生成物に相当する単一のバンドが BONT/A 処理試料において検出されたが、未処理対照では検出されなかった。故に細胞基盤の切断アッセイにより、免疫に使用されたマウスのうち、3 匹のマウス ( マウス 2 、マウス 3 およびマウス 4 ) がより高い力価および BONT/A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する SNAP-25 抗原に対するさらなる特異性を有した。

10

20

30

#### 【 0207 】

##### 3. ハイブリドーマの生成

BONT/A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する SNAP-25 抗原に選択的に結合することができる -SNAP-25 モノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを作成するために、最終の「ブースター」免疫に引き続いて 3 日にマウス 2 から脾臓を採取し、そして標準的なハイブリドーマプロトコールを用いて脾臓細胞を骨髄腫細胞 P3-X63 Ag8.653 と融合させた。これらの細胞を 5 つの 96 ウェルプレートに蒔き、そして HAT 培地を使用してハイブリッドを選択した。融合後 8-14 日内に 2 つの別個のプレートにコーティングされた BirA-HisTag ( 登録商標 ) -SNAP-25<sub>1,3,4-1,9,7</sub> および BirA-HisTag ( 登録商標 ) -SNAP-25<sub>1,3,4-2,0,6</sub> ペプチドを伴う比較 E L I S A を用いておよそ 480 の親クローンの最初のスクリーニングを実施した。比較 E L I S A により、切断された SNAP-25<sub>1,9,7</sub> に特異的な抗体を生成するハイブリドーマを同定するための迅速なスクリーニング方法が提供された。上位 18 個のクローンを、前記された細胞基盤の切断アッセイを用いるさらなるスクリーニングおよび L C / A トランスフェクトされた細胞の免疫染色に供した ( 表 7 )。

#### 【 0208 】

【表7】

クローニング	比較ELISA				細胞基盤のアッセイ	
	OD SNAP-2 <sub>5<sub>197</sub></sub>	OD SNAP-2 <sub>5<sub>206</sub></sub>	比 <sub>197/206</sub>	比 <sub>206/197</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
1D3	1.805	0.225	8.02	0.13	+++	-
1F12	0.365	0.093	3.92	0.25	-	-
1G10	0.590	0.137	4.31	0.23	++	-
1H1	0.335	0.121	2.77	0.36	-	-
1H8	0.310	0.302	1.03	0.97	+	-
2C9	0.139	0.274	0.51	1.97	-	-
2E2	0.892	0.036	24.78	0.04	++	-
2E4	0.228	0.069	3.30	0.30	+	-
2F11	1.095	1.781	0.61	1.63	-	-
3C1	1.268	0.053	23.92	0.04	++	-
3C3	0.809	0.052	15.56	0.06	++	-
3E1	0.086	0.155	0.55	1.80	0	-
3E8	2.048	0.053	38.64	0.03	+++	-
3G2	0.053	0.158	0.34	2.98	-	-
4D1	0.106	0.218	0.49	2.06	-	-
4G6	0.061	0.159	0.38	2.61	-	-
5A5	0.251	0.106	2.37	0.42	+	-
5F11	0.243	0.061	3.98	0.25	-	-

10

20

30

40

【0209】

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

【0210】

50

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

B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原に選択的に結合することができる - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の結合特異性を評価するために、クローン 1 D 3 B 8、1 G 1 0 A 1 2、2 C 9 B 1 0、2 E 2 A 6、2 F 1 1 B 6、3 C 1 A 5 および 3 C 3 E 2 由来の腹水を使用して、細胞基盤の活性アッセイ、免疫細胞化学および免疫沈降を用いて S N A P - 2 5 切断生成物を検出した。

##### 【 0 2 1 1 】

細胞基盤の活性アッセイに関して、ウェスタンプロット分析により - S N A P - 2 5 抗体含有腹水が未切断 S N A P - 2 5<sub>2 0 6</sub> 基質および S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物を検出する能力を分析することにより結合特異性を決定した。適当な密度の P C 1 2 細胞を、適切な血清培地 3 m L を含有する 6 0 mm<sup>2</sup> 組織培養プレートに蒔き、3 7 のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下で、適切な細胞密度に到達するまで成長させ、そして前記されたように p Q B I - 2 5 / G F P - B o N T / A - L C 発現構築物を欠如するトランسفエクション溶液（トランسفエクトされていない細胞）、または p Q B I - 2 5 / G F P - B o N T / A - L C 発現構築物を含有するトランسفエクション溶液（トランسفエクトされた細胞）のいずれかでトランسفエクトした。実施例 1 に記載されるように細胞を洗浄および採取した。未切断 S N A P - 2 5<sub>2 0 6</sub> 基質および S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物双方の存在を検出するために、使用された一次抗体が - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体含有腹水の 1 : 1 0 0 希釈であり、そして使用された二次抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合された - マウス Ig G (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) の 1 : 2 0 , 0 0 0 希釈であった以外は実施例 1 に記載されるように、各採取された試料からのアリコートをウェスタンプロットにより分析した。加えて、3 つの市販により入手可能なマウス - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を試験した。 - S N A P - 2 5 抗体である S M I - 8 1 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD) (製造者により未切断 S N A P - 2 5<sub>2 0 6</sub> 基質および S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物の双方を検出することが示されている) を製造者の推奨に従って 1 5 , 0 0 0 希釈で使用した。 - S N A P - 2 5 抗体である M C - 6 0 5 0 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV) (製造者により未切断 S N A P - 2 5<sub>2 0 6</sub> 基質および S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物の双方を検出することが示されている) を製造者の推奨に従って 1 : 1 0 0 希釈で使用した。 - S N A P - 2 5 抗体である M C - 6 0 5 3 (Research & Diagnostic Antibodies, Las Vegas, NV) (製造者により S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物のみを検出することが示されている) を製造者の推奨に従って 1 : 1 0 0 希釈で使用した。

##### 【 0 2 1 2 】

表 8 は S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物のみを検出した - S N A P - 2 5 抗体含有腹水を示す。細胞基盤の切断アッセイにより、クローン 1 D 3 B 8、2 C 9 B 1 0、2 E 2 A 6、3 C 1 A 5 および 3 C 3 E 2 から生成された腹水は、S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物に関して高い結合特異性を有する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を合成し、S N A P - 2 5<sub>2 0 6</sub> 未切断基質に相対してこの切断生成物の選択的認識が可能になる。市販の抗体 S M I - 8 1 は S N A P - 2 5<sub>2 0 6</sub> 未切断基質を検出したが、S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物をわずかしか認識しなかった（表 8）。驚くべきことに、市販の抗体 M C - 6 0 5 0 は S N A P - 2 5<sub>2 0 6</sub> 未切断基質のみを検出し、そして S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物を認識し損なった（表 8）。なおさらに驚くべきことに、市販の抗体 M C - 6 0 5 3 は S N A P - 2 5<sub>2 0 6</sub> 未切断基質のみを検出し、そして S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物を認識し損なったにもかかわらず、製造者は、この抗体が S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物を特異的に検出すると宣伝している（表 8）。故にこの分析により、1 D 3 B 8、2 C 9 B 1 0、2 E 2 A 6、3 C 1 A 5 および 3 C 3 E 2 は S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物に関して適当な選択性を呈するが、1 G 1 0 A 1 2 および 2 F 1 1 B 6 は呈さないことが示される。加えて、市販の抗体 S M I - 8 1、M C - 6 0 5 0 および M C - 6 0 5 3 は全て S N A P - 2 5<sub>1 9 7</sub> 切断生成物を選択的に検出し損なったので、全て

10

20

30

40

50

本出願で開示される免疫基盤の方法に不適当である。

【0213】

免疫細胞化学分析のために、免疫染色により - S N A P - 2 5 抗体含有腹水が未切斷 S N A P - 2 5<sub>206</sub> 基質および S N A P - 2 5<sub>197</sub> 切断生成物を検出する能力を分析することにより結合特異性を決定した。例えば「ボツリヌス神經毒の軽鎖における細胞膜局在シグナル」Ester Fernandez-Salas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 101 (9) : 3208 - 3213 (2004) 参照。前記されたように適當な密度の P C 1 2 細胞を蒔き、成長させ、そして p Q B I - 2 5 / G F P - B o N T / A - L C 発現構築物を欠如するトランスフェクション溶液（トランスフェクトされていない細胞）または p Q B I - 2 5 / G F P - B o N T / A - L C 発現構築物を含有するトランスフェクション溶液（トランスフェクトされた細胞）のいずれかでトランスフェクトした。細胞を 1 × P B S で洗浄し、そして P A F 5 m L 中、室温で 30 分間固定した。固定された細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水中で洗浄し、1 × P B S 中 0.5% Triton (登録商標) X-100 (ポリエチレンギリコールオクチルフェノールエーテル) 5 m L 中でインキュベートし、1 × P B S で洗浄し、そしてメタノール 5 m L 中 - 20° で 6 分間透過処理した。透過処理された細胞を 100 mM グリシン 5 m L 中、室温で 30 分間遮断し、1 × P B S 中で洗浄し、そして 1 × P B S 中 0.5% B S A 5 m L 中室温で 30 分間遮断した。遮断された細胞を 1 × P B S 中で洗浄し、そして試験中のクローン性ハイブリドーマ細胞株からの腹水の 1 : 10 希釀を含有する 1 × P B S 中 0.5% B S A 中、室温で 2 時間インキュベートした。一次抗体でプロービングされた細胞を 1 × P B S 中各回 5 分間で 3 回洗浄した。洗浄された細胞を二次抗体として ALEXA (登録商標) FLUOR568 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) に抱合されたヤギポリクローナル抗マウス免疫グロブリン G、重および軽鎖 (IgG, H + L) 抗体の 1 : 200 希釀を含有する 1 × P B S 中、室温で 2 時間インキュベートした。二次抗体でプロービングされた細胞を 1 × P B S 中各回 5 分間で 3 回洗浄した。洗浄された細胞を、VECTASHIELD (登録商標) 封入剤 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) でマウントし、そしてカバーガラスを載せることにより顕微鏡試験用に調製した。Leica 共焦点顕微鏡で、適切なレーザー設定を用いてシグナル検出の画像が得られた。表 8 は S N A P - 2 5<sub>197</sub> - 切断生成物を特異的に検出する - S N A P - 2 5 抗体含有腹水を示す。免疫細胞化学分析により、クローン 1 D 3 B 8、2 C 9 B 1 0、2 E 2 A 6、3 C 1 A 5 および 3 C 3 E 2 から生成された腹水が、S N A P - 2 5<sub>197</sub> 切断生成物に関して高い結合特異性を有する - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を合成し、S N A P - 2 5<sub>206</sub> 未切斷基質に相対してこの切断生成物の優先的な認識を可能にすることが示された。

【0214】

免疫沈降分析のために、プロテイン A (HiTrap (商標) プロテイン A H P カラム、GE Healthcare, Amersham, Piscataway, NJ) 精製された - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体が未切斷 S N A P - 2 5<sub>206</sub> 基質および S N A P - 2 5<sub>197</sub> 切断生成物を沈澱させる能力を分析することにより結合特異性を決定した。例えば Chapter 8 Storing and Purifying Antibodies, pp. 309 - 311, Harlow & Lane, supra, 1998a 参照。前記されたように適當な密度の P C 1 2 細胞を蒔き、成長させ、そして p Q B I - 2 5 / G F P 発現構築物 (对照細胞；配列番号 : 5 3) を含有するトランスフェクション溶液、または p Q B I - 2 5 / G F P - B o N T / A - L C 発現構築物 (実験細胞) を含有するトランスフェクション溶液のいずれかでトランスフェクトした。p Q B I - 2 5 / G F P 発現構築物は、そのプロモーター要素が配列番号 : 5 4 の G F P をコードするポリヌクレオチドに機能的に連結されている発現ベクターを含んでなる。一晩インキュベートした後、成長培地を吸引し、そして各ウェルを 1 × P B S 200 μL で灌ぐことにより細胞を洗浄した。細胞を採取するために、P B S を吸引し、5.0 mM H E P E S、1.50 mM N a C l、1.5 mM M g C l<sub>2</sub>、1 mM E G D T、10% グリセロール、1% Triton (登録商標) X-100 (ポリエチレンギリコールオクチルフェノールエーテル) および 1 × COMPLETE (商標) プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN) を含んでなる免疫沈降溶解バッファーを添加し、そして 4° で 1 時間インキュベート

することにより細胞を溶解した。溶解した細胞を  $3,000 \times g$ 、4で10分間遠心して細胞デブリを除去し、そして上澄を清浄な管に移し、そしておよそ  $1\text{ mg} / \text{mL}$  のタンパク質濃度まで希釈した。精製されたモノクローナル抗体およそ  $5\text{ }\mu\text{g}$  を希釈された上澄  $0.5\text{ mL}$  に添加し、そして4で2時間インキュベートした。一次抗体のインキュベーションの後、固定されたプロテインG (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) より  $50\text{ }\mu\text{L}$  を希釈された上澄に添加し、そして4で1時間インキュベートした。免疫沈降溶解バッファー  $0.5\text{ mL}$  を添加し、 $300 \times g$ 、4で1分間遠心して固定されたプロテインGをペレット化し、そして上澄をデカントすることによりインキュベートされた上澄を各回30分間で3回洗浄した。洗浄の後、ペレットを  $1 \times \text{SDS}$  負荷バッファー  $30\text{ }\mu\text{L}$  中に再懸濁し、そして試料を  $95^\circ\text{C}$  まで5分間加熱した。未切断SNAP-25<sub>206</sub>基質およびSNAP-25<sub>197</sub>切斷生成物の双方の存在を検出するために、使用された一次抗体が -SNAP-25ポリクローナル抗体血清（実施例4参照）の1:1,000希釈であり、そして使用された二次抗体がウサギ-IgG西洋ワサビペルオキシダーゼ (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) の1:20,000希釈であった以外は実施例1に記載されるように、各採取された試料からのアリコートをウェスタンプロットにより分析した。表8は免疫沈降分析によりSNAP-25<sub>197</sub>-切斷生成物を特異的に引き下げる -SNAP-25抗体含有腹水を示す。免疫沈降分析により、クローン2E2A6および3C1A5から生成された腹水がSNAP-25<sub>197</sub>切斷生成物に関して高い結合特異性を有する -SNAP-25モノクローナル抗体を合成し、SNAP-25<sub>206</sub>未切断基質に相対してこの切斷生成物の優先的な認識を可能にすることが示された。

10

20

30

40

## 【0215】

【表8】

表8 $\alpha$ -SNAP-25モノクローナル抗体を含有するクローン腹水の分析						
クローン	細胞基盤のアッセイ		免疫細胞化学		免疫沈降	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
1D3B8	++	-	++	-	未試験	未試験
1G10A1 <sub>2</sub>	++	++	未試験	未試験	未試験	未試験
2C9B10	++	-	++	-	未試験	未試験
2E2A6	++	-	++	-	++	-
2F11B6	+	+	+	+	未試験	未試験
3C1A5	++	-	++	-	++	-
3C3E2	+	-	未試験	未試験	未試験	未試験
MC-60 <sub>50</sub>	-	+	未試験	未試験	未試験	未試験
MC-60 <sub>53</sub>	-	+	未試験	未試験	未試験	未試験
SMI-81	-/+	++	未試験	未試験	未試験	未試験

## 【0216】

## 5. -SNAP-25モノクローナル抗体の結合アフィニティーの評価

SNAP-25<sub>197</sub>切斷生成物またはSNAP-25<sub>206</sub>未切断基質のいずれかに関して高い結合特異性を示す -SNAP-25モノクローナル抗体の結合アフィニティーを決定するために、BIACore 3000装置でカルボキシメチルデキストラン (CM5) センサーチップ (BIACore, Inc., Piscataway, NJ) を使用して結合アフィニティーアッセイ

50

を実施した。10 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM 塩化ナトリウム、3 mM EDTA、0.005% (容量 / 容量) 界面活性剤 P20 を含んでなる HBS-EPP バッファーで、25°C、流速 10 μL / 分で実行した。配列番号 : 5 のアミノ酸 134-197 (SNAP-25<sub>134-197</sub>) または配列番号 : 5 のアミノ酸 134-206 (SNAP-25<sub>134-206</sub>) を含んでなる SNAP-25 ペプチドを標準的なアミン結合を用いて CM5 センサーチップの表面に共有結合により付着させた。簡単には、0.2 M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよび 0.05 M N-ヒドロキシスクシイミドの混合物の 7 分注入により CM5 チップを活性化し；次いで SNAP-25 ペプチドを 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.0) 中、流速 10 μL / 分で 20 分注入し；そして未反応のスクシイミドエステルを 1 M 塩酸エタノールアミン (pH 8.5) の 7 分注入により遮断した。チップ上に固定された SNAP-25<sub>134-197</sub> または SNAP-25<sub>134-206</sub> の量は応答単位の 100-150 増大 (約 0.10-0.15 ng / mm<sup>2</sup>) により反映された。クローン 1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5 および 3C3E2 から生成された腹水または精製されたモノクローナル抗体のいずれかを含んでなる抗体試料、ならびに市販により入手可能な -SNAP-25 抗体を、CM5 チップの表面上を通過させて、会合時間 10 分および解離時間 20 分を可能にした。10 mM グリシン-HCl (pH 2.5) の流速 15 μL / 分の 1 分注入による実行の間に表面を再生した。センサーグラム曲線は BIAsolution3.0 ソフトウェアを用いて 1 : 1 動力学的結合モデルに適合した。

## 【0217】

結果により、2E2A6 および 3C1A5 の双方が SNAP-25 未切斷基質を超えて SNAP-25<sub>197</sub> 切斷生成物に関して高度に特異的であったことが示される (表 9)。MC-6050 および MC-6053 の結合アフィニティーと比較した場合、1D3B6 はこれらの市販の抗体に相対して SNAP-25 切斷生成物に関しておよそ 10 倍高い平衡解離定数を有した (表 9)。興味深いことに、2E2A6 のみがこれらの市販の抗体に相対して SNAP-25 切斷生成物に関してわずかに低い平衡解離定数を有した (0.405 nM 対 0.497 および 0.508) (表 9)。これらの市販の -SNAP-25 抗体のいずれも SNAP-25 切斷生成物を選択的に認識しなかったが (表 8)、約 0.5 nM よりも低い平衡解離定数がかかる選択性を達成するためにある程度必須であると思われる。類似して MC-6050 および MC-6053 の結合アフィニティーと比較した場合、2E2A6 は約少なくとも 1 倍緩徐な分離速度 (off rate) / 解離定数 (6.74 × 10<sup>-5</sup> 対 8.82 × 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup> および 1.18 × 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>) を有した (表 9)。これはさらに、約 8.82 × 10<sup>-4</sup> より緩徐な分離速度 / 解離定数が一部で SNAP-25 切斷生成物に関する選択的結合を達成するためにある程度必須であると思われること示唆する。この結果は 5.78 × 10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup> の分離速度 / 解離定数を有した 1D3B8 と一致する (表 9)。

## 【0218】

## 【表 9-1】

表 9 α-SNAP-25 モノクローナル抗体結合アフィニティーの分析

SPRパラメーター	1D3B8		2E2A6*	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>a</sup>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>b</sup>
Ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1.06 × 10 <sup>6</sup>	—	1.70 × 10 <sup>6</sup> (1.66 × 10 <sup>5</sup> )	— (-)
Kd (s <sup>-1</sup> )	5.78 × 10 <sup>-5</sup>	—	1.53 × 10 <sup>-4</sup> (6.74 × 10 <sup>-5</sup> )	— (-)
KD (nM)	0.050	—	0.090 (0.405)	— (-)

10

20

30

40

50

【表9-2】

SPRパラメーター	3C1A5		2C9B10	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>c</sup>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub> <sup>d</sup>
K <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2.17 × 10 <sup>5</sup>	—	1.15 × 10 <sup>4</sup>	—
K <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	2.88 × 10 <sup>-4</sup>	—	3.11 × 10 <sup>-4</sup>	—
KD (nM)	1.33	—	27.1	—

10

【表9-3】

SPRパラメーター	MC-6050		MC-6053	
	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>	SNAP-25 <sub>197</sub>	SNAP-25 <sub>206</sub>
K <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1.78 × 10 <sup>6</sup>	3.06 × 10 <sup>2</sup>	2.32 × 10 <sup>6</sup>	1.06 × 10 <sup>2</sup>
K <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	8.82 × 10 <sup>-4</sup>	6.07 × 10 <sup>-3</sup>	1.18 × 10 <sup>-3</sup>	2.56 × 10 <sup>-5</sup>
KD (nM)	0.497	19,800	0.508	240

20

\* 2つの異なるチップでこの抗体に関して独立して実行した。

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

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

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

30

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

## 【0219】

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

BONT/A切断部位切断可能結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25抗原に選択的に結合することができる、単離された -SNAP-25モノクローナル抗体のエピトープを決定するために、ハイブリドーマ1D3B8、2C9B10、2E2A6、3C1A5および3C3E2により生成される -SNAP-25モノクローナル抗体の可変重(V<sub>H</sub>)および可変軽(V<sub>L</sub>)鎖をコードするポリヌクレオチド分子をシークエンシングした。標準的なプロトコールを用いて各ハイブリドーマからmRNAを抽出および精製し、そしてオリゴdTアンチセンスプライマーまたは遺伝子特異的(ネズミIgG1CHおよびカッパCL)アンチセンスプライマーのいずれかを使用してcDNAに逆転写した。cDNA生成の後、特異的なネズミおよびヒト定常ドメインプライマーを使用してPCRによりcDNAを増幅して抗体のアイソタイプを決定した。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>縮重プライマーを使用してcDNAから可変ドメインを増幅した。5' RACEのた

40

50

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

10

## 【 0220 】

本明細書に開示されるハイブリドーマにより生成される - S N A P - 25 モノクローナル抗体の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> 鎖を含んでなるポリヌクレオチド配列は以下のとおりである : 1 D 3 B 8 V<sub>H</sub> ( 配列番号 : 71 ) 、 2 C 9 B 1 0 V<sub>H</sub> ( 配列番号 : 73 ) 、 2 E 2 A 6 V<sub>H</sub> ( 配列番号 : 75 ) 、 3 C 1 A 5 V<sub>H</sub> バリアント 1 ( 配列番号 : 77 ) 、 3 C 1 A 5 V<sub>H</sub> バリアント 2 ( 配列番号 : 79 ) 、 3 C 3 E 2 V<sub>H</sub> ( 配列番号 : 81 ) ; 1 D 3 B 8 V<sub>L</sub> ( 配列番号 : 83 ) 、 2 C 9 B 1 0 V<sub>L</sub> ( 配列番号 : 85 ) 、 2 E 2 A 6 V<sub>L</sub> ( 配列番号 : 87 ) 、 3 C 1 A 5 V<sub>L</sub> ( 配列番号 : 89 ) および 3 C 3 E 2 V<sub>L</sub> ( 配列番号 : 91 ) 。本明細書に開示されるハイブリドーマにより生成される - S N A P - 25 モノクローナル抗体の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> 鎖を含んでなるアミノ酸配列は以下のとおりである : 1 D 3 B 8 V<sub>H</sub> ( 配列番号 : 72 ) 、 2 C 9 B 1 0 V<sub>H</sub> ( 配列番号 : 74 ) 、 2 E 2 A 6 V<sub>H</sub> ( 配列番号 : 76 ) 、 3 C 1 A 5 V<sub>H</sub> バリアント 1 ( 配列番号 : 78 ) 、 3 C 1 A 5 V<sub>H</sub> バリアント 2 ( 配列番号 : 80 ) 、 3 C 3 E 2 V<sub>H</sub> ( 配列番号 : 82 ) ; 1 D 3 B 8 V<sub>L</sub> ( 配列番号 : 84 ) 、 2 C 9 B 1 0 V<sub>L</sub> ( 配列番号 : 86 ) 、 2 E 2 A 6 V<sub>L</sub> ( 配列番号 : 88 ) 、 3 C 1 A 5 V<sub>L</sub> ( 配列番号 : 90 ) および 3 C 3 E 2 V<sub>L</sub> ( 配列番号 : 92 ) 。ハイブリドーマ 1 D 3 B 8 、 2 C 9 B 1 0 、 2 E 2 A 6 、 3 C 1 A 5 および 3 C 3 E 2 により生成される - S N A P - 25 モノクローナル抗体の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> C D R ドメインを含んでなるアミノ酸配列を表 10 に示す。

20

30

## 【 0221 】

【表10-1】

表10 α-SNAP-25モノクローナル抗体からのV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインのCDR配列

CDR	配列	同定された所	配列番号：
V <sub>H</sub> CDR 1	TFTDHSIH	2E2A6 2C9B10 3C1A5バリアント 2	93
V <sub>H</sub> CDR 1	TFTNYVIH	3C1A5バリアント 1 3C3E2	94
V <sub>H</sub> CDR 1	IFTDHALH	1D3B8	95
V <sub>H</sub> CDR 2	YIFPGNGNIEYNDKFKG	2E2A6	96
V <sub>H</sub> CDR 2	YLFPGNGNFEYNEKFKG	2C9B10 3C1A5バリアント 2	97
V <sub>H</sub> CDR 2	YINPYNDGSKYNEKFKG	3C1A5バリアント 1 3C3E2	98
V <sub>H</sub> CDR 2	YIFPGNGNIEYNEKFKG	1D3B8	99
V <sub>H</sub> CDR 3	KRMGY	2E2A6 3C1A5バリアント 2	100
V <sub>H</sub> CDR 3	KKMDY	2C9B10 1D3B8	101

10

20

30

【表10-2】

V <sub>H</sub> CDR 3	ARHLANTYYYFDY	3C1A5バリアント 1 3C3E2	102
V <sub>L</sub> CDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE	1D3B8	103
V <sub>L</sub> CDR 1	RTTENIYSYFV	2C9B10	104
V <sub>L</sub> CDR 1	RASKSVSTSGYSYMH	2E2A6	105
V <sub>L</sub> CDR 1	KASQDIKSYLS	3C1A5	106
V <sub>L</sub> CDR 1	RASQNIGNYLH	3C3E2	107
V <sub>L</sub> CDR 2	KVSNRFS	1D3B8	108
V <sub>L</sub> CDR 2	NAKSLAE	2C9B10	109
V <sub>L</sub> CDR 2	LVSNLES	2E2A6	110
V <sub>L</sub> CDR 2	YATSLAD	3C1A5	111
V <sub>L</sub> CDR 2	YASQESIS	3C3E2	112
V <sub>L</sub> CDR 3	FQGSHVPPT	1D3B8	113
V <sub>L</sub> CDR 3	QHHYGTPYT	2C9B10	114
V <sub>L</sub> CDR 3	QHIRELTRS	2E2A6	115
V <sub>L</sub> CDR 3	LQHGESPFT	3C1A5	116
V <sub>L</sub> CDR 3	QQSDTWPLT	3C3E2	117

10

20

30

40

【0222】

本明細書に開示されるハイブリドーマにより生成される - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の V<sub>H</sub> C D R ドメインバリアントを含んでなるアミノ酸配列の非限定例には、 1 D 3 B 8 に関しては V<sub>H</sub> C D R 1 バリアント配列番号： 1 1 8 ; 2 C 9 B 1 0 、 2 E 2 A 6 および 3 C 1 A 5 V<sub>H</sub> バリアント 2 に関しては V<sub>H</sub> C D R 1 バリアント配列番号： 1 1 9 ; 3 C 1 A 5 V<sub>H</sub> バリアント 1 および 3 C 3 E 2 に関しては V<sub>H</sub> C D R 1 バリアント配列番号： 1 2 0 ; 1 D 3 B 8 および 2 E 2 A 6 に関しては V<sub>H</sub> C D R 2 バリアント配列番号： 1 2 1 ; 2 C 9 B 1 0 および 3 C 1 A 5 V<sub>H</sub> バリアント 2 に関しては V<sub>H</sub> C D R 2 バリアント配列番号： 1 2 2 ; 3 C 1 A 5 V<sub>H</sub> バリアント 1 および 3 C 3 E 2 に関しては V<sub>H</sub> C D R 2 バリアント配列番号： 1 2 3 ; 1 D 3 B 8 および 2 C 9 B 1 0 に関しては V<sub>H</sub> C D R 3 バリアント M D Y ; 2 E 2 A 6 および 3 C 1 A 5 V<sub>H</sub> バリアント 2 に関しては V<sub>H</sub> C D R 3 バリアント M G Y ; ならびに 3 C 1 A 5 V<sub>H</sub> バリアント 1 および 3 C 3 E 2 に関しては V<sub>H</sub> C D R 3 バリアント配列番号： 1 2 4 が含まれる。本明細書に開示されるハイブリドーマにより生成される - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体の V<sub>L</sub> C D R ドメインバリアントを含んでなるアミノ酸配列の非限定例には、 1 D 3 B 8 に関しては V<sub>L</sub> C D R 1 バリアント配列番号： 1 2 5 ; 2 C 9 B 1 0 に関しては V<sub>L</sub> C D R 1 バリアント配列番号： 1 2 6 ; 2 E 2 A 6 に関しては V<sub>L</sub> C D R 1 バリアント配列番号： 1 2 7 ; 3 C 1 A 5 に関しては V<sub>L</sub> C D R 1 バリアント配列番号： 1 2 8 ; 3 C 3 E 2 に関しては V<sub>L</sub> C D R 1 バリアント配列番号： 1 2 9 ; 1 D 3 B 8 に関しては V<sub>L</sub> C D R 2 バリアント K V S ; 2 C 9 B 1 0 に関しては V<sub>L</sub> C D R 2 バリアント N A K ; 2 E 2 A 6 に関しては V<sub>L</sub> C D R 2 バリアント L V S ; 3 C 1 A 5 に関しては V<sub>L</sub> C D R 2 バリアント Y A T ; および 3 C 3 E 2 に関しては V<sub>L</sub> C D R 2 バリアント Y A S が含まれる。

【実施例4】

【0223】

B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基で遊離カルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の開発

50

以下の実施例は B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 エピトープに選択的に結合することができる - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の作成の仕方を例証する。

S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を開発するために、10 - 残基ペプチド C G G G R I D E A N Q (配列番号：46) を S N A P - 2 5 切断生成物抗原として設計した。このペプチドは K L H に抱合するための N 末端システイン残基、ヒト S N A P - 2 5 (配列番号：5) のアミノ酸 191 - 197 に連結された可動性スペーサーである G スペーサー (G G G) を含んでなり、そしてカルボキシル化された C 末端グルタミンを有する。Blast検索により、このペプチドが S N A P - 2 5 に対してのみ高い相同意を有し、そしてニューロン細胞において他のタンパク質との交差反応性の可能性がほとんどないことが示された。またコンピューターアルゴリズムを利用することにより配列を注意深く精査して、疎水性親水性指標、タンパク質表面確率、可動性の領域および好ましい二次構造、続いて選ばれたペプチド配列の相応しい配向および提示を決定した。ペプチドを合成し、そしてキーホールリンペットヘモシアニン (K L H) に抱合させて免疫原性を増大した。動物を免疫する前に、細胞ライゼートに存在するタンパク質に対して免疫反応性を有さなかつた動物を同定するために、ナイーブなウサギを最初に候補細胞株からの細胞ライゼートに対してウェスタンプロットでスクリーニングした。2匹のプレスクリーニングされたウサギをこのペプチドで免疫し、そして約 8 週のうちに 3 回の免疫の後、ウサギを試験のために出血させた。4 で 60 分間インキュベートすることにより血液を凝固させた。凝固した血液を 10,000 × g、4 で 10 分間遠心して細胞デブリをペレット化した。得られた血清試料を 50 μL アリコートに分注し、そして必要になるまで - 20 で保存した。  
10 20

#### 【0224】

本明細書に開示されるその他の S N A P - 2 5 抗原に基づく類似の計画を用いて、S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からの P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を含んでなるエピトープに結合する - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を開発する。例えば配列番号：46 の S N A P - 2 5 抗原の代わりに、配列番号：47 の S N A P - 2 5 抗原を K L H に抱合させることができる。別の実例としては、配列番号：38 の S N A P - 2 5 抗原からのヒト S N A P - 2 5 のアミノ酸 191 - 197 を、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43 または配列番号：44、配列番号：147 または配列番号：148 と置き換えることができる。  
30

#### 【0225】

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

B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原に選択的に結合することができる - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の存在を決定するために、実施例 3 に記載されるように抽出されたウサギ血清を使用して比較 E L I S A および細胞基盤の切断アッセイを実施した。双方のウサギからの血清は B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原に選択的に結合することができる - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を含有した。 - S N A P - 2 5 ウサギポリクローナル抗体を N T P 2 2 および N T P 2 3 と称した。  
40

#### 【0226】

##### 3. - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の精製

B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原に選択的に結合することができる - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を精製するために、配列番号：46 の S N A P - 2 5 抗原を含有するアフィニティーカラムを使用して、ウサギ血清から N T P 2 2 および N T P 2 3 抗体を精製した。

#### 【0227】

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

10

20

30

40

50

B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 抗原に選択的に結合することができる - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体の結合特異性を評価するために、実施例 3 に記載されるように細胞基盤の活性アッセイ、免疫細胞化学および免疫沈降を用いて精製された N T P 2 2 および N T P 2 3 - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体を使用して切断生成物を検出した。細胞基盤の切断アッセイ、免疫細胞化学分析および免疫沈降分析全てにより、N T P 2 2 および N T P 2 3 - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体が未切断 S N A P - 2 5 と交差反応しないことが示された。故に N T P 2 2 および N T P 2 3 の双方が S N A P - 2 5<sub>197</sub> 切断生成物に関して高い結合特異性を有し、S N A P - 2 5<sub>206</sub> 未切断基質に相対してこの切断生成物の優先的な認識を可能にする。実施例 3 に記載されるように BiAcoreにおいて S P R を用いて抗原に関するアフィニティーを決定することができる。

10

## 【実施例 5】

## 【0 2 2 8】

サンドイッチ E L I S A のための構成要素および条件調製

以下の実施例は B o N T / A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 に特異的な - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を使用して S N A P - 2 5 切断生成物を検出することにより、B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法を行うために有用なサンドイッチ E L I S A を実施するために必要な構成要素および条件を同定および調製する仕方を例証する。

20

## 1. B o N T / A で処理された細胞からの細胞ライゼートの調製

分析用の B o N T / A 処理された細胞ライゼートを得るために、Neuro - 2 a のストック培養物から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う 2 mM GlutaMAX (商標) I、1 × B 2 7 サプリメント、1 × N 2 サプリメント、0.1 mM 非必須アミノ酸、10 mM HEPES を含有する血清不含培地 50 mL を含有する T 175 フラスコに播種した。これらの細胞を 37° のインキュベーター中 5% 二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで（およそ 2 から 3 日）インキュベートした。対照として、Neuro - 2 a のストック培養物から適当な密度の細胞を適切な成長培地（表 1）50 mL を含有する T 175 フラスコに播種した。これらの未分化対照細胞を 37° のインキュベーター中 5% 二酸化炭素下で、細胞が 50% コンフルエンスに到達するまで（およそ 18 時間）成長させた。分化型および未分化型対照培養物の双方からの培地を各ウェルから吸引し、そして 0 (未処理試料) または 10 nM B o N T / A 複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。一晩インキュベートした後、細胞を洗浄し、そして新たに調製された Triton X - 100 溶解バッファー (50 mM HEPES、150 mM NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EGTA、1% Triton X - 100) 中で 30 分間一定の攪拌を行しながら溶解することにより細胞を採取した。溶解した細胞を 4000 rpm、4° で 20 分間遠心して、ベンチトップ遠心を使用してデブリを排除した。細胞ライゼートのタンパク質濃度を ブラッドフォードアッセイにより測定した。

30

## 【0 2 2 9】

## 2. サンドイッチ E L I S A 構成要素の調製および同定

40

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

50

ナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)、N - 19 - S N A P - 25 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)、ならびに S P 12 - S N A P - 25 マウスポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) であった。

#### 【0230】

捕捉抗体溶液を調製するために、ハイブリドーマ細胞株 2 E 2 A 6 および 3 C 1 A 5 からの腹水に含有される - S N A P - 25 モノクローナル抗体、ならびに - S N A P - 25 M C - 6 0 5 0 および M C - 6 0 5 3 モノクローナル抗体を標準的なプロテイン A 精製プロトコールを用いて精製した。全てのその他の - S N A P - 25 抗体を精製された抗体として購入した。

10

#### 【0231】

検出抗体溶液を調製するために、適切な - S N A P - 25 抗体を製造者の説明書に従って (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) ルテニウム (II) - トリス - ビピリジン - (4 - メチルスルホナート) N H S エステル標識試薬 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) に抱合させた。蒸留水で再構成された MSD SULFO - TAG (商標) ストック溶液 3 0  $\mu$  L を 2 m g / m L - S N A P - 25 ポリクローナル抗体 2 0 0  $\mu$  L に添加し、そして反応物を暗中室温で 2 時間インキュベートすることにより抱合反応を実施した。標準的なスピンカラムプロトコールを用いて標識された抗体を精製し、そして標準的な比色タンパク質アッセイを用いてタンパク質濃度を決定した。分光光度計を使用して - S N A P - 25 抗体 / MSD SULFO - TAG (商標) 抱合体の吸光度を 4 5 5 n m で測定してリットルあたりのモル濃度を決定した。検出抗体溶液を必要になるまで 4 度で保存した。

20

#### 【0232】

S N A P - 25 切断生成物に特異的である捕捉抗体を含んでなる固相支持体を調製するために、適切な - S N A P - 25 モノクローナル抗体溶液 (1 × P B S 中 2 0  $\mu$  g / m L ) およそ 5  $\mu$  L を 9 6 ウェル MSD High Bind プレートの各ウェルに添加し、そして生物学的安全キャビネット内で 2 - 3 時間空気乾燥させて溶液を液体蒸発させる。次いで 2 % Amersham 遮断試薬 (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) および 1 0 % ヤギ血清 (VWR, West Chester, PA) を含んでなる遮断バッファー 1 5 0  $\mu$  L を室温で 2 時間添加することにより、捕捉抗体結合ウェルを遮断した。遮断されたプレートを密閉し、そして必要になるまで 4 度で保存した。

30

#### 【0233】

E C L サンドイッチ E L I S A 分析により切断された S N A P - 25 切断生成物の存在を検出するために、保存されたプレートからの遮断バッファーをウェルから吸引し、前記されたように B o N T / A で処理された細胞からのライゼート 2 5  $\mu$  L を各ウェルに添加し、そしてプレートを 4 度で一晩インキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして 1 × P B S 、 0 . 1 % TWEEN - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート) 2 0 0  $\mu$  L で各ウェルを 3 回灌ぐことによりプレートウェル 3 回を洗浄した。洗浄後、1 × P B S 、 0 . 1 % TWEEN - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート) 中 2 % Amersham 遮断試薬を含んでなる 5  $\mu$  g / m L 検出抗体溶液 2 5  $\mu$  L を各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを室温で 1 時間振盪しながらインキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを 1 × P B S 、 0 . 1 % TWEEN - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート) 2 0 0  $\mu$  L で 3 回洗浄した。洗浄後、1 × リードバッファー (Read Buffer) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 1 5 0  $\mu$  L を各ウェルに添加し、そして SECTOR (商標) Imager 6000 イメージリーダー (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) を使用してプレートを読み取った。各抗体対に関して 1 0 n M 用量で得られたシグナルを、各抗体対に関して 0 n M 用量で得られたシグナルにより除することにより比を計算した (表 12)。これらの結果により、試験された抗体対の 2 6 個の異なる組み合わせの中で 3 個の抗体対のみが試験された高用量に関して 1 0 : 1 を超えるシグナル対ノイズ比を有した：第 1 対 (2 E 2 A 6 マウスマ A b および S 9 6 8 4 ウサギ p A b ) 、

40

50

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

【0234】

【表11-1】

表12 α-SNAP-25抗体組み合わせのスクリーニング

抗体対番号	捕捉抗体	検出抗体	検出SNAP-25切断生成物	検出SNAP-25未切断基質	シグナル対ノイズ比(10nM/0nM)
1	2E2A6マウスマAb	S9684ウサギpAb	あり	なし	26.6 : 1
2	2E2A6マウスマAb	N-19ヤギpAb	あり	なし	7.3 : 1
3	2E2A6マウスマAb	H-50ウサギpAb	あり	なし	0.9 : 1
4	3C1A5マウスマAb	S9684ウサギpAb	あり	なし	12.1 : 1
5	3C1A5マウスマAb	N-19ヤギpAb	あり	なし	1.9 : 1
6	3C1A5マウスマAb	H-50ウサギpAb	あり	なし	0.9 : 1
7	C-18ヤギpAb	S9684ウサギpAb	なし	なし	0.8 : 1
8	C-18ヤギpAb	N-19ヤギpAb	なし	なし	0.9 : 1
9	C-18ヤギpAb	H-50ウサギpAb	なし	なし	0.9 : 1
10	H-50ウサギpAb	2E2A6マウスマAb	あり	なし	0.9 : 1
11	H-50ウサギpAb	C-18ヤギpAb	なし	なし	1.0 : 1
12	N-19ヤギpAb	2E2A6マウスマAb	あり	なし	0.9 : 1
13	N-19ヤギpAb	C-18ヤギpAb	なし	なし	1.1 : 1

10

20

30

【表11-2】

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

10

20

30

40

50

## 【0235】

3. 細胞分化条件の最適化

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

最適な分化培地を決定するために、Sima細胞株から適當な密度の細胞を、以下の培地および分化サプリメント：1) RPMI 1640、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン・ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンおよび25 µg / mL GT1b；2) RPMI - 1640、1×B27サプリメント、1×N2サプリメントおよび25 µg / mL GT1b；3) 最小必須培地、1×B27サプリメント、1×N2サプリメントおよび25 µg / mL GT1b；ならびに4) RPMI - 1640、10%BSA、1×N2サプリメント、1×NGFサプリメントおよび25 µg / mL GT1b；のうちの1つを1 mL含有する、IV型コラーゲンでコーティングされた24ウェル細胞培養プレートのウェルに蒔いた。細胞を37°のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、成長抑制および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで（およそ3日）インキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そして0（未処理試料）、0.2 pM、2 pMまたは20 pM BoNT/A複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。一晩処理した後、細胞を洗浄し、毒素を伴わずにさらに2日間インキュベートしてSNAP-25基質の切断を可能にし、そしてセクション1にて前記されたように採取した。細胞ライゼートのタンパク質濃度をプラッドフォー

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

### 【0236】

最適な分化時間を決定するために、SiMa細胞株から適當な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う2mM GlutaMAX(商標)I、1×B27サプリメント、1×N2サプリメント、0.1mM非必須アミノ酸、10mM HEPESおよび25μg/mL GT1bを含有する血清不含培地100μLを含有する、ポリ-D-リジンコーティングされた96ウェル細胞培養プレートのウェルに蒔いた。6時間、24時間、48時間および72時間試験する分化時間経過を得るために細胞を異なる4日に蒔き、そして37のインキュベーター中5%二酸化炭素下でインキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そして0(未処理試料)、0.1pM、0.2pM、0.4pM、0.8pM、1.6pM、3.1pM、6.25pM、12.5pMまたは25pM BoNT/A複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。一晩処理した後、細胞を洗浄し、毒素を伴わずにさらに2日間インキュベートしてSNAP-25基質の切断を可能にし、そしてセクション1にて前記されたように採取した。採取した後、細胞ライゼートのタンパク質濃度およびECL サンドイッチELISA分析によるSNAP-25切断生成物の存在の検出を前記されたように実施した。次いでECL撮像装置から得られた生データをSigmaPlot v.9.0に移し、そして4パラメーターロジスティック適合を用いて用量-応答曲線を定義した。データをプロットする場合に、4パラメーターロジスティック関数に用いられる制約はなかった。以下の分析を用いてグラフレポートを作成した：R<sub>2</sub>(相関係数)、a(データセットに関して最大)、b(傾き)およびX<sub>0</sub>±SE(E<sub>C<sub>50</sub></sub>値±標準誤差)。結果により、48-72時間分化した細胞で2pM未満のE<sub>C<sub>50</sub></sub>値を達成できることが示された(図4)。分化の48時間から72時間の間の分化型細胞を使用でき、細胞の性能における有意な変化を伴わないという知見はアッセイの頑健性を強調した。48時間未満の分化時間は処方された生成物のピコモル濃度の試験に適当ではないかもしれないが、これらの短い分化時間はバルク原薬試験には十分鋭敏である。

### 【0237】

#### 4. BoNT/A処理時間の最適化

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

10

20

30

40

50

24時間処理、細胞の除去および洗浄、BoNT/Aを伴わずに24時間の細胞のインキュベーション、ならびにセクション1にて前記されたような細胞の採取；4) BoNT/A 24時間インキュベーション、細胞の除去および洗浄、BoNT/Aを伴わずに48時間の細胞のインキュベーション、ならびにセクション1にて前記されたような細胞の採取；ならびに5) BoNT/A 24時間インキュベーション、細胞の除去および洗浄、BoNT/Aを伴わずに72時間の細胞インキュベーション、ならびにセクション1にて前記されたような細胞の採取。採取した後、細胞ライゼートのタンパク質濃度、EC<sub>50</sub>サンドイッチELISAによるSNAP-25切断生成物の検出を実施し、そして前記されたようにEC<sub>50</sub>を計算した。結果により、試験されたいずれかのBoNT/A処理で2pM未満のEC<sub>50</sub>値を達成できることが示される（図5）。興味深いことに、24時間+24時間、24時間+48時間および24時間+73時間のBoNT/A処理計画により本質的に同じEC<sub>50</sub>値、各々1.0pM、1.1pMおよび0.9pMを生じた。6時間+18時間および24時間+0時間のBoNT/A処理計画に関して生じたEC<sub>50</sub>値は各々1.7pMおよび1.6pMであった。得られたシグナルの量は低いが、これらの結果により、6時間から24時間の間のBoNT/A処理時間、加えて1日から3日の処理後インキュベーションを用いて、BoNT/A活性を検出するために十分であるEC<sub>50</sub>を生じ、そしてアッセイの全体的な時間経過において柔軟性を与えることができる事が示される。

10

#### 【0238】

##### 5. BoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法の感度

20

本明細書において開示されるBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法の感度を評価するために、BoNT/A中毒に感受性が高い細胞によるBoNT/A取り込みのタイミングを決定した。SiMa細胞株から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う2mM GlutaMAX（商標）I、1×B27サプリメント、1×N2サプリメント、0.1mM非必須アミノ酸、10mM HEPESおよび20μg/mL GT1bを含有する血清不含培地100μLを含有する、ポリ-D-リジンコーティングされた96ウェル細胞培養プレートのウェルに蒔いた。細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで（およそ3日）インキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、1nM BoNT/A複合体を含有する新鮮培地で置き換え、そしてBoNT/A処理細胞を、0分（神経毒を添加し、そして次に即座に除去した）、5分、10分、20分、30分および60分の6つの異なる時点でインキュベートした。BoNT/Aを伴わない（0nM）培地の陰性対照を使用した。インキュベーションの後、細胞を洗浄し、そしてセクション1にて前記されたように採取した。採取の後、細胞ライゼートのタンパク質濃度、EC<sub>50</sub>サンドイッチELISAによるSNAP-25切断生成物の検出を実施し、そして前記されたようにEC<sub>50</sub>を計算した。結果により、バックグラウンドを超える有意な量のSNAP-25切断生成物を生成する前に、細胞によるBoNT/Aの取り込みに1分未満しかからないことが示された（図6）。

30

#### 【0239】

##### 6. BoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法の特異性

40

本明細書において開示されるBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法の特異性を評価するために、部分的に不活化されたBoNT/Aを除外してBoNT/Aを正確に区別する、BoNT/A中毒に感受性が高い細胞の受容力を決定した。SiMa細胞株から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う2mM GlutaMAX（商標）I、1×B27サプリメント、1×N2サプリメント、0.1mM非必須アミノ酸、10mM HEPESおよび25μg/mL GT1bを含有する血清不含培地100μLを含有する、ポリ-D-リジンコーティングされた96ウェル細胞培養プレートのウェルに蒔いた。細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで（およそ3日）インキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そして1)0（未処理試料）、

50

0.03 pM、0.1 pM、0.31 pM、0.93 pM、2.78 pM、8.33 pMおよび25 pM BoNT/A複合体；2)0、0.14 nM、0.41 nM、1.23 nM、3.7 nM、11.11 nM、33.33 nMおよび100 nM 不活性BoNT/A(iBoNT/A)；または3)0、0.14 nM、0.41 nM、1.23 nM、3.7 nM、11.11 nM、33.33 nMおよび100 nM LH<sub>N</sub>/Aフラグメントのいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。iBoNT/Aは神経毒のメタロプロテアーゼ活性を完全に不活性化する軽鎖の亜鉛結合ドメインに変異を含有し、例えば「ボツリヌス神経毒Aの軽鎖の発現および精製：単一の変異が重鎖との再構成後のSNAP-25のその切断および神経毒性を無効にする」Liqing Zhou, et al., Biochemistry 34 : 15175 - 15181 (1995)（その全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）を参照されたい。LH<sub>N</sub>/Aフラグメントは結合ドメインを欠如するが、インタクトな転位置ドメインおよび軽鎖を含有し、例えば「組換え毒素フラグメント」Clifford C. Shoneら、米国特許第6461617号（その全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする）を参照されたい。24時間の処理の後、細胞を洗浄し、毒素を伴わずにさらに2日間インキュベートしてSNAP-25基質の切断を可能にし、そしてセクション1にて前記されたように採取した。採取した後、細胞ライゼートのタンパク質濃度、ECLサンドイッチELISAによるSNAP-25切断生成物の検出を実施し、そして前記されたようにEC<sub>50</sub>を計算した。結果により、iBoNT/AおよびLH<sub>N</sub>/A(EC<sub>50</sub> > 100 nM)に関する細胞の結合アフィニティーはBoNT/A(EC<sub>50</sub> = 1.6 pM)に関する結合アフィニティーよりも少なくとも60,000低いことが示される（図7）。試験された全濃度のiBoNT/Aで処理された細胞においてSNAP-25切断生成物は検出されなかった。最高用量のLH<sub>N</sub>/Aフラグメントで処理された細胞において低量のSNAP-25切断生成物が検出されたが、この活性は転位置ドメインの活性によるこのフラグメントの非特異的取り込みによるものである。故に結果により、本明細書において開示されるBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法は、それによりBoNT/Aがタンパク質分解によりSNAP-25基質を切断し、そしてBoNT/AのBoNT/A受容体への結合、神経毒/受容体複合体の内部移行、BoNT/A軽鎖の細胞内小胞から細胞質への転位置およびSNAP-25のタンパク質分解による切断を包含する中毒過程に関与する全ての工程を測定できることが示される。

## 【実施例6】

## 【0240】

ECLサンドイッチELISAを用いてBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法

以下の実施例は、ECLサンドイッチELISAを用いてBoNT/A切断部位切斷可能な結合のP<sub>1</sub>残基でカルボキシル末端を有するSNAP-25切断生成物に特異的な-SNAP-25モノクローナル抗体を使用してSNAP-25切断生成物を検出することによりBoNT/A活性を検出する免疫基盤の方法を例証する。

BoNT/Aで処理された細胞からライゼートを調製するために、確立された細胞株から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う2 mM GlutaMAX(商標)I、1×B27サブリメント、1×N2サブリメント、0.1 mM非必須アミノ酸、10 mM HEPESおよび25 μg/mL GT1bを含有する血清不含培地100 μLを含有する96ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた（実施例1および2参照）。これらの細胞を37℃のインキュベーター中5%二酸化炭素下で、成長抑制および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで（およそ3日）インキュベートした。分化型細胞からの培地を各ウェルから吸引し、そして0（未処理試料）、0.03 pM、0.1 pM、0.3 pM、0.9 pM、2.8 pM、8.3 pMおよび25 pM BoNT/A複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。24時間の処理の後、細胞を洗浄し、そして毒素を伴わずにさらに2日間インキュベートした。実施例5に記載されるように細胞を採取した。

## 【0241】

- SNAP-25捕捉抗体溶液を調製するために、ハイブリドーマ細胞株2E2A6

10

20

30

40

50

からの腹水に含有される - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を標準的なプロテイン A 精製プロトコールを用いて精製した。 - S N A P - 2 5 検出抗体溶液を調製するために、 - S N A P - 2 5 ウサギポリクローナル抗体 S 9 6 8 4 (Sigma, St. Louis, MO) を製造者の説明書に従って (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) ルテニウム (I I ) - トリス - ビピリジン - (4 - メチルスルホナート) N H S エステル標識試薬 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) に抱合させた。抱合反応、標識された - S N A P - 2 5 抗体の精製、濃度決定および保存は実施例 5 に記載されるとおりであった。

#### 【 0 2 4 2 】

S N A P - 2 5 切断生成物に特異的である捕捉抗体を含んでなる固相支持体を調製するために、 - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体 2 E 2 A 6 溶液 (1 × P B S 中 2 0 μ g / m L) およそ 5 μ L を 9 6 ウェル MSD High Bind プレートの各ウェルに添加し、そして生物学的安全キャビネット内で 2 - 3 時間空気乾燥させて溶液を液体蒸発させた。次いで捕捉抗体結合ウェルを遮断し、そして B o N T / A 活性を直接検出するために使用した。

10

#### 【 0 2 4 3 】

E C L サンドイッチ E L I S A 分析により S N A P - 2 5 切断生成物の存在を検出するために、保存されたプレートからの遮断バッファーをウェルから吸引し、B o N T / A で処理された細胞からのライゼート 2 5 μ L を各ウェルに添加し、そしてプレートを 4 °C で一晩インキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして 1 × P B S 、 0 . 1 % TWEEN - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレアート) 2 0 0 μ L で各ウェルを 3 回灌ぐことによりプレートウェルを 3 回洗浄した。洗浄後、1 × P B S 、 0 . 1 % TWEEN - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレアート) 中 2 % Amersham 遮断試薬を含んでなる 5 μ g / m L 検出抗体溶液 2 5 μ L を各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを室温で 1 時間振盪しながらインキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを 1 × P B S 、 0 . 1 % TWEEN - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレアート) 2 0 0 μ L で 3 回洗浄した。洗浄後、1 × リードバッファー (Read Buffer) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 1 5 0 μ L を各ウェルに添加し、そしてプレートを SECTOR (商標) Imager 6000 イメージリーダー (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) を使用して読み取った。収集されたデータを分析し、そして実施例 5 に記載されるように E C 50 を計算した。代表的な結果を図 8 に示す、これらの結果により、下の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約 1 5 : 1 から約 2 0 : 1 および上の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約 2 0 : 1 から約 5 0 0 : 1 で E C 50 の B o N T / A 代表値 1 . 0 p M が検出される (約 0 . 3 p M から約 2 . 0 p M の範囲) ことが示された。

20

30

#### 【 実施例 7 】

#### 【 0 2 4 4 】

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

以下の実施例は C L サンドイッチ E L I S A による B o N T / A 切断部位切断可能結合の P1 残基でカルボキシル末端を有する S N A P - 2 5 に特異的な - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体を使用して S N A P - 2 5 切断生成物を検出することにより B o N T / A 活性を検出する免疫基盤の方法を例証する。

40

細胞からのライゼートを B o N T / A で処理し、そして - S N A P - 2 5 捕捉抗体溶液を実施例 6 に記載されるように調製した。

- S N A P - 2 5 検出抗体溶液を調製するために、 - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体 S 9 6 8 4 (Sigma, St. Louis, MO) を製造者の説明書に従って (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) 西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) に抱合させた。 1 mg / m L - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体 5 0 0 μ L を、凍結乾燥活性化ペルオキシダーゼを含有するバイアルに添加し、構成要素を混合し、そして次にシアノ水素化ホウ素ナトリウム 1 0 μ L を添加することにより抱合反応を実施した。この反応混合物をドラフト内で室温で 1 時間インキュベートした。反応をクエンチした後、標準的なスピニカラムプロトコールを用いて標識された抗体を精製し、そして標準的な比色タンパク質ア

50

ツセイを用いてタンパク質濃度を決定した。分光光度計を使用して - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体 / H R P 抱合体の吸光度を 4 5 5 n m で測定してリットルあたりのモル濃度を決定した。 - S N A P - 2 5 検出抗体溶液を必要になるまで 4 ℃ で保存した。

#### 【 0 2 4 5 】

S N A P - 2 5 切断生成物に特異的である - S N A P - 2 5 捕捉抗体を含んでなる固相支持体を調製するために、 - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体 2 E 2 A 6 溶液 ( 1 × P B S 中 1 m g / m L ) およそ 1 0 0 μ L を 9 6 ウェル Greiner ホワイトプレートの各ウェルに添加し、そして 4 ℃ でプレートを一晩インキュベートし、そして次に過剰の抗体溶液を捨てた。次いで 2 % Amersham 遮断試薬 ( GE Life Sciences, Piscataway, NJ ) および 1 0 % ヤギ血清 ( VWR, West Chester, PA ) を含んでなる遮断バッファー 1 5 0 μ L を室温で 1 時間添加することにより、捕捉抗体結合ウェルを遮断した。遮断バッファーを捨て、そしてプレートをペーパータオル上でひっくり返し、そして軽くたたくことによりプロット乾燥した。次いで捕捉抗体結合ウェルを遮断し、そして B o N T / A 活性を直接検出するために使用した。

#### 【 0 2 4 6 】

C L サンドイッチ E L I S A 分析により S N A P - 2 5 切断生成物の存在を検出するために、 B o N T / A で処理された細胞からのライゼート 5 0 μ L を各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを 5 0 0 r p m で回転している振盪機上で 4 ℃ で 2 - 4 時間から一晩インキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして 1 × P B S 、 0 . 0 5 % T W E E N - 2 0 ( 登録商標 ) ( ポリオキシエチレン ( 2 0 ) ソルビタンモノラウレート ) 2 0 0 μ L で各ウェルを 3 回灌ぐことによりプレートウェルを洗浄した。洗浄後、 1 × P B S 、 0 . 1 % T W E E N - 2 0 ( 登録商標 ) ( ポリオキシエチレン ( 2 0 ) ソルビタンモノラウレート ) 中 2 % Amersham 遮断試薬を含んでなる 1 m g / m L - S N A P - 2 5 ポリクローナル抗体 / H R P 検出抗体溶液 1 0 0 μ L を各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを 6 5 0 r p m で回転している振盪機上で室温で 1 時間インキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを 1 × P B S 、 0 . 0 5 % T W E E N - 2 0 ( 登録商標 ) ( ポリオキシエチレン ( 2 0 ) ソルビタンモノラウレート ) 2 0 0 μ L で 3 回洗浄した。洗浄後、 SuperSignal ELISA Pico 1 : 1 混合物 ( Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL ) 1 0 0 μ L を各ウェルに添加し、そしてルミノメーター ( Molecular Devices, Sunnyvale, CA ) を使用して 3 9 5 n m で読み取った。収集されたデータを分析し、そして実施例 5 に記載されるように E C 5 0 を計算した。これらの結果により、下の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約 1 5 : 1 から約 2 0 : 1 および上の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約 2 0 : 1 から約 5 0 0 : 1 で E C 5 0 の B o N T / A 代表値 1 . 0 p M が検出される ( 約 0 . 3 p M から約 2 . 0 p M の範囲 ) ことが示された。

#### 【 実施例 8 】

#### 【 0 2 4 7 】

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

以下の実施例は S N A P - 2 5 切断生成物に特異的な - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体および異なるタンパク質に関する第 2 の抗体対を使用して S N A P - 2 5 切断生成物を検出することにより B o N T / A 活性を検出するマルチプレックス免疫基盤の方法を例証する。

#### 【 0 2 4 8 】

##### 1. 第 2 のタンパク質に関する捕捉抗体 - 検出抗体対の調製および同定

分析のための未処理細胞ライゼートを得るために、 S i M a 細胞のストック培養物から適当な密度の細胞を、 1 × R P M I 1 6 4 0 、 1 0 % F B S 、 0 . 1 m M 非必須アミノ酸、 1 0 m M H E P E S 、 1 m M ピルビン酸ナトリウムおよび 1 0 0 単位 / 1 0 0 μ g ベニシリン - ストレプトマイシンを含有する成長培地 4 0 m L を含有する T 1 7 5 フラスコに播種した。これらの細胞を 3 7 ℃ のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下で、細胞がお

10

20

30

40

50

よそ 70 - 90 % コンフルエントになるまでインキュベートした。細胞を洗浄し、そして新たに調製された Triton X - 100 溶解バッファー (20 mM Tris (pH 7.5)、150 mM 塩化ナトリウム、0.001 M EDTA、1 mM EGTA および 1% Triton - X - 100) 中 4<sup>10</sup> でよそ 30 分間一定の攪拌を行いながら溶解することにより細胞を採取した。溶解した細胞を 3300 - 3330 × g、8<sup>20</sup> で 40 分間遠心して、ベンチトップ遠心を用いてデブリを排除した。

#### 【0249】

第 2 のタンパク質のための適切な捕捉抗体 - 検出抗体対を同定するために、5 つの異なるタンパク質からなる捕捉および検出抗体対の 21 個の異なる組み合わせにおいて ECL サンドイッチ E L I S A 分析を行った (表 13)。使用された抗体は - シンタキシン 1 A - H P C マウスモノクローナル抗体 S 0664 (Sigma, St. Louis, MO)、- GAPDH マウスモノクローナル抗体 M A B 374 (Chemicon, Temecula, CA)、- シンタキシン 1 ウサギポリクローナル抗体 S 1172 - 1 (Sigma, St. Louis, MO)、- GAPDH ウサギポリクローナル抗体 2275 - P C - 1 (R & D Systems, Minneapolis, MN)、- シンタキシン 2 ウサギポリクローナル抗体 S 5687 (Sigma, St. Louis, MO)、- ヒトシンタキシン 2 マウスモノクローナル抗体 M A B 2936 (R & D Systems, Minneapolis, MN)、- マウスシンタキシン 2 ヤギポリクローナル抗体 A F 2568 (Sigma, St. Louis, MO)、- シンタキシン 2 ウサギポリクローナル抗体 A B 5596 (Sigma, St. Louis, MO)、- シンタキシン 1 ウサギポリクローナル抗体 S 1172 - 2 (Sigma, St. Louis, MO)、- h、m、r アクチンヒツジポリクローナル抗体 A F 4000 (R & D Systems, Minneapolis, MN)、- ベータアクチンマウスモノクローナル抗体 A 1978 (Sigma, St. Louis, MO)、- ベータマウスポリクローナル抗体 アクチン A 2228 (Sigma, St. Louis, MO)、マウス - GAPDH マウスモノクローナル抗体 G 8795 (Sigma, St. Louis, MO)、- GAPDH ウサギポリクローナル抗体 G 9595 (Sigma, St. Louis, MO) であった。<sup>20</sup>

#### 【0250】

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

#### 【0251】

S N A P - 25 切断生成物に特異的である捕捉抗体を含んでなる固相支持体を調製するために、- S N A P - 25 モノクローナル抗体 2 E 2 A 6 溶液 (1 × PBS 中 20 μg / mL) およそ 5 μL を 96 ウェル MSD High Bind プレートの各ウェルに添加し、そして生物学的安全キャビネット内で 2 - 3 時間空気乾燥させて溶液を液体蒸発させ、そして次にプレートを密閉し、そして必要になるまで 4<sup>40</sup> で保存した。次いで 3% B S A (Pierce, Rockford, IL)、10% ヤギ血清 (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) および 0.05% TWEEN - 20 PBS 中 Difco 1% 脱脂乳 (BD BioSciences Franklin Lakes, NJ) を含んでなる遮断バッファー 150 μL を室温で 1 - 2 時間添加することにより、乾燥した捕捉抗体結合ウェルを遮断した。

#### 【0252】

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

10

20

30

40

50

で処理された細胞からのライゼート 25 μLを各ウェルに添加し、そしてプレートを4  
で一晩インキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして1×PBS、0.1%TWEEN  
- 20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレアート)200 μLで各ウェルを3回灌ぐことによりプレートウェルを3回洗浄した。洗浄後、前記された  
ような遮断バッファー中に再懸濁された5 μg/mLの適切な第2のタンパク質検出抗体  
溶液25 μLを各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを室温  
で約1時間振盪しながらインキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェル  
を1×PBS、0.1%TWEEN-20(登録商標)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタン  
モノラウレアート)250 μLで3回洗浄した。洗浄後、1×リードバッファー(Read B  
uffer)(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)150 μLを各ウェルに添加し、  
そしてプレートをSECTOR(商標)Imager 6000イメージリーダー(Meso Scale Discovery,  
Gaithersburg, MD)を使用して読み取った。各抗体対に関して未処理細胞ライゼートから得られたシグナルを、各抗体対に関して溶解バッファー対照(0 nM用量)に関して得られたシグナルにより除することにより比を計算した(表13)。これらの結果により、試験された抗体対の21個の異なる組み合わせの中で2個の抗体対のみが試験された高用量に関して10:1を超えるシグナル対ノイズ比を有した: 第16対 - GAPDHマ  
ウスモノクローナル抗体MAB374および - GAPDHウサギポリクローナル抗体R  
DS2275-PC-1; ならびに第21対: - GAPDHマウスモノクローナル抗体  
MAB374および - GAPDHウサギポリクローナル抗体G9545。 - GAPD  
Hマウスモノクローナル抗体MAB374および - GAPDHウサギポリクローナル抗  
体G9545対をマルチプレックスECLサンドイッチELISAに関する第2タンパク  
質捕捉抗体-検出抗体対として選択した。  
10  
20

【0253】

【表12-1】

表13 第2のタンパク質抗体組み合わせのスクリーニング

抗体対番号	捕捉抗体	検出抗体	タンパク質の検出	シグナル／ノイズ比 (ライゼート／バッファー)
1	$\alpha$ -シンタキシン 2 S 5687 pAb	$\alpha$ -シンタキシン 2 M AB2936 mAb	なし	0.92
2	$\alpha$ -シンタキシン 2 A F2568 pAb	$\alpha$ -シンタキシン 2 A B5596 pAb	なし	1.1
3	$\alpha$ -シンタキシン 2 A F2568	$\alpha$ -シンタキシン 2 S 5687 pAb	なし	1.11
4	$\alpha$ -シンタキシン 2 A F2936 pAb	$\alpha$ -シンタキシン 2 A B5596 pAb	あり	1.63
5	$\alpha$ -シンタキシン 2 A F2936 pAb	$\alpha$ -シンタキシン 2 S 5687 pAb	あり	1.6
6	$\alpha$ -シンタキシン 2 A B5596 pAb	$\alpha$ -シンタキシン 2 S 5687 pAb	なし	0.82
7	$\alpha$ -シンタキシン 2 A B5596 pAb	$\alpha$ -シンタキシン 2 M AB2936 mAb	なし	0.87
8	$\alpha$ -シンタキシン 2 M AB2936 mAb	$\alpha$ -シンタキシン 2 A B5596 pAb	あり	1.2
9	$\alpha$ -シンタキシン 2 M AB2936 mAb	$\alpha$ -シンタキシン 2 S 5687 pAb	なし	1.07
10	$\alpha$ -シンタキシン S0 664 mAb	$\alpha$ -シンタキシン 1 S 1172-1 pAb	あり	4.23

10

20

30

【表12-2】

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

## 【0254】

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

分析のための B o N T / A 処理細胞ライゼートを得るために、S i M a 細胞株のストック培養物から適当な密度の細胞を、最小必須培地、アール塩を伴う 2 mM GlutaMAX (商標) I、1 × B 2 7 サプリメント、1 × N 2 サプリメント、0.1 mM 非必須アミノ酸、10 mM H E P E S を含有する血清不含培地を含有するポリ-D-リジン 9 6 - ウェルプレートに播種した。これらの細胞を 3 7 のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで (およそ 3 日) インキュベートした。培地を各ウェルから吸引し、そして 0 (未処理試料)、0.67 単位 / mL、2.35 単位 / mL、8.23 単位 / mL、28.82 単位 / mL、101 単位 / mL、353 単位 / mL B o N T / A 複合体のいずれかを含有する新鮮培地で置き換えた。24 時間の処理の後、細胞を洗浄し、毒素を伴わずにさらに 2 日間インキュベートした。細胞を洗浄し、採取し、そしてセクション 1 にて前記されたように加工した。

## 【0255】

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

10

20

30

40

50

covery, Gaithersburg, MD) に抱合させた。抱合反応、標識された - S N A P - 2 5 抗体の精製、濃度決定および保存は前記のセクション 1 に記載されたとおりであった。

#### 【 0 2 5 6 】

- S N A P - 2 5 捕捉抗体および - G A P D H 捕捉抗体を含んでなる固相支持体を調製するために、 - S N A P - 2 5 捕捉抗体溶液 (1 × P B S 中 4 5  $\mu$  g / m L ) およそ 2 . 5 n L および - G A P D H 捕捉抗体溶液 (1 × P B S 中 1 2 0  $\mu$  g / m L ) 2 . 5 n L をロボットシステムを用いてマルチプレックス形式の 9 6 ウエルMSD High Bind プレートの各ウェルに添加した。生物学的安全キャビネット内で少なくとも 2 - 3 時間空気乾燥させて溶液を液体蒸発させた。次いで捕捉抗体結合ウェルを遮断し、そして B o N T / A 活性および G A P D H タンパク質を直接検出するために使用した。

10

#### 【 0 2 5 7 】

マルチプレックス E C L サンドイッチ E L I S A 分析によ S N A P - 2 5 切断生成物の存在を検出するために、保存されたプレートからの遮断バッファーをウェルから吸引し、前記されたように B o N T / A で処理された細胞からのライゼート 2 5  $\mu$  L を各ウェルに添加し、そしてプレートを 4 °C で一晩インキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして 1 × P B S 、 0 . 1 % TWEEN - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレアート) 2 0 0  $\mu$  L で各ウェルを 3 回灌ぐことによりプレートウェルを 3 回洗浄した。洗浄後、前記されたような 5  $\mu$  g / m L - S N A P - 2 5 検出抗体溶液 2 5  $\mu$  L および 5  $\mu$  g / m L - G A P D H 検出抗体 2 5  $\mu$  L を各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを室温で約 1 時間振盪しながらインキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを 1 × P B S 、 0 . 1 % TWEEN - 20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレアート) 2 5 0  $\mu$  L で 3 回洗浄した。洗浄後、 1 × リードバッファー (Read Buffer) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 1 5 0  $\mu$  L を各ウェルに添加し、そしてプレートを SECTOR (商標) Imager 6000 イメージリーダー (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) を使用して読み取った。収集されたデータを分析し、そして P L A 2 . 0 ソフトウェア (Stegmann Systems, GmbH, Germany) を使用した以外は実施例 5 に記載されるように正規化されたデータから相対効力を計算する。

20

#### 【 0 2 5 8 】

比較として、シングルプレックス E C L サンドイッチ E L I S A を用いて実施例 6 に記載されるように S N A P - 2 5 切断生成物の検出をも実施した。

30

#### 【 0 2 5 9 】

結果により、シングルプレックス E C L サンドイッチ E L I S A から得られた S N A P - 2 5 データにより、またはマルチプレックス E C L サンドイッチ E L I S A から得られた非正規化 S N A P - 2 5 データから、用量 - 応答曲線に適合しなかった 1 つの異常値試料が表されることが示された。しかしながら、 S N A P - 2 5 データの G A P D H データに対する正規化により、良好な曲線適合が示され、そして効力が予期された値により近似した。

#### 【 実施例 9 】

#### 【 0 2 6 0 】

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

40

以下の実施例は S N A P - 2 5 切断生成物に特異的な - S N A P - 2 5 モノクローナル抗体および異なるタンパク質に関する第 2 の抗体対を使用して S N A P - 2 5 切断生成物を検出することにより B o N T / A 活性を検出するマルチプレックス免疫基盤の方法を例証する。

#### 【 0 2 6 1 】

B o N T / A で処理された細胞からライゼートを実施例 6 に記載されるように調製した。 - S N A P - 2 5 捕捉抗体溶液、 - S N A P - 2 5 検出抗体溶液および - S N A P - 2 5 固相支持体を実施例 7 に記載されるように調製した。

50

## 【0262】

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

## 【0263】

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

## 【0264】

マルチプレックス CL サンドイッチ ELISA 分析により SNAP - 25 切断生成物の存在を検出するために、BONT/A で処理された細胞からの細胞ライゼート  $50 \mu\text{L}$  を

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

## 【0265】

10

20

30

40

50

類似の設計を、同じ - GAPDH 抗体対を伴う ECL サンドイッチ ELISA を用いて BoNT/A 切断部位切断可能結合の P<sub>1</sub> 残基でカルボキシル末端を有する SNAP-25 切断生成物に特異的な - SNAP-25 モノクローナル抗体を使用して SNAP-25 切断生成物を検出することにより BoNT/A 活性を検出するマルチプレックス免疫基盤の方法に用いることができる。

#### 【実施例 10】

##### 【0266】

###### ピコモル濃度量のBoNT/Aを検出するための免疫基盤の方法

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

10

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

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

20

30

30

40

##### 【0267】

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

##### 【0268】

ECL サンドイッチ ELISA 分析により SNAP-25 切断生成物の存在を検出するために、保存されたプレートから遮断バッファーを吸引し、BoNT/A で処理された細胞からのライゼート 25 µL を各ウェルに添加し、そしてプレートを 4 °C で 2 時間または 24 時間のいずれかでインキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして 1 × PBS、0.1% TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレア

50

ート) 200 μL で各ウェルを 3 回灌ぐことによりプレートウェルを 3 回洗浄した。洗浄後、1 × PBS、0.1% TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレアート) 中 2% Amersham 遮断試薬を含んでなる 5 μg / mL - SNAP-2 検出抗体溶液 25 μL を各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを室温で 1 時間振盪しながらインキュベートした。 - SNAP-25 検出抗体をインキュベートした後、ウェルを 1 × PBS、0.1% TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレアート) 200 μL で 3 回洗浄した。洗浄後、プレートを加工し、収集されたデータを分析し、そして実施例 5 に記載されるように EC<sub>50</sub> を計算した。これらの結果により、下の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約 15 : 1 から約 20 : 1 および上の漸近線に関するシグナル対ノイズ比約 20 : 1 から約 500 : 1 で EC<sub>50</sub> の BoNT/A 代表値 1.0 pM が検出された (約 0.3 pM から約 2.0 pM の範囲) (図 9)。この方法を実施例 8 に記載されるようにマルチプレックス様式で実施することもできる。

10

#### 【0269】

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

BoNT/A で処理された細胞からのライゼートおよび - SNAP-25 捕捉抗体溶液を実施例 6 に記載されるように調製する。 - SNAP-25 検出抗体溶液および SNAP-25 切断生成物に特異的である捕捉抗体を含んでなる固相支持体を実施例 7 に記載されるように調製する。

20

#### 【0270】

CL サンドイッチ ELISA 分析により SNAP-25 切断生成物の存在を検出するために、BoNT/A で処理された細胞からのライゼート 25 μL を各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを 500 rpm で回転している振盪機上で 4 で 2 時間または 24 時間のいずれかでインキュベートした。細胞ライゼートを吸引し、そして 1 × PBS、0.05% TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレアート) 200 μL で各ウェルを 3 回灌ぐことによりプレートウェルを 3 回洗浄する。洗浄後、1 × PBS、0.1% TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレアート) 中 2% Amersham 遮断試薬を含んでなる 1 mg / mL - SNAP-25 ポリクローナル抗体 / HRP 検出抗体溶液 100 μL を各ウェルに添加し、プレートを密閉し、そして密閉されたプレートを 650 rpm で回転している振盪機上で室温で 1 時間インキュベートした。検出抗体をインキュベートした後、ウェルを 1 × PBS、0.05% TWEEN-20 (登録商標) (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレアート) 200 μL で 3 回洗浄する。洗浄後、SuperSignal ELISA Pico 1 : 1 混合物 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) 100 μL を各ウェルに添加し、ルミノメーター (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を使用して 395 nm で読み取る。収集されたデータを分析し、そして実施例 5 に記載されるように EC<sub>50</sub> を計算する。この方法を実施例 8 に記載されるようにマルチプレックス様式で実施することもできる。

30

#### 【実施例 11】

#### 【0271】

##### - BoNT/A 中和抗体を検出する免疫基盤の方法

40

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

BoNT/A は現在、筋肉運動亢進、眼科、胃腸管、泌尿器科および化粧品を含む広範囲の医療適用に使用されている。BoNT/A の長期間処置を繰り返すと、患者は毒素に対する - BoNT/A 中和抗体を発達させて、免疫抵抗性に至り得る。 - BoNT/A 中和抗体は BoNT/A の結合ドメイン (H<sub>C</sub>) および / または転位置ドメイン (H<sub>N</sub>) に結合することにより、毒素のニューロン細胞への取り込みを停止させることにより BoNT/A 活性を阻止する。いくつかの研究により、ジストニアに関して BoNT/A の処方で繰り返し処置された患者の 5 - 10 % までが、 - BoNT/A 中和抗体を発達さ

50

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

## 【0272】

- BoNT / A 中和抗体の存在または不在を検出するために、本明細書に開示される BoNT / A 活性を決定する免疫基盤の方法を用いることができる。1つの方式はウェスタンプロット検出法を用いて、種々の濃度の BoNT / A での処理の後に存在する S N A P - 25 切断生成物の量を決定することであり、もう1つの方式は E C L サンドイッチ E L I S A 検出法を用いることであった。

10

## 【0273】

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

20

## 【0274】

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

30

## 【0275】

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

40

## 【0276】

E C L サンドイッチ E L I S A により S N A P - 25 切断生成物の存在を検出するために、培地を各ウェルから除去し、そして細胞を実施例 5 に記載されるように溶解した。

- S N A P - 25 捕捉抗体溶液、- S N A P - 25 検出抗体溶液および - S N A P - 25 固相支持体を実施例 7 に記載されるように調製した。上澄を - S N A P - 25 固相支持体に移し、そして E C L サンドイッチ E L I S A アッセイを実施例 5 に詳記されるように実施した。収集されたデータを分析し、そして E C<sub>50</sub> が BoNT / A の活性をその最大の 1 / 2 まで阻止するために必要な血清希釈であり、そして血清の最高希釈で得られた S N A P - 25 切断生成物シグナルを最低血清希釈で得られたシグナルで除することにより、最大シグナル（シグナル<sub>M a x</sub>）の最小シグナル（シグナル<sub>M i n</sub>）に対する比が得られた以外は実施例 5 に記載されるように E C<sub>50</sub> を計算した。

50

## 【0277】

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

## 【実施例 12】

## 【0278】

操作された細胞を使用して BoNT/A 活性を検出する免疫基盤の方法

10

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

外因性 BoNT/A 受容体を確立された細胞株を含んでなる細胞に導入するために、カチオン性脂質法により配列番号：59 の FGF R 2 をコードする配列番号：130 のポリヌクレオチド分子、または配列番号：25 の FGF R 3 をコードする配列番号：139 のポリヌクレオチド分子を含んでなる発現構築物を確立された細胞株からの細胞にトランスフェクトした。適当な密度（約  $5 \times 10^6$  セル）の確立された細胞株からの細胞を、完全培養地 5 mL を含有する 100 mm 組織培養皿に蒔き、そして 37 のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下で、細胞がトランスフェクションに適切な密度に到達するまで成長させる。室温で 5 分間インキュベートされた LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 60 μL を含有する OPTI-MEM 還元型血清培地 1.5 mL を、FGF R 2 もしくは FGF R 3 をコードする発現構築物 24 μg、または緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする対照発現構築物を含有する OPTI-MEM 還元型血清培地 1.5 mL に添加することによりトランスフェクション溶液 3 mL を調製する。このトランスフェクション混合物を室温でおよそ 30 分間インキュベートした。完全培地をトランスフェクション溶液 3 mL で置き換え、そして細胞を 37 のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下でおよそ 8 時間インキュベートする。トランスフェクション培地を新鮮完全培地 3 mL で置き換える、そして細胞を 37 のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下でおよそ 24 時間インキュベートする。培地を、およそ 1 mM G 4 18 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を含有する新鮮完全培地 3 mL で置き換える。細胞を 37 のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下でおよそ 1 週間インキュベートし、古い培地を、0.5 mM G 4 18 を含有する新鮮完全培養培地で置き換える。一度抗生物質抵抗性コロニーが確立されると、抵抗性コロニーを、およそ 0.5 mM G 4 18 を補充した新鮮完全培養培地を含有する新しい 100 mm 培養プレートに、これらの細胞が 6 から  $20 \times 10^5$  セル / mL の密度に到達するまで再度蒔く。

20

30

30

## 【0279】

BoNT/A 受容体の過剰発現が BoNT/A 中毒に対する細胞感受性を改善したか、または BoNT/A 取り込み受容力を改善したかどうかを決定するために、様々な用量の BoNT/A 複合体で処理された細胞を使用して用量 - 応答曲線を作成した。BoNT/A で処理された細胞からライゼートを調製するために、確立されたトランスフェクトされた細胞株からの適当な密度の細胞を、適切な血清不含培地（表 5）100 μL を含有する 96 ウェル組織培養プレートのウェルに蒔いた。これらの細胞を 37 のインキュベーター中 5 % 二酸化炭素下で、成長抑止および神経突起伸長のような標準的および日常的な形態学基準により評価されるように細胞が分化するまで（およそ 3 日）インキュベートした。分化型細胞からの培地を各ウェルから吸引し、そして SiMa または PC12 トランスフェクトされた細胞株を含んでなる細胞に関しては 0 (未処理試料)、0.01 nM、0.04 nM、0.12 nM、0.37 nM、1.1 nM、3.3 nM および 10 nM BoNT/A 複合体；ならびに Neuro-2a トランスフェクトされた細胞株を含んでなる細胞に関しては 0 (未処理試料)、0.14 nM、0.40 nM、1.2 nM、3.7 nM、11

40

50

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

#### 【0280】

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

#### 【0281】

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

#### 【0282】

#### 【表13】

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

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

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

#### 【0283】

本発明の態様として、以下のものが挙げられる。

[1] 担体、少なくとも3個のアミノ酸を含んでなる可動性リンカーおよび配列番号：148を含んでなるS N A P - 2 5 抗原を含んでなる組成物。

[2] 可動性リンカーおよびS N A P - 2 5 抗原アミノ酸配列が配列番号：38である[

10

20

30

40

50

2]に記載の組成物。

[3] 単離された - S N A P - 2 5 抗体が S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し；

- S N A P - 2 5 抗体が S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含まないエピトープに関して  $1 \times 1 0^{-1} M^{-1} s^{-1}$

- 未満の会合速度定数を有し；そして

- S N A P - 2 5 抗体がそのエピトープに関して  $0.450 nM$  未満の平衡解離定数を有する；

単離された - S N A P - 2 5 抗体。 10

[4] エピトープが配列番号：3 2 である [3] に記載の単離された - S N A P - 2 5 抗体。

[5] a) 配列番号：7 2、配列番号：7 4、配列番号：7 6、配列番号：8 0 または配列番号：8 2 を含んでなる重鎖可変領域；および

b) 配列番号：8 4、配列番号：8 6、配列番号：8 8、配列番号：9 0 または配列番号：9 2 を含んでなる軽鎖可変領域；

を含んでなる単離された - S N A P - 2 5 抗体。

[6] a) 配列番号：9 3、配列番号：1 2 1 または配列番号：1 0 0 を含んでなる重鎖可変領域；および

b) 配列番号：1 0 5、配列番号：1 1 0 または配列番号：1 1 5 を含んでなる軽鎖可変領域； 20

を含んでなる単離された - S N A P - 2 5 抗体。

[7] 少なくとも配列番号：1 0 0 の V<sub>H</sub> C D R 3、配列番号：1 0 1 の V<sub>H</sub> C D R 3 または配列番号：1 0 2 の V<sub>H</sub> C D R 3 を含んでなる単離された - S N A P - 2 5 抗体。

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

b) 処理された細胞から B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離すること；

c) S N A P - 2 5 構成要素を固相支持体に連結された - S N A P - 2 5 抗体と接触させること。 30

ここで - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し、 - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシル末端グルタミンを含まない S N A P - 2 5 からのエピトープに関して  $1 \times 1 0^{-1} M^{-1} s^{-1}$  未満の会合速度定数を有し；そして - S N A P - 2 5 抗体はエピトープに関して  $0.450 nM$  未満の平衡解離定数を有する；

d) - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシル末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること。 40

ここで抗体 - 抗原複合体による検出は B o N T / A 活性の指標である；の工程を含んでなる B o N T / A 活性を検出する方法。

[9] S N A P - 2 5 切断生成物が S N A P - 2 5<sub>1,9,7</sub> である [8] に記載の方法。

[10] 抗体 - 抗原複合体の存在がサンドイッチ E L I S A を使用して検出される [8] に記載の方法。

[11] 方法が下の漸近線で少なくとも 3 : 1 のシグナル対ノイズ比および上の漸近線で少なくとも 1 0 : 1 のシグナル対ノイズ比を有する [8] に記載の方法。

[12] 試料が多くても  $100 pM$  の B o N T / A を含んでなる [8] に記載の方法。

[13] 確立された細胞株からの細胞が約  $100 pM$  以下の B o N T / A による B o N T

50

/ A 中毒に感受性が高い [ 8 ] に記載の方法。

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

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

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

c ) 処理された細胞から S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる S N A P - 2 5 構成要素を単離すること;

d ) S N A P - 2 5 構成要素を固相支持体に連結された - S N A P - 2 5 抗体に接触させること、ここで - S N A P - 2 5 抗体は;

ここで - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシリ末端グルタミンを含んでなるエピトープに結合し、 - S N A P - 2 5 抗体は S N A P - 2 5 切断生成物からの B o N T / A 切断部位切断可能結合のカルボキシリ末端グルタミンを含まない S N A P - 2 5 からのエピトープに関して  $1 \times 10^1 M^{-1} s^{-1}$  未満の会合速度定数を有し; そして - S N A P - 2 5 抗体はそのエピトープに関して  $0.450 nM$  未満の平衡解離定数を有する;

e ) - S N A P - 2 5 抗体および B o N T / A 切断部位切断可能結合からのカルボキシリ末端グルタミンを有する S N A P - 2 5 切断生成物を含んでなる抗体 - 抗原複合体の存在を検出すること;

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

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

ここで工程 f で検出された抗体 - 抗原複合体の量に相対して工程 e で検出された抗体 - 抗原複合体のより少ない検出量は - B o N T / A 中和抗体の存在の指標である; の工程を含んでなる哺乳動物における B o N T / A 免疫抵抗性を決定する方法。

【図 1A】

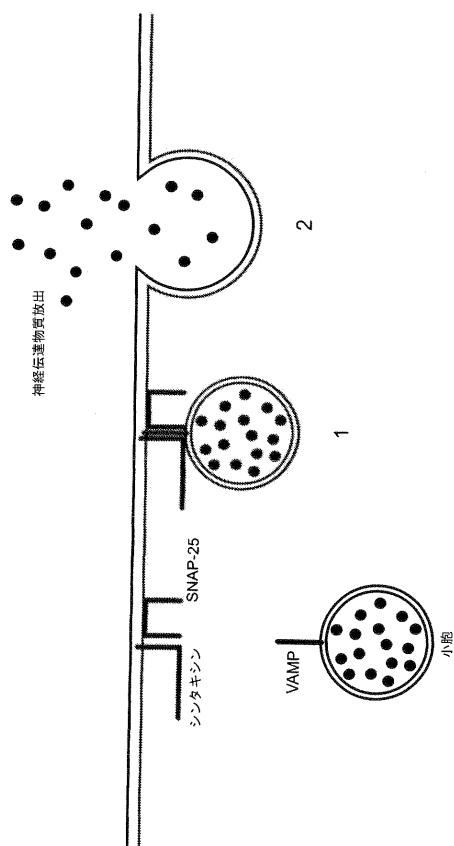


FIG. 1A.

【図 1B】

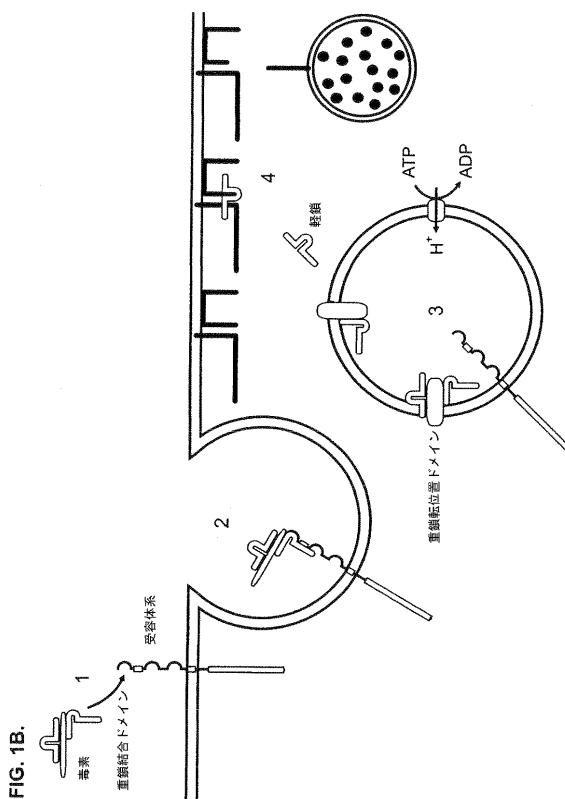
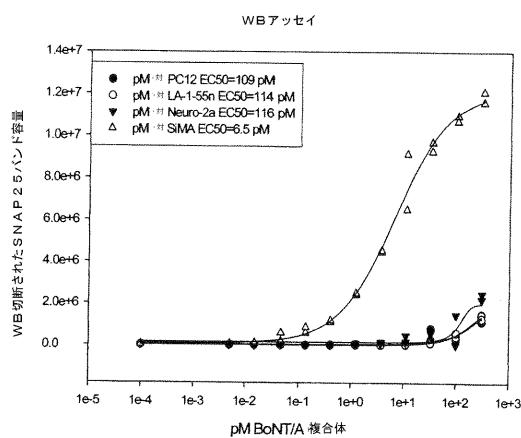


FIG. 1B.

【図 2】

FIG. 2.

A

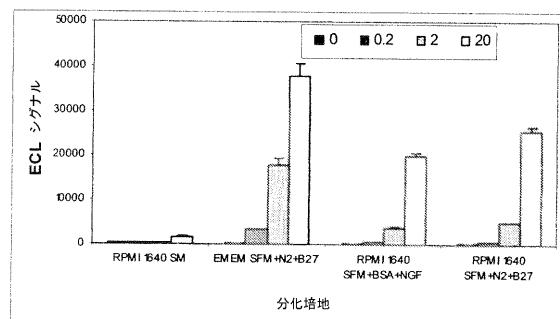


B

シグナル対ノイズ比	PC12	LA-1-55n	Neuro-2a	SiMa
300pM/0pM	107	121	184	412
1.2pM/0pM	3	2	6	35

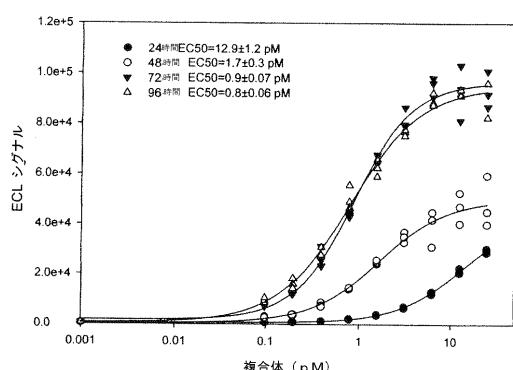
【図 3】

FIG. 3.



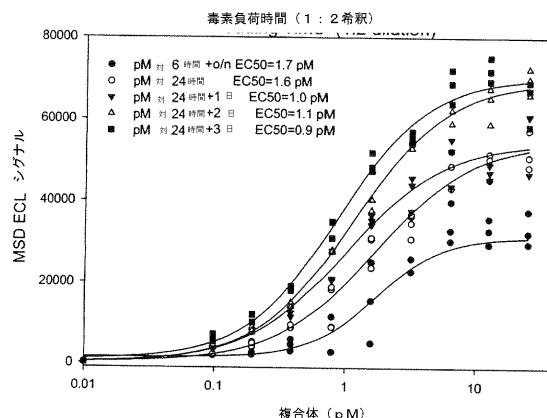
【図4】

FIG. 4.



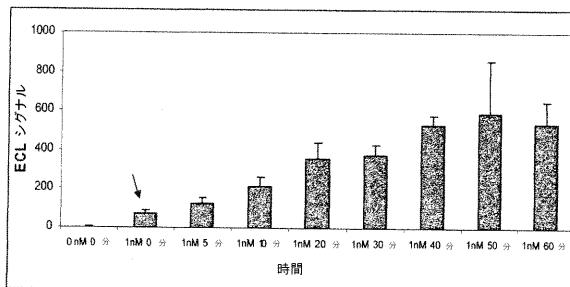
【図5】

FIG. 5.



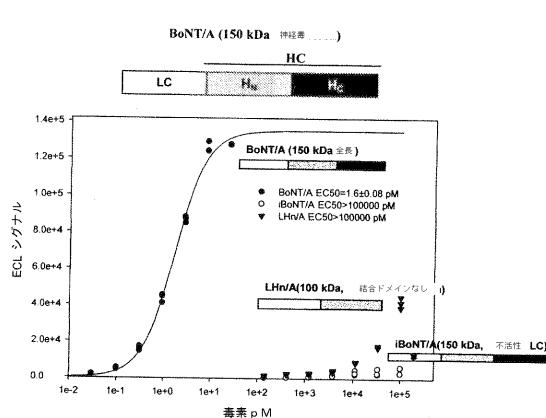
【図6】

FIG. 6.



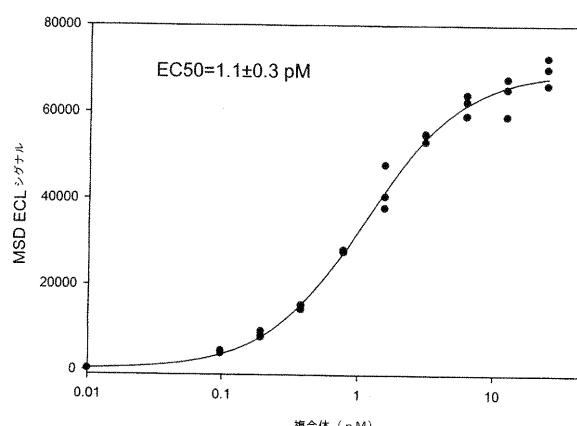
【図7】

FIG. 7.



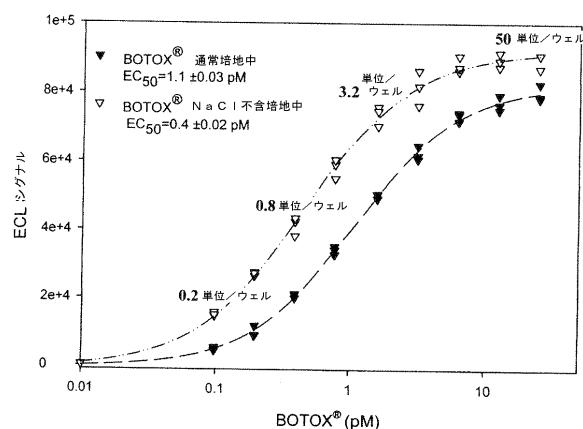
【図8】

FIG. 8.



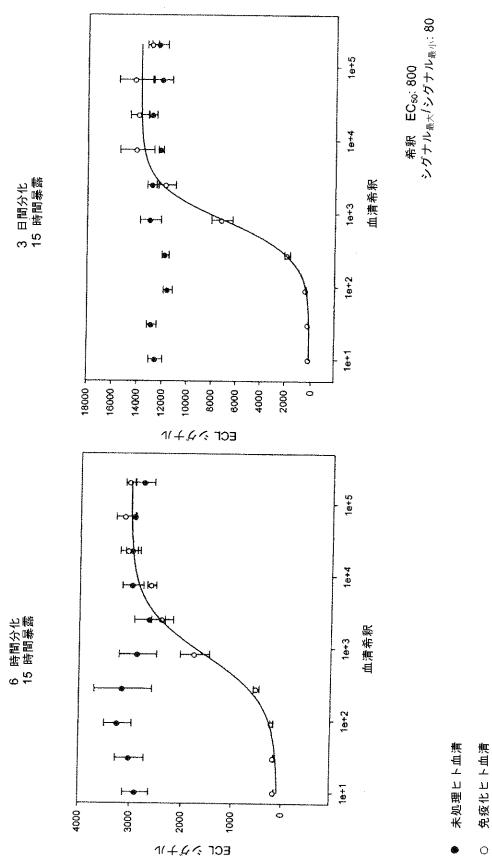
【図9】

FIG.9.



【図10】

FIG.10.



【配列表】

2015143689000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 ジョアン・ワン  
アメリカ合衆国92620カリフォルニア州アーバイン、ブリストルコーン37番

(72)発明者 パットン・イー・ガレイ  
アメリカ合衆国90808カリフォルニア州ロング・ビーチ、イースト・ページェントリー・ストリート5503番

(72)発明者 リナ・エス・ウォング  
アメリカ合衆国92620カリフォルニア州アーバイン、イングルサイド6番

(72)発明者 ディアン・ディ・ホッジス  
アメリカ合衆国92780カリフォルニア州タスティン、パインウッド・ロード14351番

(72)発明者 ケイ・ロジャー・アオキ  
アメリカ合衆国92679カリフォルニア州コト・デ・カサ、ジンジャー・リリー・コート2番

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QQ03 QQ79 QR48 QR51 QR82 QS03 QS13 QS33  
QS35 QX01  
4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 EA50 GA01

【外國語明細書】

2015143689000001.pdf

专利名称(译)	基于免疫的肉毒毒素血清型分析		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015143689A</a>	公开(公告)日	2015-08-06
申请号	JP2015028972	申请日	2015-02-17
[标]申请(专利权)人(译)	阿勒根公司		
申请(专利权)人(译)	Aragan公司		
[标]发明人	エステル・フェルナンデス・サラス ジョアン・ワン パットン・イー・ガレイ リナ・エス・ウォング ディアン・ディ・ホッジス ケイロジヤー・アオキ		
发明人	エステル・フェルナンデス・サラス ジョアン・ワン パットン・イー・ガレイ リナ・エス・ウォング ディアン・ディ・ホッジス ケイロジヤー・アオキ		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 C07K16/18 G01N33/543		
CPC分类号	A61P25/00 A61P25/02 A61P25/04 A61P25/08 A61P27/02 C07K16/1282 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/92 C12Q1/37 G01N33/5014 C07K14/10 C07K14/33 C07K16/12 G01N33 /569 G01N33/566 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.S C12Q1/02 C07K16/18 G01N33/543.545.A C07K16/18.ZNA C12N15/00.A C12N15 /09.Z C12N15/13 C12P21/08 G01N33/53.SZN.A G01N33/569.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR82 4B063 /QS03 4B063/QS13 4B063/QS33 4B063/QS35 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/GA01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064 /DA13		
优先权	61/036723 2008-03-14 US		
其他公开文献	<a href="#">JP2015143689A5</a> <a href="#">JP6050401B2</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

## 摘要(译)

本发明涉及包含肉毒杆菌神经毒素血清型A (BoNT/A) 的药物组合物，其中特别确定药物制造过程中的效力。

(21)出願番号	特願2015-28972 (P2015-28972)	(71)出願人	591018268 アラーガン、インコーポレイテッド ALLERGAN, INCORPORATED
(22)出願日	平成27年2月17日 (2015.2.17)		E D
(62)分割の表示	特願2010-550881 (P2010-550881) の分割		アメリカ合衆国92612カリフォルニア 州アーヴィン、デュポン・ドライブ252 5番
(31)優先権主張番号	61/036,723	(74)代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(32)優先日	平成20年3月14日 (2008.3.14)	(72)発明者	エステル・フェルナンデス-サラス アメリカ合衆国92831カリフォルニア 州フラートン、ロッキー・ロード1710 番
(33)優先権主張国	米国 (US)		
			最終頁に続く